SUPPLEMENTO 1 AL N. 4 - AGOSTO 2014, ANNO 20

ISSN: 1124-4593

LAR

Large Animal Review

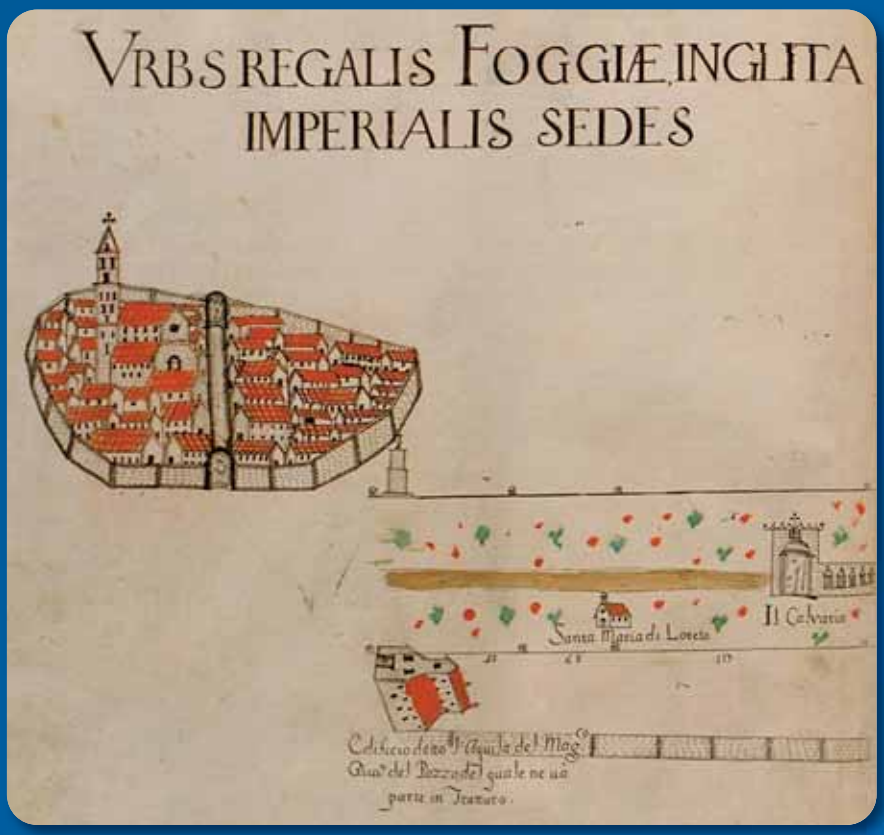
Indicizzato su CAB ABSTRACTS e GLOBAL HEALTH

SUPPLEMENTO 1 AL N. 4 - AGOSTO 2014 DELLA RIVISTA LARGE ANIMAL REVIEW - POSTE ITALIANE SPA - SPEDIZIONE IN A.P. - D.L. 353/2003 (CONV. IN L. 27/02/2004 N. 46) ART. 1, COMMA 1, DCB PIACENZA

XXI CONGRESSO NAZIONALE S.I.P.A.O.C.

Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli Ovini e dei Caprini

9/12 settembre 2014 - Foggia



Relazioni delle Tavole Rotonde,
dei Workshop e dei Mini Simposi
Comunicazioni Scientifiche - Poster

sivar
SOCIETÀ ITALIANA VETERINARI PER ANIMALI DA REDDITO
ASSOCIAZIONE FEDERATA ANMVI

CON IL PATROCINIO DI

Regione Puglia

Provincia di Foggia

Comune di Foggia

Università di Foggia

izs istituto zooprofilattico sperimentale della puglia e della basilicata

Ministero dei beni e delle attività culturali e del turismo
Direzione Regionale per i Beni Culturali e Paesaggistici della Puglia
Archivio di Stato di Foggia

FNOVI

Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva

SIVELP

SOIPA
Società Italiana di Parassitologia

Siamo lieti di comunicarVi che Il Comitato Scientifico Internazionale per EXPO 2015, presa visione del contenuto scientifico del XXI Congresso SIPAOC, ha concesso il patrocinio e l'utilizzo del logo per l'elevato valore scientifico e rientrante a pieno titolo tra i temi di EXPO Milano 2015
"Nutrire il pianeta – Energia per la vita".

LE UNIVERSITÀ PER EXPO 2015
COMITATO SCIENTIFICO DEL COMUNE DI MILANO

Il Comitato organizzatore e scientifico del XXI Congresso Nazionale SIPAOC e il Consiglio Direttivo desiderano esprimere uno speciale ringraziamento ai seguenti Sponsor per il loro supporto:

Bayer HealthCare Animal Health

Elanco

MERIAL A SANOFI COMPANY

MSD Animal Health

QIAGEN

zoetis

e inoltre

Regione Puglia
Progetto realizzato con il contributo della Regione Puglia
Area Politiche per lo Sviluppo Rurale

Comune di Foggia

BIO-RAD

lab Laboratorio di Analisi Bonassisa

FONDAZIONE BANCA DEL MONTE Domenico Siniscalco Ceci

Fondazione Cassa di Risparmio di Puglia

CREMOPAR

izs istituto zooprofilattico sperimentale della puglia e della basilicata

Levanchimica BARI s.r.l.

UnipolSai ASSICURAZIONI Divisione Unipol

Agenzia Generale Foggia COLUCCI GIANCARLO
Piazza Caduti sul Lavoro 7, Foggia
Tel e Fax: 0881.722357/723029
E-mail: foggia.uno1928@agenzia.unipolsai.it

Università di Foggia
Dipartimento Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente

Segreteria Organizzativa

Kassiopea group

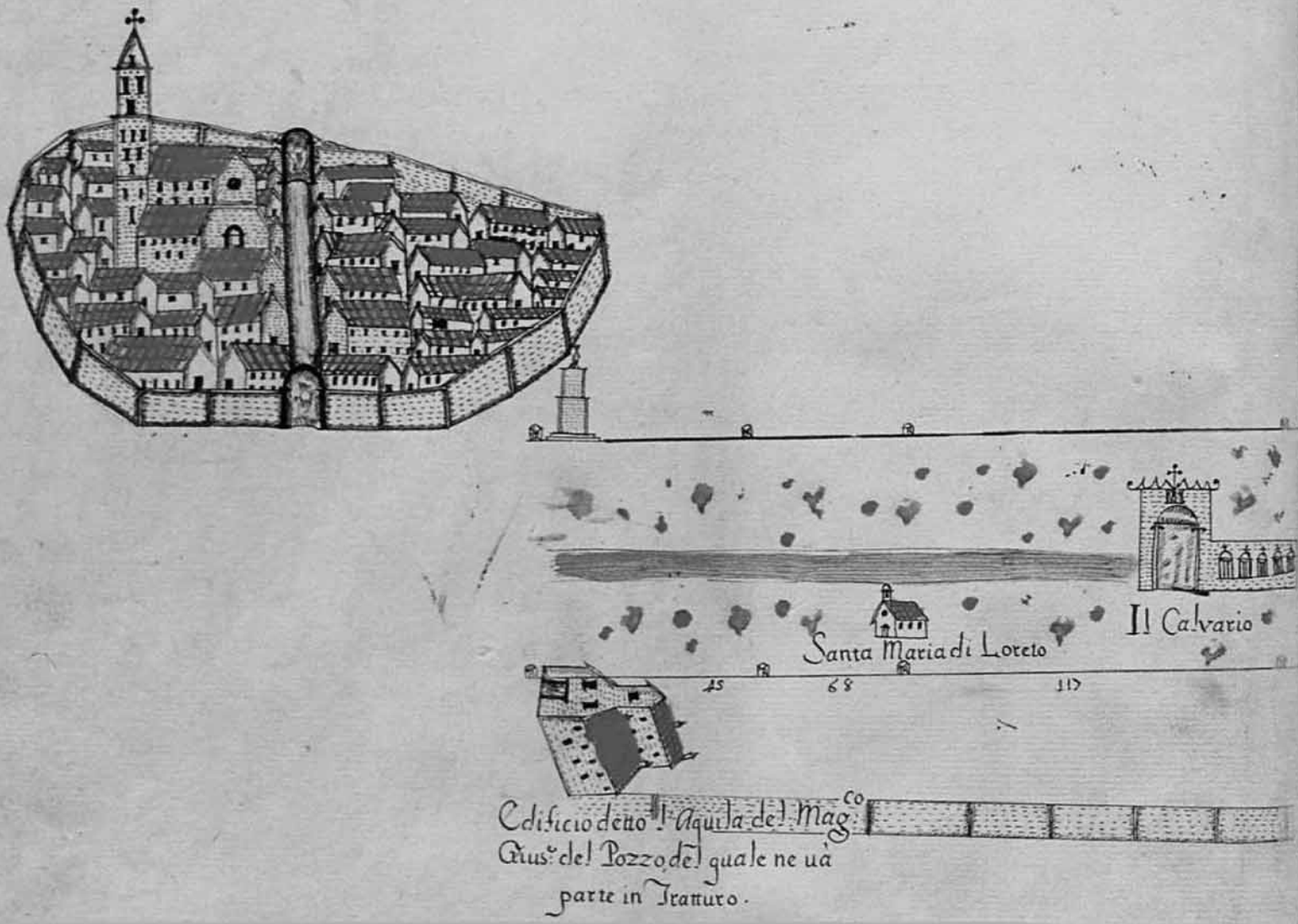
Via Stamira 10 - 09134 Cagliari
Tel. 070651242 Fax 070656263
E-mail: domizianamessina@kassiopeagroup.com
www.kassiopeagroup.com

Università di Foggia

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

izs
istituto zooprofilattico sperimentale
della puglia e della basilicata

VRBS REGALIS FOGGIÆ INCLITA IMPERIALIS SEDES



Carta di Foggia con prima parte del Tratturo Foggia-L'Aquila (XVIII secolo, Archivio di Stato)

XXI Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli Ovini e dei Caprini S.I.P.A.O.C.

9-12 Settembre 2014

SEDE DEL CONGRESSO
Università di Foggia
Dipartimento di Economia – IRIIP
Via Caggese 1 - Foggia

COMITATO ORGANIZZATORE
Presidente
Annunziata Giangaspero

Membri
Marzia Albenzio - Giovanni Annicchiarico
Giovanni Cappiello - Cristoforo Carrino
Barbara Consenti - Francesca D'Angelo
Francesco Fini - Luigi Lepri
Riccardo Lia - Stefania Losito
Marianna Marangi - Cosimo Montagna
Antonio Pepe - Sergio Pompa
Vincenzo Quaranta - Michele Schiavone
Agostino Sevi

COMITATO SCIENTIFICO
Presidente
Agostino Sevi

Membri
Marzia Albenzio
Canio Buonavoglia
Maria Assunta Cafiero
Mariangela Caroprese
Antonello Carta
Pasquale Centoducati
Doriano Chiocco
Dario Cianci
Barbara Consenti
Giuseppe Cringoli
Angela D'Alessandro
Floro De Nardo
Zaccaria Di Taranto
Antonio Fasanella
Vincenzo Fedele
Giovanni Filippini
Giovanni Garippa
Annunziata Giangaspero
Antonio Girolami
Rosaria Marino
Giuseppe Moniello
Giovanna La Salandra
Stefania Losito
Laura Latorre
Vincenzo Di Marco Lo Presti
Maria Teresa Manfredi
Massimo Trabalza Marinucci
Marilena Muscarella
Antonio Muscio
Fabio Napolitano
Valeria Nardelli
Giovanni Normanno
Domenico Otranto
Antonio Parisi
Elisa Pieragostini
Vezio Puccini
Bruno Ronchi
Pietro Salcuni
Antonella Santillo
Domenico Scaltrito
Donato Traversa
Pasquale Troiano
Angelo Visconti

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

SEGRETERIE DEL CONGRESSO
Segreteria Scientifica - E-mail: sipaoc2014@unifg.it

Marzia Albenzio, Annunziata Giangaspero
Dipartimento SAFE, Università di Foggia
Via Napoli 25, 71121 Foggia
Tel. 0881 589227/327
Fax 0881 589308 - www.unifg.it

Barbara Consenti - Stefania Losito
Istituto Zooprofilattico della Puglia e Basilicata
Via Manfredonia 20, 71121 Foggia
Tel. 0881 786347/315/327
Fax 0881 786363 - www.izsfg.it

Segreteria Organizzativa
Kassiopea Group srl
Via Stamira, 10 - 09134 Cagliari
Tel. 070 651242 - Fax 070 656263
e-mail: domizianamessina@kassiopeagroup.com
www.kassiopeagroup.com

Introduzione

Il Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, dell'Università di Foggia e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata sono lieti di ospitare, per la prima volta nella città di Foggia, il XXI Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli Ovini e Caprini (S.I.P.A.O.C.).
La scelta della città di Foggia, quale sede del XXI Congresso, rappresenta un riconoscimento alle significative tradizioni di ricerca della Capitanata sulle tematiche legate alla Zootecnia e alla Sanità dei piccoli ruminanti, grazie non soltanto alla presenza dell'Università e dell'Istituto Zooprofilattico, ma anche dell'Unità di Ricerca per la Zootecnia Estensiva del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, nonché all'articolato panorama di imprese zootecniche e di qualificati professionisti.
Tali aspetti, unitamente alle ricche e consolidate tradizioni storiche legate ai tratturi, alla transumanza, agli archivi storici e ai documenti archeologici, fanno della Capitanata la cornice ideale per ospitare l'evento.

Il XXI Congresso SIPAOC si articola in 11 eventi tra Tavole Rotonde, Workshop e Mini Simposi, e 8 sessioni scientifiche su argomenti di Sanità e Zootecnia.
Il presente Volume raccoglie le Relazioni dei seguenti Eventi:

1. *Contributo dell'allevamento ovino e caprino all'emissione di gas serra ed effetti del cambiamento climatico sulle produzioni e sulla salute in ambiente Mediterraneo*
2. *Proprietà dietetico-nutrizionali dei prodotti ovi-caprini ed effetto sulla salute umana*
3. *Aborti e malattie neonatali: nuovi aspetti di vecchie conoscenze*
4. *"L'ambiente che non c'è". Quale zootecnia nei siti industriali e nei vari SIN del nostro Paese? Il caso di Taranto e non solo...*
5. *Le nuove frontiere per lo studio delle patologie emergenti: tra genomica e proteomica*
6. *Malattie infettive e parassitarie e il paradigma della One Health*
7. *Strongilosi gastro-intestinali degli ovini e caprini e le nuove minacce*
8. *Monitoraggio del benessere nelle aziende ovine e caprine*
9. *La valorizzazione delle lane autoctone: allevatori ed esperti a confronto*
10. *La coccidiosi negli ovini in Italia: strategie di controllo e cura*
11. *Nuovi obiettivi e strumenti per la selezione degli ovini e caprini alla luce della nuova PAC e dello sviluppo delle scienze "omiche"*

Il Volume contiene inoltre gli Abstract di 59 Comunicazioni orali e 46 Poster.

Desideriamo ringraziare il Presidente e il Comitato Direttivo della SIVAR e il Direttore di *Large Animal Review* (*LAR*) per aver reso possibile, anche per questa edizione, la pubblicazione del presente Volume sotto forma di supplemento della prestigiosa rivista *LAR* (Supplemento 1 al n. 4 - Agosto 2014) e indicizzato su CAB abstract e GLOBAL HEALTH: si consente in tal modo ai 143 contributi scientifici, sia Relazioni a Tavole Rotonde, Workshop e Mini Simposi (38), sia abstract di Comunicazioni orali e Poster (105), qui editi, di godere di una visibilità anche internazionale.

Desideriamo, infine, porgere i nostri ringraziamenti a tutti i componenti del Consiglio Direttivo SIPAOC, per il loro invito ad organizzare nella città di Foggia il XXI Congresso SIPAOC e per il loro costante supporto nelle diverse fasi organizzative, tutti i membri del Comitato organizzatore e scientifico, e infine gli Enti, le Fondazioni e le Aziende che, in diversa maniera, hanno contribuito all'organizzazione di questo importante Evento.

Foggia, 9 Settembre 2014

I Presidenti del Comitato SIPAOC 2014
Prof.ssa Annunziata Giangaspero, Prof. Agostino Sevi

Indice

TAVOLE ROTONDE

Contributo dell'allevamento ovino e caprino all'emissione di gas serra ed effetti del cambiamento climatico sulle produzioni e sulla salute in ambiente Mediterraneo

Small ruminant greenhouse gas emissions, with broaden focus on Italian sheep and goats
A.S. ATZORI, G. PULINA, A. CANNAS 2

Greenhouse gases emissions in sheep: mitigation strategies
F. PILLA, M. D'ANDREA 6

Climatic changes and geospatial health
L. RINALDI, P. PEPE, G. CRINGOLI 9

Schmallenberg virus (SBV): un patogeno emergente?
G. IOVANE, U. PAGNINI 11

Proprietà dietetico-nutrizionali dei prodotti ovi-caprini ed effetto sulla salute umana

Ruolo dei grassi nella dieta e le modificazioni del metabolismo lipidico ed energetico in modelli sperimentali e nell'uomo
S. BANNI, A. SIRIGU, D. DEMURTAS, S. LISAI, L. MUREDDA, E. MURRU, G. CARTA 16

Influenza dell'alimentazione sul miglioramento delle caratteristiche nutraceutiche dei prodotti ovini (latte, carne)
A. NUDDA, G. PULINA 20

Polimorfismi genetici lattoproteici caprini e ovini ed effetti sulla qualità del latte
S. CHESSA, A.M. CAROLI 23

Alimentazione animale e qualità del latte di capra
M. AVONDO 28

Aborti e malattie neonatali: nuovi aspetti di vecchie conoscenze

Aggiornamenti sulle infezioni protozoarie causa di aborto negli ovicaprini in Italia
D. PIERGILI FIORETTI, M.T. MANFREDI 32

Aborti e natimortalità di origine batterica e parassitaria nei piccoli ruminanti: esperienze diagnostiche nel Lazio e nella Toscana
A. CAPRIOLI, A. BATTISTI, A. FRANCO 36

"L'ambiente che non c'è". Quale zootecnia nei siti industriali e nei vari SIN del nostro Paese? Il caso di Taranto e non solo...

Gli ovini quali bioindicatori della contaminazione ambientale da diossine e policlorobifenili
M. AMORENA, G. DI MAIO 40

Standard di qualità ambientale a garanzia della sicurezza e dell'accesso alla risorsa alimentare
G. BRAMBILLA 42

Impatto delle deposizioni atmosferiche totali di contaminanti organici persistenti in aree ad elevata densità industriale
V. ESPOSITO, A. MAFFEI, V. ROSITO, R. GIUA, M. BLONDA, G. ASSENNATO 43

Livelli di contaminazione da diossine, policlorobifenili e metalli pesanti del latte ovino proveniente dal SIN di Porto Torres
G. CHESSA 46

Monitoraggio delle produzioni zootecniche in Campania: dai SIN alla Terra dei Fuochi
M. ESPOSITO 47

Le nuove frontiere per lo studio delle patologie emergenti: tra genomica e proteomica

MALDI-TOF MS: the new frontier for the diagnosis and epidemiological surveys on bacterial agents
H. TOMASO, A. KARGER 52

MLST e MLVA-16 come strumenti di epidemiologia molecolare per la brucellosi in Italia
M. ANCORA, G. GAROFOLO 54

Genomic and immunoproteomic approaches for the studies of vector-borne pathogens
D. SASSERA 56

Nuovi obiettivi e strumenti per la selezione degli ovini e caprini alla luce della nuova PAC e dello sviluppo delle scienze "omiche"

Politiche per lo sviluppo rurale 2014-2020. La programmazione in Puglia
P. PALLARA, G. VALENTINO 218

Nuovi obiettivi di selezione e scenari di riferimento
GIULIO PAGNACCO 220

Le tecnologie a supporto delle scienze "omiche"
E. CIANI 223

L'importanza delle attività dell'Asso.Na.Pa. nel settore ovi-caprino nazionale
R. NEGRINI 227

Malattie infettive e parassitarie e il paradigma della One Health

Paratubercolosi: un problema di sanità pubblica?
C. GARBARINO, G. CAMMI, M. RICCHI, R. SAVI, S. PONGOLINI, N. ARRIGONI 58

Il viroma degli ovi-caprini: aspetti zoonosici
V. MARTELLA, N. DECARO, C. BUONAVOGLIA 62

Il corretto approccio diagnostico alle principali malattie a carattere zoonotico degli ovini e dei caprini
N. D'AVINO, A. BOSCO 67

WORKSHOP

Strongilosi gastro-intestinali degli ovini e caprini e le nuove minacce

Gli strongili gastro-intestinali delle pecore: cosa sono, cosa fanno e quanti ne abbiamo
A. SCALA 70

Anthelmintic resistance: facing the torea
G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA 74

La farmaco-resistenza in Italia: quale realtà?
D. TRAVERSA 76

Strongilosi gastrointestinali degli ovini: impatto economico e strategie di controllo
G. CRINGOLI, A. BOSCO, L. RINALDI 78

Approccio integrato Zoetis al controllo delle parassitosi ovine, per un impiego razionale del farmaco
V. SALAMINA, L. MIOTTO, F. TONI 80

Monitoraggio del benessere nelle aziende ovine e caprine

EU strategy on animal welfare: the role of EFSA
O. RIBÓ 82

Sheep welfare assessment: from compliance with pre-defined standards to welfare management tools
F. NAPOLITANO 86

Un protocollo per la valutazione del benessere nella capra: i risultati del progetto AWIN
S. MATTIELLO, M. BATTINI, S. BARBIERI, A. VIEIRA, G. STILWELL, E. CANALI, A. ZANELLA 90

Welfare considerations and dilemmas in small ruminant emergency medicine
G.C. FTHENAKIS 94

La valorizzazione delle lane autoctone: allevatori ed esperti a confronto

Percorsi di innovazione per valorizzare le lane e i colori del Mediterraneo. Il progetto MED-Laine/MED-L@ine
E. VAGNONI, E. CAMPUS, F. CAMILLI, P. DUCE 96

Progetto Lane AUTOctone (Plauto)
C. CARRINO, E. CIANI, N. DIBENEDETTO, E. PIERAGOSTINI 100

Progetto "PartnerSheep" nell'Area del Parco Nazionale dell'Alta Murgia
N. DIBENEDETTO, P. DIRENZO, F. MODESTI, C. MATTIA, A. DIBENEDETTO, E. PIERAGOSTINI 103

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Aborti da ceppo atipico di Border Disease in un gregge ovino siciliano
B. AMATO, M.T. CAPUCCHIO, S.A. MIGNACCA, S. AGNELLO, A. ATANASIO, M. SCIUTO, G. PURPARI, V. DI MARCO LO PRESTI, M. VITALE, A. GUERCIO 108

Tre casi di adenocarcinoma intestinale nell'ovino: rilievi clinici e anatomo-istopatologici
B. AMATO, M.T. CAPUCCHIO, S.A. MIGNACCA, V. ARONICA, A. LENA, G. GUARNERI, S. ANTOCI, M. FIASCONARO, V. DI MARCO LO PRESTI 109

Effetto della quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) sul profilo aromatico e acidico del latte di pecora
G. ANNICCHIARICO, S. CLAPS, G. DE SANTIS, T. D'AMBROSIO, A. BRUNO, M.A. DI NAPOLI, A.R. CAPUTO, L. SEPE 110

Sarcocystis sp. e *Toxoplasma gondii:* prevalenza, isolamento in vitro e identificazione con Polymerase Chain Reaction in ovini di razza Cornigliese
C. BACCI, A. VISMARRA, F. SCIARRONE, M. GENCHI, M. FABBI, E. LANZONI, F. BRINDANI, L. KRAMER 111

Forma acuta letale da *Cysticercus tenuicollis:* case report in agnelli di razza sarda in Italia
E. BANDINO, G. URRAI, P. NICOLUSSI, M. MULAS, L. GODDI, G. SANNA, A. VARCASIA, A. SCALA 112

Caratterizzazione molecolare di *Staphylococcus aureus* isolato da prodotti lattiero caseari ovicaprini provenienti dalla provincia di Foggia
M.G. BASANISI, G. NOBILI, G. LA BELLA, R. RUSSO, G. SPANO, G. NORMANNO, G. LA SALANDRA 113

Un protocollo per la valutazione del benessere nella capra: risultati della consultazione con le Parti Sociali in Italia
M. BATTINI, S. BARBIERI, L. FERRARI, G. BRUNI, G. ZANATTA, E. CANALI, S. MATTIELLO 114

Risultati preliminari dell'uso di vaccini stabulogeni per il controllo della "malattia degli ascessi" in allevamenti di capre da latte del Nord Italia
F. BENCETTI, G. PEDRINI, A. GAFFURI, N. MARTINELLI, G. LOMBARDI 115

Razza ovina Sopravissana: composizione e qualità tecnologica del latte nel corso della lattazione
C. BOSELLI, M.C. CAMPAGNA, P. DELFINI, L. BIANCHI, F. FILIPPETTI, G. GIACINTI, G. GIANGOLINI, S. AMATISTE, R. ROSATI 116

Studio delle relazioni uomo-animale nella specie caprina
A. BRAGAGLIO, M. SERRAPICA, F. NAPOLITANO, A. GIROLAMI, C. PACELLI, G. DE ROSA, A. BRAGHIERI 117

Metastasi di adenocarcinoma polmonare nelle pecore: esperienze personali
M.T. CAPUCCHIO, B. AMATO, E. BIASIBETTI, A. SAVÌ, A. LENA, F. GUARDA, S.A. MIGNACCA, V. DI MARCO LO PRESTI 118

Sorveglianza molecolare di infezioni da *Anaplasma ovis, Babesia ovis* e *Theileria ovis* in ovi-caprini siciliani
S. CARACAPPA, V. BLANDA, C. DI PASQUALE, A. TORINA 119

Valutazione del piano di selezione per la resistenza alla Scrapie negli ovini da latte di razza Sarda
A. CARTA, F. INGRAVALLE, A. PERNISA, L. CRASTA, A. FRAGHÌ, C. LIGIOS, S. MURRU, G. RU, S. SALARIS 120

Indagine sulla presenza di *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA) nel latte di massa di allevamenti ovi-caprini della Puglia e della Basilicata: dati preliminari
M. CARUSO, L. LATORRE, G. SANTAGADA, R. FRACCALVIERI, A. MICCOLUPO, R. SOTTILI, A. PARISI 121

Programma di avvio di un piano di conservazione della popolazione ovina Altamurana: II. Alleli alfa e beta globinici quali marcatori di variabilità genetica
A. CASSONE, P. LOIZZO, E. CIANI, E. PIERAGOSTINI 122

Gli elminti in capre di razza Nicastrese nella Provincia di Catanzaro
F. CASTAGNA, S. RUSSO, F. DE NARDO, V.M. MORITTU, V. MUSELLA, D. BRITTI 123

Identificazione di regioni del genoma ovino che modulano la variabilità della composizione acidica del grasso del latte nella razza Sarda
S. CASU, M.G. USAI, S. MIARI, T. SECHI, S. SECHI, A. CARTA 124

Regolazione del sistema endocrino ed immunitario in pecore in lattazione soggette a stress termico supplementate con acidi grassi polinsaturi
M.G. CILIBERTI, G. ANNICCHIARICO, M. ALBENZIO, A. SANTILLO, R. MARINO, A. SEVI, M. CAROPRESE 125

Performance di accrescimento e caratteristiche della carne in capretti alimentati con una dieta integrata con polifenoli
R. CIMMINO, C.M.A. BARONE, R. DI MATTEO, F. RUSSO, A. BALESTRIERI, E. VARRICCHIO, F. IANNACCONE, G. NEGLIA 126

Valutazione dell'effetto degli oli di *Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis* e *Cynara cardunculus* sulla produzione di gas ruminali in sistemi in vitro
G. COBELLIS, A. PETROZZI, C. FORTE, A. AQUINO, F. COTANA, M. TRABALZA MARINUCCI 127

EMIDA ERA-NET: la ricerca europea a supporto dell'allevamento caprino
S. COLUSSI, G. VACCARI, B. CHIAPPINI, R. NONNO, M.A. DI BARI, C. LIGIOS, C. MAESTRALE, C. SOLINAS, M. VITALE, S. MIGLIORE, S. TRISORIO, P. MODESTO, I. PERNAZZA, M.G. PERROTTA, P.L. ACUTIS 128

Studio preliminare del microbiota ruminale caprino mediante tecnologia Next Generation Sequencing
P. CREMONESI, E. CAPRA, F. TURRI, S. CHESSA, S. COLOMBINI, L. RAPETTI, B. CASTIGLIONI 129

Variabilità del DNA mitocondriale nella popolazione ovina "Rocche del Crasto"
A. CRISCIONE, V. MOLTISANTI, L. CHIES, M. AVONDO, D. MARLETTA, S. BORDONARO 130

Identificazione di larve di nematodi broncopolmonari in ovini e caprini siciliani
V. CURRÒ, D. VICARI, R. DISCLAFANI, S. MARINEO, A. PIAZZA, E. LA CAVERA, S. CARACAPPA 131

Monitoraggio delle variazioni del β-idrossibutirrato ematico durante la gravidanza in ovini da latte
G.L. D'ALTERIO, E. SCOCCIA, G. FILIPPINI, L. MOSCATI, C. MARESCA 132

Valutazione dei livelli contaminazione da radionuclidi beta emettitori (^{90}Sr) in campioni di latte e prodotti lattiero-caseari di origine ovina e caprina
D. DELL'ORO, M. IAMMARINO, N. BORTONE, M. MANGIACOTTI, A.E. CHIARAVALLE 133

Correlazione tra età di macellazione, qualità nutrizionale ed organolettica in carne di agnelli di razza Altamurana
A. DELLA MALVA, M. ALBENZIO, G. ANNICCHIARICO, M. CAROPRESE, A. MUSCIO, A. SANTILLO, R. MARINO 134

Health management of ewes during pregnancy
G.C. FTHENAKIS, G. ARSENOS, C. BROZOS, I.A. FRAGKOU, N.D. GIADINIS, I. GIANNENAS, V.S. MAVROGIANNI, E. PAPADOPOULOS, I. VALASI 135

Dinamica dell'infestazione da *Przhevalskiana silenus* (Diptera: Oestridae) in caprini della provincia di Messina
G. GAGLIO, M.C. FERRARA, L. FALSONE, E. NAPOLI, C. BARTOLONE, A. SCALA, S. GIANNETTO 136

Casi di mastite da *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in allevamenti caprini siciliani
L. GALUPPO, M.C. EMANULE, M.F. PERSICHETTI, D. GAMBINO, G. CARACAPPA, R.C. LELLI 137

Studio di sieroprevalenza di *Neospora caninum* in aziende ovicaprine in Lombardia
A.L. GAZZONIS, S.A. ZANZANI, G. ALVAREZ-GARCIA, L. ORTEGA-MORA, M.T. MANFREDI 138

Trasferimento di aflatossina M_1 dal latte al formaggio ovino
G. GIANGOLINI, C. BOSELLI, F. FILIPPETTI, A. PROIETTI, R. BICOCCHI, S. AMATISTE 139

La situazione attuale del miglioramento genetico negli ovini da carne in Italia
E. LASAGNA, G. SLEITER, F.M. SARTI, F. PANELLA 140

Effetto della stagione e dell'incremento della densità di allevamento in ovine in lattazione allevate a regime semi-estensivo
A. MAGGIOLINO, P. DE PALO, P. CENTODUCATI, A. TATEO 141

Comportamento alimentare di pecore da latte di razza Sarda e Nera di Arbus sottoposte a due sistemi di allevamento
C. MANCA, G.M. MARROSU, M. ACCIARO, M. SITZIA, M. DECANDIA 142

Origine degli isolati di *Wohlfahrtia magnifica* in Italia
M. MARANGI, G. GAGLIO, P.D. READY, M.J.R. HALL, A. GIANGASPERO 143

MiniFLOTAC technique: un nuovo approccio per la diagnosi di *Eimeria* spp. nelle capre
M.P. MAURELLI, L.M.R. SILVA, M.J.M. VILA-VICOSA, H.C.E. CORTES, A. BOSCO, P. PEPE, V. MUSELLA, G. CRINGOLI, L. RINALDI 144

Elementi in traccia in campioni di latte ovini e caprini prelevati nelle regioni Puglia e Basilicata: valutazione dei dati mediante analisi multivariata
O. MIEDICO, M. TARALLO, C. POMPA, A.E. CHIARAVALLE 145

Screening di espressione di recettori purinergici P2X in monociti ovini
S. MUZZACHI, A. CAPOGNA, L. GUERRA, E. PIERAGOSTINI, E. CIANI 146

Casi di carcinoma a cellule squamose e papilloma squamoso in ovini della Regione Basilicata: indagini istologiche e di immunocaratterizzazione
S. PAVONE, C. LORENZETTI, D. CRUCIANI, S. BROCCATELLI, M. GARAGUSO, G. PRESTERA, G. FILIPPINI 147

Utilizzo di inulina nella produzione di un formaggio fresco da latte di capra
A. PIRISI, E. SALVATORE, S. FURESI, M. PES. 148

Studio preliminare sull'effetto residuo di un pascolamento razionato in pecore sottoposte a effetto maschio e flushing con lupino
C. PORCU, A. RODRIGUEZ, M. DATTENA, M. GALLUS, S. PILICHI, G. MOLLE 149

Diagnosi di *Coxiella burnetii:* sviluppo di un nuovo saggio LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)
D.A. RAELE, D. GALANTE, G. MANCINI, N. CAVALIERE, M.A. CAFIERO 150

Aspetti microbiologici del formaggio prodotto con latte crudo di capra Nicastrese. Osservazioni preliminari
C. RANDAZZO, L. LIOTTA, F. DE NARDO, A. PINO, C. CAGGIA 151

Stima dell'ereditabilità e della correlazione genetica con la produzione del latte di misure della persistenza della lattazione in ovini di razza Sarda
S. SALARIS, S. CASU, S. SECHI, M.G. USAI, A. CARTA 152

Determinazione della vitalità del *Mycoplasma agalactiae* in campioni di latte ovino mediante immunocattura
G. SANNA, G. CILLARA, N.M. ROSA, C. LONGHEU, M. FUSCO, M.G. MANCA, S. TOLA 153

Episodi di aborti e nati-mortalità associati ad infezione da *Coxiella burnetii* in un allevamento caprino: gestione sanitaria del caso
G. SARALLI, G. BRUNI, T. GALLI, A. GIOIA, M. VELLUCCI, M.R. CECCARELLI, A. FAGIOLO 154

La paratubercolosi negli ovini e caprini: I. Prolegomeni allo studio delle cause predisponenti a questa malattia
R. SARDARO, L. CASOLI, A. CONTE, N. DIBENEDETTO, A. MICCOLIS, A. BATTISTA, D. SCALTRITO, F. PETAZZI 155

Ulteriori acquisizioni sull'influenza dei nematodi gastro-intestinali sulla fertilità delle pecore
A. SCALA, A. SPEZZIGU 156

Valutazione dell'efficacia del toltrazuril e del diclazuril nel controllo dell'eimeriosi subclinica in agnelli svezzati di razza sarda
A. SCALA, P.P. MULA, G. SANNA, C. SOLINAS, F. DORE, A.P. PIPIA, G. SOTGIU, L. NISOLI, A. CARTA, A. VARCASIA 157

Il caglio in pasta utilizzato per la produzione di formaggi tradizionali siciliani: indagine microbiologica
M.L. SCATASSA, I. MANCUSO, L. ARCURI, A. PARCO, M. CRUCIATA, M. TODARO, C. CARDAMONE 158

Aborto Enzootico: Indagine molecolare in aborti ovini e caprini di 13 regioni italiane
M. SEBASTIANELLI, F. CIUTI, A. MANFREDINI, N. VICARI, M. GOBBI, N. D'AVINO, M. FABBI, G. FILIPPINI 159

Sequenziamento di nuova generazione del genoma ovino per l'identificazione di mutazioni causative per caratteri di interesse economico
T. SECHI, S. CASU, B. LAZZARI, M.G. USAI, S. SECHI, R. GIANNICO, S. MIARI, A. STELLA, A. CARTA 160

Valutazione qualitativa e dinamica del comportamento caprino
M. SERRAPICA, A. BRAGHIERI, A.M. RIVIEZZI, D. RUFRANO, E. SABIA, F. NAPOLITANO 161

Relazione tra peso corporeo, caratteri sessuali secondari e qualità di spermatozoi epididimali in becchi di razza Camosciata delle Alpi
F. TURRI, M. MADEDDU, T.M. GLIOZZI, G. GANDINI, F. PIZZI 162

Effetto dell'orario di pascolamento sulle performance produttive e sulla qualità della carne di agnello
B. VALENTI, A. PRIOLO, G. LUCIANO, L. BIONDI, M. SCERRA, R.I. PAGANO, M. LANZA, M. AVONDO 163

Valutazione del benessere e dello stato metabolico di pecore in allevamenti siciliani
I. VAZZANA, S. GIAMBELLUCA, S.A. MIGNACCA, T. OREFICE, M. GIANESELLA, M. MORGANTE, S. DARA 164

Effetto dell'integrazione alimentare dell'estratto di *Lippia citriodora* su alcuni parametri ematici e sulle performance produttive di agnelli di razza Lacaune allattati naturalmente
F. VIZZARRI, C. CORINO, M. PALAZZO, M. NARDOIA, D. CASAMASSIMA 165

Impiego di *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* in capre Cilentane allevate al pascolo: effetti sulla produzione quanti-qualitativa di latte
F. ZICARELLI, L. ADDI, R. TUDISCO, S. CALABRÒ, P. LOMBARDI, M.I. CUTRIGNELLI, G. MONIELLO, M. GROSSI, N. MUSCO, F. INFASCELLI 166

SESSIONE POSTER

La selezione genetica per la resistenza alla scrapie a tutela della capra *Girgentana* e della biodiversità
S. AGNELLO, S. MIGLIORE, S. MIGNACCA, F. DI PAOLA, V. DI MARCO LO PRESTI, M. VITALE 168

Effetto del contenuto in cellule somatiche sull'attività degli enzimi proteolitici endogeni nel latte ovino
M. ALBENZIO, A. SANTILLO, M. CAROPRESE, D. RUGGIERI, R. MARINO, A. SEVI 169

Analisi di campioni di latte per la ricerca di Aflatossina M_1 mediante metodo analitico di conferma HPLC/FLD
A. ARMENTANO, S. SUMMA, M. MUSCARELLA 170

Effetto dell'integrazione della dieta di pecore con *Rosmarinus officinalis* sullo stato ossidativo del formaggio Pecorino durante la stagionatura
R. BRANCIARI, C. FORTE, M. TRABALZA MARINUCCI, D. RANUCCI, M. ORRU, M. CODINI, R. ORTENZI, D. MIRAGLIA, A. VALIANI 171

Identificazione e localizzazione immunoistochimica della leptina e del suo recettore nell'apparato digerente del cervo
C. DALL'AGLIO, L. PASCUCCI, P. SCOCCO, F. MERCATI, P. CECCARELLI 172

Effetto degli Acidi Umici sull'infettività della Scrapie valutata sperimentalmente in un gruppo di agnelli: risultati preliminari
N. D'AVINO, G. FILIPPINI, M. BIAGETTI, M. CIULLO, G. PEZZOTTI, E. MANUALI, S. PAVONE, M. PANICCIÀ, G. GIACHIN, O. ANDREOLETTI, G. LEGNAME, L. LEITA 173

Caratteri tipici della capra Nicastrese
F. DE NARDO 174

Profilo descrittivo della Capra dell'Aspromonte
F. DE NARDO 175

Aspetti morfo-funzionali della capra Rustica di Calabria
F. DE NARDO 176

Programma di avvio di un piano di conservazione della popolazione ovina Altamurana: I. Indagine demografica e sanitaria della popolazione
N. DIBENEDETTO, A. CAPOGNA, P. DIRENZO, E. PIERAGOSTINI 177

Effetto del genotipo al locus CSN1S1 e della dieta sul contenuto di alcuni oligosaccaridi nel latte di capra
A. DI TRANA, M.A. DI NAPOLI, P. DI GREGORIO, S. CLAPS, D. GIORGIO 178

Effetti genetici dell'αs1-caseina caprina sulla resa casearia
S. FRATTINI, B. COIZET, L. NICOLOSO, L. RAPETTI, S. CHESSA, A. TALENTI, G. PAGNACCO, P. CREPALDI 179

Diagnosi microscopica e caratterizzazione genetica di *Parapoxvirus* rilevati in focolai di Ectima contagioso in Italia meridionale (Puglia e Basilicata): risultati preliminari
D. GALANTE, G. MANCINI, D. RAELE, N. CAVALIERE, D. CHIOCCO, M.A. CAFIERO 180

Nuove evidenze sulla diffusione di *Wohlfahrtia magnifica* negli ovini in Italia
A. GIANGASPERO, E. BRIANTI, D. TRAVERSA, M. MARANGI, F. BERTANI, M.J.R. HALL 181

Theileria sp. OT3 e altri agenti patogeni trasmessi da zecche negli ovini e nelle zecche in Italia: caratterizzazione molecolare e analisi filogenetica
A. GIANGASPERO, M. MARANGI, R. PAPINI, B. PAOLETTI, M. WIJNVELD, F. JONGEJAN 182

Performance produttive di agnelli Gentile di Puglia alimentati con diete contenenti sottoprodotti dell'industria molitoria del grano duro
F. GIANNICO, M.A. COLONNA, M. RAGNI, P. CAGNETTA, A.M. RUSSO, A. CAPUTI JAMBRENGHI 183

Valutazione degli indicatori di benessere in un gregge di ovini di razza Massese
M. GOBBI, G. FILIPPINI, E. SCOCCIA, M. TENTELLINI, S. BOTO, A. ANTOLINI, M. CUGUSI, C. MARESCA, L. MOSCATI 184

Improvement of reproductive efficiency in sohagi ewes using different hormones
H. HAMDON, D.R. DERAR 185

Effetto della dose di energia nell'irraggiamento con He-Ne laser sulla qualità e carica energetica di spermatozoi crioconservati di ariete
N. IAFFALDANO, M. DI IORIO, G. PAVENTI, R. PIZZUTO, S. PASSARELLA, A. MANCHISI 186

Performance di accrescimento in capretti sottoposti ad una nuova tecnica di svezzamento
F. IANNACCONE, A. BALESTRIERI, R. CIMMINO, A. SALZANO, F. RUSSO, C. AMENDOLA, G. BIFULCO, G. CAMPANILE 187

Identificazione delle frazioni caseiniche caprine mediante uno studio elettroforetico multidimensionale
B. LA GATTA, A. DI LUCCIA 188

La paratubercolosi negli ovini e caprini: II. Elettroforesi bidimensionale del proteoma di ovini sierologicamente positivi e negativi
P. LOIZZO, A. CASSONE, S. WEIGL, E. CIANI 189

Sierodiagnosi di *Coxiella burnetii* in fase acuta: problematiche nella messa a punto di un ELISA per il dosaggio delle IgM negli ovi-caprini
C. LUZZAGO, V. BORROMEO, F. RIZZO, N. VITALE, C. LO VECCHIO, L. CHIAVACCI, M.L. MANDOLA 190

Coxiella burnetii: sieroprevalenza e fattori di rischio in ovi-caprini piemontesi
M.L. MANDOLA, F. RIZZO, N. VITALE, C. LO VECCHIO, M. BALLARDINI, V. BORROMEO, L. CHIAVACCI, C. LUZZAGO 191

Latte fermentato mesofilo: effetto del genotipo di latte di capra al locus dell'alfa-s1 caseina (CSN1S1) sulla vitalità dei lattobacilli mesofili
N.P. MANGIA, M. COTTU, S. CHESSA, O. BULGARI, G. BATTACONE, A. NUDDA 192

Produzione, innocuità e utilizzo di un vaccino stabulogeno sperimentale per la profilassi delle infezioni da *Mycoplasma capricolum* sub. *capricolum* in pecore Sarde
G. MAROGNA, A. FIORI, C. LONGHEU, A. PATERNA, S. TOLA, G. SCHIANCHI 193

Effetto della supplementazione con semi di lino sul profilo metabolico della pecora Sarda
A. MARZANO, F. CORREDDU, M.F. LUNESU, P. NICOLUSSI, P. BONELLI, A. NUDDA 194

Diagnosi in vita di scrapie negli ovini: identificazione di nuovi biomarcatori mediante tecniche di proteomica
M. MAZZA, C. GUGLIELMETTI, F. MARTUCCI, M. PAGANO, S. CARRELLA, P. TROIANO, A. PETRELLA, P. MARCONI, F. PALMERINI, G. CANDIANO, A. SCALONI, C. D'AMBROSIO, P.L. ACUTIS. 195

Identificazione del recettore della leptina nella cute di pecora e bovino tramite RT-PCR ed immunoistochimica
F. MERCATI, M. MARANESI, C. DALL'AGLIO, L. PASCUCCI, P. SCOCCO, C. BOITI, P. CECCARELLI. 196

Studio preliminare sulle endoparassitosi in allevamenti ovini che praticano l'alpeggio in un'area delle Alpi Marittime
L. MIDULLA, F. ARNAUDO, M. SANTANIELLO, M.E. MORGOGLIONE, I. GUARIGLIA, I. SARALE, L. RINALDI, G. CRINGOLI, A. BOSCO 197

Sarcoma alla base del corno e polipi endonasali in una capra: possibile correlazione?
S.A. MIGNACCA, B. AMATO, S. AGNELLO, M. FIASCONARO, R. PULEIO, A. LENA, E. BIASIBETTI, M.T. CAPUCCHIO, V. DI MARCO LO PRESTI 198

Vestigia uracali nei piccoli ruminanti: indagine al mattatoio
S.A. MIGNACCA, M.T. CAPUCCHIO, B. AMATO, E. BIASIBETTI, M. RUSSO, G. NIOSI, L. SPURIA, M. VITALE, V. DI MARCO LO PRESTI, F. GUARDA. 199

Integrazione alimentare con estratto polifenolico da acque di vegetazione nella pecora da latte: effetto sulle performance produttive e stato ossidativo del siero, risultati preliminari
L. MOSCATI, M. PAUSELLI, V. ROSCINI, G. CONTE, S. URBANI, A. BUCCIONI, A. CAPPUCCI, M. MELE 200

Analisi genomica di 14 razze caprine italiane
L. NICOLOSO, F. PILLA, P. CREPALDI E ITALIAN GOAT CONSORTIUM 201

Profilo acidico del colostro di pecore di razza Sarda alimentate con lino estruso
M. ORRÙ, R. BRANCIARI, C. FORTE, G. ACUTI, L. MUGHETTI, G. COBELLIS, M. TRABALZA-MARINUCCI 202

Ricerca di *Coxiella burnetii* in latte crudo ovi-caprino: metodiche diagnostiche a confronto (risultati preliminari)
A. PETRUZZELLI, F. GUIDI, F. CIARROCCHI, E. MICCI, M. FOGLINI, A. VALIANI, G. AMAGLIANI, F. TONUCCI, P.M. MANGILI, G. BLASI. 203

Indagine sulle caratteristiche igienico-sanitarie degli allevamenti ovini della regione Marche che trasformano latte crudo
A. PETRUZZELLI, E. CARLONI, E. MICCI, M. FOGLINI, V. VETRANO, G. AMAGLIANI, F. CAVERNI, G. BRANDI, P.M. MANGILI, F. TONUCCI 204

Avvelenamento acuto da urea in un gregge di ovini: descrizione di un caso
C. PILO, M. MASCIA, G. CHESSA, B. VODRET, T. TEDDE, L. PINNA, A. CANNAS, P. NICOLUSSI, M. LICIARDI 205

Impiego del lino e dell'origano nei mangimi per agnelli Gentile di Puglia. 1. Rilievi alla macellazione e alla dissezione anatomica
M. RAGNI, S. TARRICONE, F. GIANNICO, P. CAGNETTA, F. VIZZIELLI, L. MELODIA, G. MARSICO, A. VICENTI. 206

Impiego del lino e dell'origano nei mangimi per agnelli Gentile di Puglia. 2. Caratteristiche colorimetriche, tenerezza e pH del *Longissimus dorsi*
M. RAGNI, S. TARRICONE, G. SCARPA, M.A. COLONNA, L. MELODIA, A. VICENTI, M. LACITIGNOLA, G. MARSICO 207

Effetto della diversa integrazione di concentrati sulla composizione acidica del grasso del latte in pecore di razza Sarda al pascolo
P.G. RASSU, M.G. MANCA, A. MARZANO, R. RUBATTU, A. MAZZA, A. NUDDA 208

Presenza e diffusione di zecche in allevamenti ovini e bovini in Basilicata
L. RINALDI, M.E. MORGOGLIONE, A. BOSCO, M. SANTANIELLO, I. GUARIGLIA, G. PRESTERA, G. CRINGOLI 209

Produzione di Pecorino foggiano probiotico da latte di pecora Gentile di Puglia
A. SANTILLO, M. CAROPRESE, R. MARINO, A.L. de FINIS, A. SEVI, M. ALBENZIO 210

Indagine epidemiologica sulla sieroprevalenza della paratubercolosi ovina in provincia di Latina (Regione Lazio, Italia)
G. SARALLI, M. SALA, G. BRUNI, E. CIARLA, E. CROSATO, A. MANOCCHIO, T. PEGORIN, R. TOMMASI, A. FAGIOLO 211

Piano di gestione sanitaria (PGS) per il controllo della paratubercolosi in un allevamento misto di ovini e caprini
G. SARALLI, F. GAMBERALE, G. BRUNI, T. GALLI, E. CROSATO, T. PEGORIN, R. TOMMASI, A. FAGIOLO 212

Analisi di parentela con il *50K goat SNP chip in Capra hircus*
A. TALENTI, E.L. NICOLAZZI, S. CHESSA, B. COIZET, S. FRATTINI, L. NICOLOSO, G. PAGNACCO, P. CREPALDI 213

MINI SIMPOSIO

La coccidiosi negli ovini in Italia: strategia di controllo e cura

Indagine epidemiologica sulla coccidiosi ovina. Dati preliminari sul programma ElanCOX
N. D'AVINO, Y. ABBATE, M. GOBBI, S. BROCCATELLI, E. CORDOVANI, M. SEBASTIANELLI, G. FILIPPINI 215

TAVOLA ROTONDA

Contributo dell'allevamento ovino e caprino all'emissione di gas serra ed effetti del cambiamento climatico sulle produzioni e sulla salute in ambiente Mediterraneo

Small ruminant greenhouse gas emissions, with broaden focus on Italian sheep and goats

A.S. ATZORI, G. PULINA, A. CANNAS

Sezione di Scienze Zootecniche, Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari

ABSTRACT - World population of small ruminants exceeds 2 billion of heads. Thus, they can substantially contribute to emissions of methane and other greenhouses gases (GHG). Estimates of livestock GHG emissions in Italy were carried out by using the average emission coefficients suggested by the Tier 1 of IPCC (2006). These estimates suggest that livestock contribute to 3.2% of total Italian anthropogenic emissions. Sheep and goats contributed for about 9% and 1%, respectively, to total Italian livestock GHG emissions. Recently, more detailed estimations were carried out in Italy for sheep; the emissions per unit of product were equal to 3.2 and 23.5 kg of CO_2 eq. per kg of sheep milk and meat, respectively. These values are similar to those observed for sheep production in France. On the other hand, French estimates for dairy goats suggest much higher values than those obtained with IPCC (2006). In conclusion, it appears that while available estimates for sheep are sufficiently accurate, accurate estimates of GHG emissions of the Italian goat sector are still needed.

Key words: methane, small ruminants, non-CO_2 emissions.

INTRODUCTION - Sheep and goat makes 55% of global ruminant domestic population (cattle, buffalo, sheep and goats), which in 2010 accounted for 3.612 million heads (FAO, 2012; available at www.faostat.fao.org/site/569/default). Small ruminant products constitute a relatively small share of globally-produced ruminant meat and milk, being about 17% and 4%, respectively (Opio et al., 2013). Globally goats produce 60% of the milk and 38% of the meat from small ruminants, the remaining being produced by sheep (Tab. 1; Opio et al, 2013).

Sheep and goats adapt very easily to different production conditions, from arid to humid areas and from poor extensive production systems to intensive ones. Despite their small contribution to global milk and meat output, sheep and goat farming plays a large socio-economic role in some specific economies, especially in developing countries (subsistence) or in Europe and Oceania (market trade). In particular, in the Mediterranean region the majority of sheep and all goats belong to dairy breeds, for which milk is the main product and meat is a secondary product (Gerber et al., 2013). Due to high specialization of breeds and farming systems, in Western Europe small ruminants reach higher production levels and efficiency and higher economic importance than in other temperate areas or in most developing countries (Opio et al., 2013). Italy in particular plays an important role in the small ruminant production sector, being one of the first world sheep milk producers and the top world sheep cheese exporter (FAO, 2012). In contrast, goat milk production in Italy is less important than in other European countries, such as Greece, Spain and France, even though goat milk production is continuously growing and that of sheep is declining (FAO, 2012).

IMPORTANCE OF EMISSION ESTIMATIONS - Kyoto protocol stimulated inventories of emissions of greenhouse gases (GHG) and effective actions of mitigation strategies in each production sector. Ruminant production has been identified as a significant source GHG worldwide (Opio et al., 2013). Several studies have been carried out in large and small ruminants to estimate livestock emissions and main causative factors (Zervas and Tsiplakou, 2012). GHG are usually express as CO_2 equivalents (CO_2eq) depending on their global warming potential relatively to CO_2. Then GHG are total emission per unit of time of CO_2eq or as carbon footprint, i.e. total emissions per unit of product (e.g. kg of CO_2eq/kg of milk). Entire production processes, "*from cradle to grave*", are studied with protocols of Life Cycle Assessments (LCA) have been applied to milk and meat production (Gerber et al., 2013). Their main goal is to identify production systems and technical practices which allow to use less natural resources per unit of product, reducing the food production environmental impact.

At the same time consumers are paying, day by day, more attention to environmental friendly products and the concept of environmental sustainability was included in industrial management, considering low environmental impact as an added value for products. Studies on small ruminant products also confirmed that carbon footprints and GHG estimations may be used to inform supply chain professionals about the relative impacts of different products and activities.

The packaging carbon label could act in a similar way to many other product labels, which assume that concerned consumers will preferentially purchase goods with attributes of low carbon footprint that they value (Edwards-Jones et al. 2008).

EMISSION SOURCES AND ESTIMATION APPROACHES - Ruminants GHG emissions are mainly related to methane (CH_4) from enteric fermentation, methane from manure management and to nitrous oxide (N_2O) from manure management (Opio et al., 2013). CO_2 absorption by plants and CO_2 emissions from animal respiration, manure and soils are usually not considered, intending those as accounted for in the short term by the biogenic carbon cycle.

Enteric methane is a secondary product of ruminal fermentation of feeds produced by ruminal methanogen bacteria. Its production and further elimination is considered a physiological need of ruminants, because it helps to reduce the excess of rumen hydrogen that is produced during fiber fermentation (Moss et al., 2000). However, methane represents a loss of energy for animals, which can lose from 5 to 10% of ingested gross energy due to removal of digestive CH_4 by belching and flatulence. CH_4 emissions from manure derive from anaerobic fermentation of manure organic matter during storage. It shows a large variability of climatic origin, due to the positive correlation of emissions with temperature. When manure and urine are excreted on pasture, the aerobic conditions do not allow methane production (IPCC, 2006). N_2O emission from manure deposited on pasture derive from nitrification and denitrification processes on excreted nitrogen. The represent the smallest part of total gaseous N emissions from manure, corresponding to 1% and 2% of total N gaseous compounds in liquid and solid manure, respectively. However, livestock total CO_2eq emissions are also due to emissions of N_2O and CO_2 from consumption of energy and fossils fuels from: in-farm and off-farm feed production, pesticides and fertilizers production and transport, refrigeration systems, milking operations, slaughtering, milk and/or meat processing, waste management. They of course should be accounted for a complete LCA. The International Panel on Climate Change (IPCC, 2006) defined

specific standards to estimate CH_4 an N_2O emissions from world livestock species, providing guidelines with increasing degree of details (so called TIERs 1, 2 and 3). Considering that high variability exists in small ruminants production systems (due to breeds, specialization, geographic and environmental conditions, available feeds, management, etc.), a simple approach such as that used for the TIER 1 of IPCC (2006) should be preferred and sufficient in most countries for initial estimations (Zervas and Tsiplakou, 2012). TIER 1 assumes fixed emission coefficients from each emission source (enteric fermentation and manure management) that should be multiplied by the average number of heads of a certain animal population. Separate values for developed and developing countries are suggested and the annual average air temperature is also considered to correct for climate effects on manure management emissions.

WORLD EMISSION FROM SMALL RUMINANTS - The latest FAO report (Gerber et al., 2013) affirmed that 7.1 Gt of CO_2eq per year are currently emitted from the livestock sector, which represents 14.5% of total anthropogenic emissions. Of this amount, small ruminants contribute for about 6.5%, corresponding to 475 million tons CO_2eq, of which 299 million tons are allocated to meat production, 130 million tons to milk production and 46 million tons to other goods and services (Gerber et al., 2013; Tab. 1). Thus, small ruminants contributes for less than 1% of total anthropogenic emissions. As reported by Gerber et al. (2013), cumulative world emissions attributed to milk production are similar for sheep and goat, although emissions from meat production are much higher for sheep than goats (Tab. 1). Considering the emission intensity in terms of CO_2eq. emitted per kg of small ruminant product, sheep milk reaches higher values than goats (8.4 vs. 5.4; Tab. 1), both for their lower production levels and higher milk solid content in respect to goats (Opio et al., 2013). Values close to 24 kg/kg of meat were obtained both for sheep and goats (Tab. 1).

In the latest FAO report on climate change (Gerber et al., 2013), over 55% of emissions from small ruminant milk and meat production were attributed to enteric fermentations and about 35% to feed production, whereas emissions from manure were very low because excreta are deposited on pasture (Fig. 1). Prevalence of methane on total emissions was already noticed for dairy cattle, although with incidence lower than 50% (Gerber et al., 2013).

ITALIAN EMISSIONS FROM SMALL RUMINANTS - A quantification of GHG emissions for Italian livestock species was carried out by Pulina et al. (2012). In Tab. 2 the main results of the GHG emissions quantification are reported. Estimation method was the TIER 1 of IPCC guidelines (IPCC, 2006). Values suggested for developed countries of Tab. 10.10, 10.15, 10.19 of Volume 4 of Chapter 10 were applied (IPCC, 2006). Livestock consistency was gathered from ISTAT annual inventory of sheep and goat for the year 2009, with a regional detail (Tab. B04; annual inventories of ISTAT, 2009: available from http://agri.istat.it/jsp/dawinci). To account for differences in weight and days of presence in the national flock, animal population was adjusted considering the approach proposed in the section 10.2 of IPCC (2006) guidelines. National flock profile and animal weights were assumed to have the same profile both for sheep and goats within categories. A standard profile of 100 mature female, 18 replacement young animals and 2.5 adult males was assumed. Weight of adult female, young and male were considered equal to 55, 25 and 70 kg, respectively. Animal population inventory resulted in about 1 million goats and 8 million sheep (Tab. 2). Considering that in Italy total anthropogenic emissions were equal to 541 tons x 1000 of CO_2 eq., Pulina et al. (2012) estimated that the overall livestock sector contributed for about 3.21%. These data confirmed the value for the Italian livestock sector of 3.22% of total GHG, obtained in a previous estimation of ISPRA (2010; Available from: http://www.isprambiente.gov.it/site/it).

Emissions were attributed to dairy cattle for 56%, beef and double purpose cattle for 18%, swine for 12%, whereas buffalo, equines, poultry and rabbit contributed for the remaining 4%.

The contribution of small ruminants to GHG emissions was equal for goats to 119'000 tons and for sheep to 1'515'000 tons of CO_2eq, i.e 0.68% and 8.72% of total national livestock emissions, respectively (Tab. 2).

Sheep and goat population was principally distributed in Center and South Italy. In particular, the island of Sicily and Sardinia ac-

Table 1 - Milk and meat yearly production from small ruminants and their CO_2 equivalent emissions (adapted from Opio et al., 2013).

Species	Production		Emissions of CO_2 eq.			
	Milk	Meat	Milk	Meat	Milk	Meat
UM	Million tons		Million tons		kg/kg of product	
Sheep	8.0	7.8	67.4	186.9	8.4	24.4
Goats	11.9	4.8	62.4	112.5	5.2	23.5
Total	**20**	**12.6**	**129.8**	**299.2**	**6.5**	**23.8**

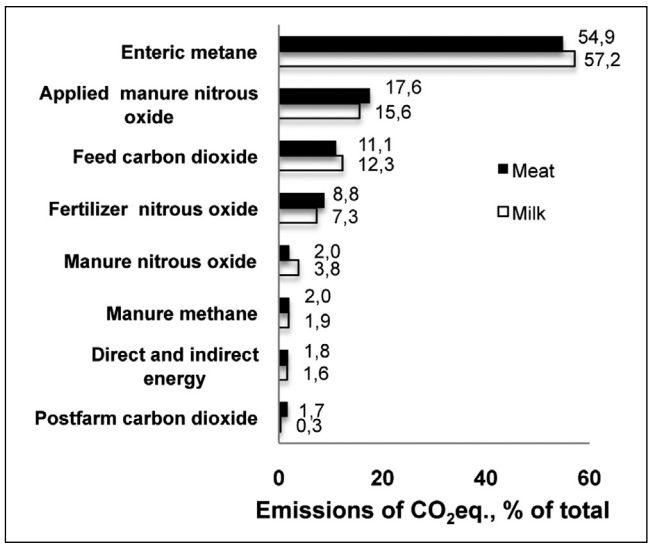


Figure 1 - Emission source contribution to small ruminant CO_2eq for meat and milk production (adapted from Fig. 14 of Gerber et al., 2013).

Table 2 - Total emissions of CH_4 and N_2O from Italian livestock reported by Pulina et al. (2012). The estimation was carried out with TIER 1 of IPCC (2006). Emissions were expressed in tons x 1000 of CO_2eq. (1 CO_2 eq = 25 CH_4 = 298 N_2O).

Species	Heads X 1000	CH_4 from enteric	CH_4 from manure	N_2O from manure	Total CO_2 (%)
Cattle	6'283	9'002	3'483	391	12'876 **(74.1)**
Meat	*2'789*	*2'443*	*598*	*69*	*3'110 **(17.9)***
Milk	*3'494*	*6'559*	*2'885*	*322*	*9'766 **(56.2)***
Buffalo	294	330	32	17	378 **(2.2)**
Sheep	7'874	1'431	34	50	1'515 **(8.7)**
Goats	961	109	3	7	119 **(0.7)**
Swine	9'273	248	1'812	82	2'142 **(12.3)**
Equine	350	117	13	4	134 **(0.8)**
Rabbit	100'000	81	46	13	140 **(0.8)**
Poultry	171'343	0.01	12	62	74 **(0.4)**
All	**296'378**	**11'318**	**5'433**	**626**	**17'377**

counted for about half of the Italian small ruminant population (Tab. 3). Livestock production systems in these regions are principally mixed dairy systems. Emission coefficients were then applied to the regional values of adjusted animal population, which was estimated equal to 91% of the ISTAT (2009).

Emissions originated by emitted methane for 96.7% and 94.4% for sheep and goats, respectively. In particular, enteric methane contributed to 94.4% and 92.0% of total emissions of sheep and goats, respectively. It results to a mean of 195 kg and 125 kg of CO_2eq for average head of sheep and goat, respectively. It reflected the yearly coefficients of enteric methane suggested by TIER 1 of IPCC (2006), 60% higher for sheep than goats. FAO (2009; available at www.faostat.fao.org/site/569/default) estimations for small ruminant products in Italy for the year 2009 were equal to:

- 440'668 and 56'696 tons of sheep milk and meat, respectively. Considering two thirds of the national population destined to milk, as reported by FAO (2009), the intensity of emissions is about 2.75 and 5.56 kg of CO_2eq per kg of sheep milk and meat respectively;
- 22'592 and 2'355 tons of goat milk and meat, respectively. Considering two thirds of the national population destined to milk, as reported by the same FAO (2009), the intensity of emissions resulted 3.7 and 15.1 kg of CO_2eq per kg of product for sheep milk and meat respectively.

The obtained values of CO_2eq. emissions for sheep and goat products resulted lower than the average world emission intensity reported in Tab. 1, as expected for Western Europe (Opio et al., 2013). However, those values were higher than average values of 2 and 7 kg of CO_2eq for kg of small ruminant milk and meat in Western Europe, respectively (Figures 13 and 15; Gerber et al., 2013).

CONSIDERATIONS ON ENTERIC EMISSIONS - Enteric methane can be considered the most important component of small ruminant emissions. Emissions from manure, mainly unmanaged excretions on pasture, can be considered as negligible. In the study of Pulina et al. (2012) methane enteric emissions were equal to 7.37 kg/y and 4.61 kg/y for the average sheep and goat, respectively.

A recent quantitative inventory, based on a detailed TIER 3 approach (IPCC, 2006), was carried out by Vermorel et al. (2008) for French livestock, considering the national population number and profile (Tab. 4). They obtained an average value of 7.3 and 11.9 kg/y of methane per average sheep and goat head, respectively. Considering the level of detail pursued in the inventory and the similarities in climate and livestock systems between Italy and France, values of Vermorel et al., (2008) might be considered more reliable than values suggested by TIER 1 in order to perform estimations in Western Europe production conditions.

ADVANCES ON THE PREDICTION OF SHEEP EMISSIONS - The values of emissions of 7.4 kg of methane per average head obtained by Pulina et al. (2012; Tab. 3) with Tier 1 were very similar to those of 7.3 obtained by Vermorel et al. (2008; Tab. 4) by using Tier 3.

An additional detailed estimation of sheep sector in Italy with a TIER 3 approach was performed by Atzori et al. (2013a). The study was conducted by an estimation of the population profile of Italian sheep population accounting for differences at regional level of: consistency, incidence of milk and/or meat production specialization, morphological and productive characteristics of raised sheep breeds, livestock systems and dietary factors. The inventory confirmed the values of Vermorel et al. (2008) regarding enteric emis-

Table 3 - Emissions of methane (CH_4) from enteric fermentation and methane and nitrous oxide (N_2O) from manure estimated for goat and sheep raised in Italy by Pulina et al., (2012). The estimation was carried out with the TIER 1 of IPCC (2006), using consistencies reported by ISTAT (2009). Emissions were expressed in tons x 1000 of CO_2eq. considering that 1 CO_2 eq = 25 CH_4 = 298 N_2O.

	GOATS					SHEEP					
Region	Goat, heads	enteric CH_4	manure CH_4	manure N_2O	Goat CO_2eq	Sheep, heads	enteric CH_4	manure CH_4	manure N_2O	Sheep CO_2eq	Total CO_2eq
Piemonte	43'494	4.94	0.128	0.303	5.372	85605	15.558	0.370	0.544	16.472	21.844
Valle Aosta	2'866	0.326	0.008	0.02	0.354	2360	0.429	0.01	0.015	0.454	0.808
Lombardia	54'339	6.172	0.16	0.378	6.711	90670	16.479	0.391	0.577	17.447	24.158
Liguria	8'340	0.947	0.025	0.058	1.030	21588	3.923	0.093	0.137	4.154	5.184
Trentino A.A.	25'185	2.861	0.074	0.175	3.110	58799	10.686	0.254	0.374	11.314	14.425
Veneto	9'556	1.085	0.028	0.066	1.180	29825	5.421	0.129	0.19	5.739	6.919
Friuli-V.G.	5'216	0.592	0.015	0.036	0.644	5423	0.986	0.023	0.034	1.043	1.688
Emilia-R.	8'796	0.999	0.026	0.061	1.086	89292	16.228	0.385	0.568	17.182	18.268
Toscana	12'977	1.474	0.038	0.090	1.603	580517	105.505	2.506	3.692	111.703	113.306
Umbria	7'184	0.816	0.021	0.050	0.887	171353	31.142	0.740	1.090	32.972	33.859
Marche	6'691	0.760	0.020	0.047	0.826	182773	33.218	0.789	1.163	35.169	35.996
Lazio	38'194	4.338	0.113	0.266	4.717	760692	138.251	3.283	4.838	146.373	151.09
Abruzzo	12'578	1.429	0.037	0.088	1.553	196405	35.695	0.848	1.249	37.792	39.346
Molise	9'703	1.102	0.029	0.068	1.198	158379	28.784	0.684	1.007	30.475	31.674
Campania	48'106	5.464	0.142	0.335	5.941	262407	47.691	1.133	1.669	50.492	56.434
Puglia	47'996	5.452	0.142	0.334	5.928	237876	43.232	1.027	1.513	45.772	51.7
Basilicata	101'383	11.516	0.299	0.705	12.521	377902	68.681	1.631	2.404	72.716	85.237
Calabria	158'075	17.956	0.467	1.100	19.523	255717	46.475	1.104	1.626	49.205	68.728
Sicilia	124'707	14.165	0.368	0.868	15.402	801308	145.633	3.459	5.097	154.188	169.59
Sardegna	235'564	26.758	0.696	1.639	29.093	3505217	637.051	15.13	22.295	674.476	703.568
Italy	**960'950**	**109.15**	**2.84**	**6.69**	**118.68**	**7874108**	**1'431**	**34.00**	**50.00**	**1'515**	**1'633.8**

Table 4 - Estimation of enteric methane emissions for French sheep and goats adapted from Vermorel et al., (2008).

SPECIE	SHEEP				GOATS			
Category	Size kg	Age months	CH_4 kg/y	Pop. %	Size kg	Age months	CH_4 kg/y	Pop %
Dairy female	70 kg*	Mature	14.4	22	65	Adult	14.3	83
Other female	65 kg	Mature	11.0	58				
Male		Mature	14.7	3	90	Mature	13.5	3
Lambs/kids	< 42	4 - 6	0.8 - 1.5	5	60	Various	9.1	5
Replacement		13-15	7.6 - 9.3	12	< 40	< 12	5.0	9
Average			**7.3**				**11.9**	

*220 kg/y of milk yield; ** 650 kg milk at 3.5% fat.

sions of methane per lactating dairy sheep (13.6 kg/y vs. 14.4 kg/y of Vermorel et al. (2008)) but predicted higher emissions than for these authors for mature meat sheep and for the average sheep (15.8 and 9.6 and kg/y of methane for adult meat sheep and the average sheep, respectively). Meat sheep reached higher values than dairy sheep because of their bigger body size and their higher forage to concentrate ratio in the diets. The inventory lead to an estimation of the contribution of the Italian sheep sector equivalent to 13% of total national livestock emissions. Emission intensity for dairy sheep was equal to 3.2 kg of CO_2eq per kg of fat and protein corrected milk with 6.5% fat. Emission intensity calculated on meat breeds was 23.5 of CO_2eq per kg of produced meat, value similar with those for sheep meat production estimated in Europe (Ripoll-Bosch et al., 2013; Jones et al., 2013). Simulations on high specialized dairy sheep farm, following a partial LCA approach *"from cradle to farm gate"* (accounting for enteric and, manure emissions, produced and purchased feed and energy emissions) were published by Atzori et al. (2013b). Emissions intensity ranged from 3.2 kg of CO_2eq./kg of sheep milk (6.5% of fat) in extensive farms using only pasture (140 kg/y of milk per present sheep) to 2.5 kg of CO_2eq./kg of milk in intensive system with confined sheep (230 kg/y of milk per present sheep).

ADVANCES ON THE PREDICTION OF GOAT EMISSIONS - The values obtained by Vermorel et al. (2008) for goat enteric emissions were more than two times higher than those based on TIER 1 of IPCC (2006). Indeed, the Tier 1 estimates are definitely too low in comparison with sheep values, considering that dairy goats are often much more productive than sheep. It is possible that indigenous goats and not specialized dairy breeds were considered in the coefficients suggested by IPCC (2006). If the French values were used to predict methane emissions of Italian goats, the total CO_2eq emitted by goats would be equal to 295.400 tons per year, which corresponded to an estimate 2.5 higher than the values estimated by Pulina et al. (2012). By allocating total Italian goats emissions for 2/3 on the milk produced and 1/3 on the meat produced, as suggested by FAO, the carbon footprint would be equal to 9.1 and 37.6 kg of CO_2eq per kg of milk and meat, respectively. These values are much higher than those expected in Western Europe by Gerber et al. (2013). Estimations of Vermorel et al (2008) were carried out on high producing animals with high milk specialization (650 kg/y of milk per goat), whereas national (Italian) estimation of FAO corresponded to about 40 kg/y of milk per producing goat. This value appears to be very low and surely markedly underestimated. From these evidences it is clear a more detailed estimation of emissions are needed for the Italian goat sector, considering accurate milk and meat production levels for the main Italian production systems.

CONCLUSIONS - Small ruminant production is very important in Italy for economic, social and landscape preservation aspects. Based on simplified estimates based on Tier 1 of IPCC (2006), it appears that greenhouses gas contribution of Italian sheep and goats is low if compared to the emissions of other Italian livestock species. In Italy, detailed surveys were carried out for sheep, with estimated emissions comparable with those estimated in France for the sheep production sector. On the other hand, French estimates for dairy goats suggest much higher values than those obtained with IPCC (2006). Thus, it appears that accurate estimates for the Italian goat sector are needed to properly quantify its emissions of GHG.

References

Atzori, A.S., Mele, M., Cappucci, A., Pulina, G. Emission of greenhouses gas in Italy: an inventory for the sheep sector using the Tier 3 of IPCC guidelines. 2013a. Proc. of XX ASPA Congress, Bologna (Italy), June 11-13.

Atzori, A.S., Rassu, P.G., Cannas, A., Pulina, G. Partial carbon footprint of dairy sheep farms: simulated results from 4 different scenarios. 2013b. Proc. of XX ASPA Congress, Bologna (Italy), June 11-13.

Edwards-Jones, G., Mila, I., Canals, L., Hounsome, N., Truninger, M., Koerber, G., Hounsome, B., Cross, P., York, E.H., Hospido, A., Plassmann, K., Harris, I.M., Edwards, R.T., Day, G.A.S., Tomos, A.D., Cowell, S.J., Jones, D.L. Testing the assertion that 'local food is best': the challenges of an evidence-based approach. Trends in Food Sci. and Techn, 2008. 19, p. 265-274.

Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. & Tempio, G. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. 2013. FAO, Rome.

IPCC, Chap. 10. Emissions from Livestock and Manure Management. In 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Vol. 4: Agriculture, Forestry and Other Land Use.

Jones, A.K. Jones, D.L., Cross, P. The carbon footprint of lamb: Sources of variation and opportunities for mitigation. 2014. Agric. Syst. 123 p. 97-107

Moss, A.R., Jouany, J., Newbold, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Ann. Zootech. 2000. 49. p 231-253.

Opio, C., Gerber, P., Mottet, A., Falcucci, A., Tempio, G., MacLeod, M., Vellinga, T., Henderson, B. Steinfeld, H. Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains - A global life cycle assessment. 2013. FAO, Rome.

Pulina, G., Atzori, A.S., Battaccone, G., Dias Francesconi, A.H., Mele, M., Ronchi, B., Stefanon, B., Sturaro, E., Trevisi, E. Italian animal footprint: l'impatto ecologico delle attività zootecniche italiane 2012. Mangimi e Alimenti, Assalzoo marzo-aprile p 24-32.

Ripoll-Bosch, R., de Boer, I.J.M., Bernués, A., Vellinga, T.V. Accounting for multi-functionality of sheep farming in the carbon footprint of lamb: a comparison of three contrasting Mediterranean systems. 2013 Agric. Syst. 116, 60-68.

Vermorel, M., Jouany, J.P., Eugène, M., Sauvant, D., Noblet, J., Dourmad, J.Y. Evaluation quantitative des émissions de méthane entérique par les animaux d'élevage en 2007 en France. INRA Prod. Anim. 2008. 21. p. 403-418.

Zervas, G., Tsiplakou, E. An assessment of GHG emissions from small ruminants in comparison with GHG emissions from large ruminants and monogastric livestock. Atmospheric Environment 2012. 49: p. 13-23.

Greenhouse gases emissions in sheep: mitigation strategies

F. PILLA, M. D'ANDREA

Dip. Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università degli Studi del Molise, Campobasso

Key words: sheep, greenhouse gases emission, animal breeding

INTRODUCTION - Global livestock agriculture is responsible for approximately 18% of global anthropogenic greenhouses gases (GHG) emissions and the FAO report "Livestock Long Shadow" implies that livestock sector increasingly competes for scarce resources and causes a severe impact on air, water and soil. Since then, several groups have rebutted that report and provided reduced estimates of impact of livestock agriculture on GHG emissions (EPA 2011, Ripoll-Bosh *et al.*, 2013).

The main GHG (Fig. 1) in livestock are carbon dioxide (CO_2), methane (CH_4) and nitrous oxide (N_2O), expressed in CO_2 equivalents (CO_2-eq) based on following factors: 1 for 1 kg of CO_2, 25 kg for 1 kg of CH_4, and 298 for 1 kg of N_2O (Ripoll-Bosh et al., 2013). Although enteric CH_4 generated in the gastrointestinal tract of ruminant is the single largest source of anthropogenic CH_4. Life cycle assessment (LCA) is an internationally accepted, standardized methodology for qualifying GHG emissions of diverse animal production systems during the entire life cycle of a product (ISO 2006). The product in an LCA not only refers to a material products, such as meat or wool, but also to services, such as landscape conservation. But LCA still presents significant challenges, in particular when referred to agriculture, in fact it has to be considered also the multiple-outputs like services or benefits delivered by some farming systems to society considered as non-marketable public goods. Ruminant also are very capable of converting the human-inedible by-products of food production into high-quality human food. For this reason ruminant livestock will play a crucial role in future global food security because far more grazing land exists, unusable for human food, than cropping land (Gill *et al.*, 2010) and ruminant animal can transform pasture into high-quality human food (Knapp *et al.*, 2014).

Intensifying animal production is generally advocated to mitigate GHG emissions associated with production of animal-source food (Steinfeld *et al.*, 2010). However, in Mediterranean areas, in particular for sheep, farming systems, are characterized as extensive or low-input (linked to natural and semi-natural areas through grazing or shrubs, forest pasture and alpine grasslands). In this extensive system, sheep, but are able to add value-to a range of by-products from winter cereals production (residues remaining on-field, after harvesting, stubbles and failed crops) (Ripoll-Bosh et al., 2013). Moreover this pasture-based sheep farming systems contribute to control the process of abandonment, afforestation and encroachment of unfavorable Mediterranean marginal areas (Bernués *et al.*, 2005). This is and important function that, beside the primary function of sheep farming, actually producing lamb meat, as to be considered. In fact, the extensive system can contribute to biodiversity preservation, management of renewable nat-

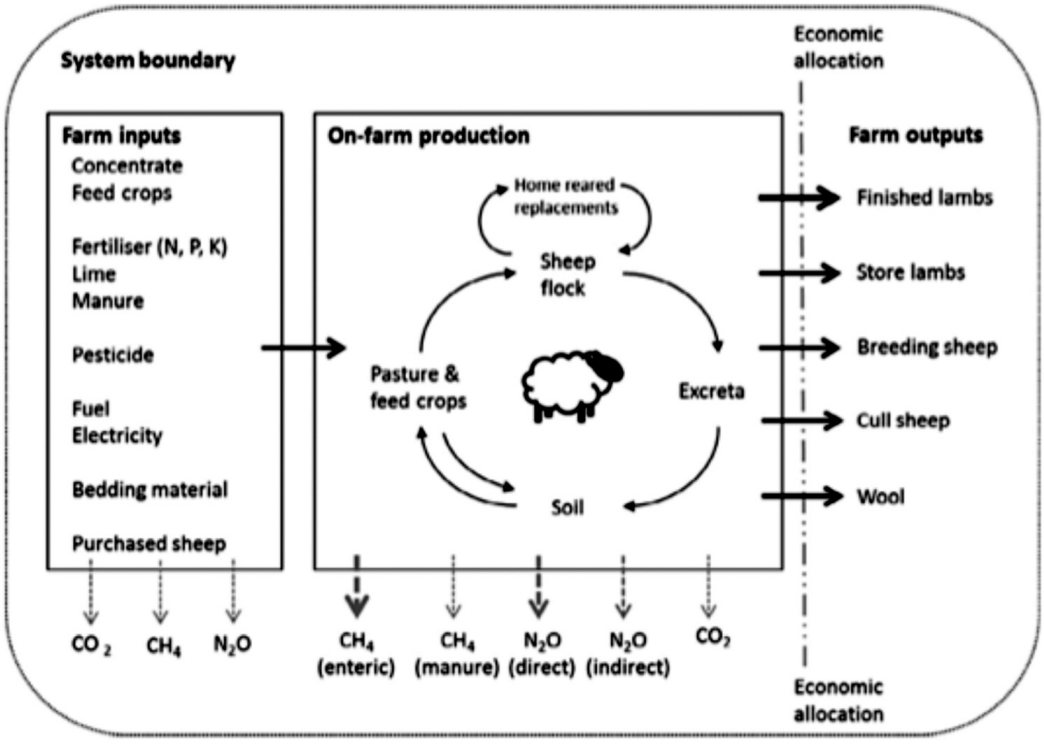


Figure 1 - Schematic representation of sheep farming systems (From Jones et al., 2014).

ural sources, conservation of cultural landscapes to the socio-economic viability of many rural areas, especially in marginal areas or less favored areas. These other functions of sheep farming systems are often ignored when comparing emissions of greenhouse gases among system differing in intensity, which might favor intensive systems.

Concerns over the contribution of the livestock farming to mitigate global warming have prompted to a number of studies at improving the scientific knowledge regarding the GHG emissions by livestock at global, national local levels (Patra, 2014). The aims are to improve feed efficiency, animal welfare and the nutritional quality of milk and meat to mitigate the emissions of greenhouse gases in particular from the dairy farms.

At the time, the possible solutions to mitigate greenhouse gases emissions are classifiable in two main categories:

- genetics improvement approach;
- farming systems.

GENETIC IMPROVEMENT APPROACH - Differences between individual animals in plant selection during grazing, rumen digestion retention rate, and host-microbe interactions may be heritable and this amenable to genetic selection for animal with less enteric CH_4 emission per-day or per DMI basis (Knapp *et al.*, 2014). The high individual variability in CH_4 measurements and the poor repeatability of the data obtained, could limit the selection schemes based on this. Genetic selection schemes for CH_4 emission reduction have been used but the relation between the CH_4 emission and animal growth has not been evaluated. Anyway widespread consensus exists that increasing the productivity of an animal will decrease the proportion of CH_4 per unit of product. The Environmental Protection Agency has stated that "*Improving livestock productivity, so that less CH_4 is emitted per unit of product, is the most promising and cost-effective technique for reduce emission*" (EPA, 2005).

Production efficiency can be improved by genetic selection and management practices but it is important to evaluate his aspect in terms of herd-productivity basis and not only examined on an individual animal. The classical breeding selection methods can allow ameliorating milk or meat yield per sheep for example selection for residual feed intake or residual solid production could dilutes the maintenance energy cost and increase gross energy efficiency. Moreover genetic approaches that improve health, disease resistance, reproduction, and tolerance to heat stress will lead to increase in individual lifetime and flock productivity and indirectly reduce CH_4 emission per unit of product. In addition it has to be said that ruminant animals and microbes (bacteria, protozoa, fungi and Archea) have evolved together, filling a niche based on the conversion of complex plant carbohydrates to energy that is beneficial to both animals and symbionts. A best knowledge about rumen microorganism could highlight the digestion process and CH_4 emissions. In fact, there are a lot of unidentified microorganism that may explain the lack of predictability in the effects of various rumen manipulations that has been observed in the past experiments.

To date there are numerous molecular biology methods and molecular markers to study genome diversity in sheep and in microbioma. The availability of high throughput sequencing tools offer the opportunity to deeply investigate animal genome and transcriptome, describing more in details the variable structure of genotype among animals of the same species. The biological basis of the novel traits and of nutritional and hygienic quality of milk and meat are investigated at a molecular, cellular and genome levels, including microbiota evaluation. The main problem that has to be solved concerns the phenotypic data measurements.

In fact, phenotypic are often described by means of a set of biomarkers measured in milk, urine, hair, plasma and faeces and associated with genomic date measured on the same animal and they are the limiting factors since the measurements, mostly in extensive farming system, are difficult to achieve. A set of biomarkers already considered in literature as indexes of feed and metabolic efficiency can be used as indirect measures (beta hydroxybutyrate - BOHB - in plasma and milk, urea in plasma and milk, purine derivatives - PD - in plasma and urine). Other biomarkers for stress response and animal efficiency can also be considered, according to new information published in the literature. The description of the new phenotypes is completed with productive data, as milk yield, milk quality and hygiene, body condition score (BCS). All the biomarkers describe above togheter with others EBV could improve knowledge about GHG emissions in ruminants.

Many researchers in many countries are involved in projects, mostly in the cow, to investigate novel phenotype to indirect measure CH_4 or different methods to measure directly the phenotype associated with this trait.

Pinares-Patiño *et al.* (2013) studied the heritability of methane emission from sheep. They showed that g CH_4 per day and g CH_4 per unit of ingested feed (expressed in kg) are both heritable and repeatable traits. Even though variation in intake has accounted for a significant fraction of the phenotypic and genetic variation in CH_4 emissions, there remains a component that is independent of intake and offers hope for genetic selection as potential option to reduce emissions.

FARMING SYSTEMS - It has already said that, mostly in Mediterranean areas like the South of Italy, sheep farming systems are characterized as extensive. Sheep in extensive farm systems have a low reproduction rate. In Ripoll-Bosh *et al.*, (2013) paper comparison of GHG emissions among pasture-based (farm located in alpine mountains; low-intensive or traditional reproductive management, with one lambing per ewe per year; freely grazing, except during lactation and occasionally in the winter) mixed sheep-cereal (mid-altitude; mid-intensive reproduction management, with three lambings per ewe every two years; daily grazed with shepherd and kept indoor at night and during lactation; fed using cereal grains or concentrates derived from winter cereals) and zero-grazing (low altitude; high-intensive reproduction management, with five lambings per ewe every three years; fed with total mixed ration) systems.

Results show (Tab. 1) that the pasture-based system emits more GHGs per Functional Units (FU = one kg of lamb live weight) than mixed and zero-grazing systems due to lower productivity, lower breeding efficiency and daily weight gains. The main GHG

Table 1 - GHG emissions (CO_2-eq/Kg) with or without Ecosystem service allocation for lamb live weight of lamb meat contribution (%) of CO_2, CH_4 and N_2O total GHGs (From Ripoll-Bosh et al., 2013).

	Without ES allocation		With ES allocation		Contribution		
	kg lamb live weight (CO_2-eq/kg)	kg lamb meat (CO_2-eq/kg)	kg lamb live weight (CO_2-eq/kg)	kg lamb meat (CO_2-eq/kg)	CO_2 (%)	CH_4 (%)	N_2O (%)
Pasture-based	25.9	51.7	13.9	27.7	7.9	61.6	30.5
Mixed	24.0	47.9	17.7	35.4	21.0	57.6	21.4
Zero-grazing	19.5	38.9	19.5	39.0	29.1	59.4	11.5

in lamb meat production in CH_4 and it depends on animal type and size, and on feed intake and its digestibility. In Ripoll-Bosh *et al.* (2013) the fraction of CH_4 emissions remained steady across systems as diets showed similar digestibility rate across systems, since zero-grazing systems used by-products instead of concentrate, while emission of CO_2, related to combustion of fossil flues increased according to the degree of intensification (zero-grazing systems have the higher consumption associated to cultivation and transports) and emission of N_2O decreased according to the degree of intensification (deposition of manure directly on pasture is related to high N_2O emission) (Tab 1). Including the cultural ecosystems services as part of the Functional Unit delivered by each sheep farming systems, increase GHG emission per kg of lamb meat according to the degree of intensification (lowest for pasture-based, intermediate for mixed and highest for zero-grazing systems).

CONCLUSIONS - The premise is that, even though the pasture-based sheep farming system emits more GHGs per Functional Units, extensive systems also provide other important functions to society, like biodiversity and landscape conservation, CLA content in cheese, that are worthy to account. In fact, when considering for these functions, GHG emissions per kg of product increase according to the degree of intensification.

The strong links between the extensive livestock production and the provision of diverse ecosystems services, mostly in the marginal areas, need to be considered as cultural ecosystem services that translate external no-market values into real financial services to the global economy.

In the same time the pasture-based sheep efficiency could ameliorate improving traits easy to measure like fertility and longevity. This will bring a reduction of animal farmed. But this reduction means a decrease of cultural ecosystem services since it is known that animal, only in the right number, will preserve landscape by grazing. To keep both, mitigation of GHG emissions and high ecosystems services, next to the traits that improve sheep farming systems like resistance disease, number of lamb per ewe, breeding ewe replacement rate, also animal efficiency in feed conversion rate has to be considered including feed intake measures and all the indirect measurement of phenotypes (like biomolecules associated with genomic date measured).

References

Bernués A., Riedel J.L., Asensio M.A., Blanco M., Sanz A., Revilla R., Casaús I., (2005), An integrated approach to studying the role of grazing livestock systems in the conservation of rangelands in a protected natural park (sierra de Guara, Spain). Livestock Production Science (96): 75-85.

EPA (Environmental Protection Agency) (2005), Opportunities to Reduce Anthropogenic Methane Emission in the United States. Publication 430-R93-012. EPA. Washington, DC.

EPA (Environmental Protection Agency) (2011), Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2009. Publication 430-R-11-005. EPA, Washington, DC.

Gill M., Smith P., Wilkinson J.M., (2010), Mitigating climate change: the role of domestic livestock. Animal (4): 323-333.

ISO, (2006), Environmental Management – Life Cycle Assessment: Requirements and Guidelines. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.

Jones A.K., Jones D.L., Cross P., (2014), The carbon footprint of lamb: Sources of variation and opportunities for mitigation. Agricultural Systems (123): 97-107.

Knapp J.R., Laur G.L., Vadas P.A., Weiss W.P., Tricarico J.M., (2014), Invites Review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. Journal of Dairy Science (97): 3231-3261.

Patra A.K., (2014), Trends and Projected Estimates of GHG Emissions from Indian Livestock in Comparisons with GHG Emissions from World and Developing Countries. Asian-Australasian Journal of Animal Science 27(4): 592-599.

Pinares-Patiño C.S., Hickey S.M., Young E.A., Dodds K.G., MacLean S., Molano G., Sandoval E., Kjestrup H., Harland R., Hunt C., Pickering N.K., McEwan J.C., (2013), Heritability estimates of methane emissions from sheep. Animal 7(s2): 316-321.

Ripoll-Bosch R., de Boern I.J.M., Bernués A., Vellinga T.V., (2013), Accounting for multi-functionality of sheep farming in the carbon footprint of lamb: A comparison of three contrasting Mediterranean systems. Agricultural Systems (116): 60-68.

Steinfeld H., Gerber P., (2010), Livestock production and the global environment: Consume less or produce better? PNAS 107(43): 18237-18238.

Climatic changes and geospatial health

L. RINALDI[1,2], P. PEPE[1], G. CRINGOLI[1,2]

[1] Department of Veterinary Medicine and Animal Productions, Unit of Parasitology and Parasitic Diseases, University of Naples Federico II, Naples, Italy
[2] Inter-University Center for Research in Parasitology (CIRPAR)

Key words: climatic changes, parasites, geospatial tools.

1 - INTRODUCTION - It is now widely accepted that climate change is happening and that it represents one of the greatest threats faced by our planet, its population and economies (Skuce et al., 2013). The rate of change in climate is faster now than in any period in the last 1000 years. According to the United Nations Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), in 90 years, average global temperatures will increase between 1.8°C and 4.0°C (Yatoo et al., 2012). These changes will have a direct and indirect impact on livestock farming systems. Therefore, there is a need to remain vigilant to such changes, through enhanced veterinary investigation and disease surveillance services.

Small ruminant farming, as with all livestock species, has a prominent role in the sustainability of rural communities around the world, as well as being socially, economically and politically highly significant at national and international levels (Morgan et al., 2013).

The direct effects of the predicted changes in climatic conditions, weather, frequency of extreme events and altered thermal environments will potentially have an impact on livestock production efficiency and through the imposition of stress, resulting in consequences ranging from increased mortality to stress-induced pathologies, altered disease resistance and poor welfare. Livestock will also be affected indirectly through an increased exposure to diseases, (Skuce et al., 2013), especially infectious and parasitic diseases. Climate change has well-documented effects on the life cycle and geographical distribution of insects and ticks, and, therefore, on arthropod-borne infections (mainly virus, bacteria, protozoa). However, less attention has been given so far to the effects of climatic changes on helminth infections, as those caused by gastrointestinal (GI) strongyles, as well as liver and rumen flukes. These parasitic infections remain one of the main constraint on health and productivity in sheep farms worldwide (Rinaldi and Cringoli, 2014). Also, some of these parasitic species may also provoke high mortality rates, particularly in young animals. Different genera of GI strongyles (e.g. *Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, etc.) and rumen/liver flukes (*Fasciola hepatica, Dicrocoelium dendriticum* and *Calicophoron daubneyi*) are highly prevalent in sheep farms in Europe (Rinaldi and Cringoli, 2014). The ranking of GI strongyles and flukes as one of the top cause of lost productivity in small and large ruminants by the recent DISCONTOOLS programme (http://www.discontools.eu/home/index) witnesses the increasing EU's consideration of the impact of these parasites upon animal health, welfare and productivity.

For the above reasons, monitoring and surveillance of these helminth infections in sheep farms is of great importance, with the final goal of setting up sustainable and effective control strategies. The control of parasitic diseases, especially for those caused by GI strongyles, is generally achieved by frequent administration of anthelmintic drugs to suppress egg output and consequently infection pressure (Morgan and van Dijk, 2012). The spread and increasing prevalence of anthelmintic resistance, however, threatens the efficacy of this approach and the sustainability of helminth control in sheep (Morgan and van Dijk, 2012). Therefore, there is increasing interest in alternative methods of control, including targeted (selective) treatments (TT/TST) where anthelmintic treatment is timed with epidemiology of these parasites. Obviously, this approach relies on good understanding of the epidemiology of helminth infections which is driven mostly by climate, land cover/land use and management factors.

Levels and seasonal patterns of parasites challenge to livestock are likely to be affected by climate change, through direct effects on life cycle stages (eggs and larvae) and intermediate hosts (for flukes) outside the definitive host (Morgan and van Dijk, 2012). An increased number of generations and prolonged periods during which conditions are favourable for survival and transmission would be expected to increase potential parasite temporal availability. Similarly, warmer temperatures might be expected to change the geographic distributions of many species of GI strongyles (Morgan and Wall, 2009) and also flukes.

The spatial distribution of different species and typical faunal composition in any given area in Europe vary as a function of climate. Nevertheless, it is impossible to understand and, therefore, much less to predict, these patterns without taking into account sheep management systems and husbandry, which also vary spatially and are themselves strongly influenced by climate (Morgan and van Dijk, 2012). In fact, host-parasites interactions will not only be directly affected by climate change but also through alterations to farm management.

There is a need to create a bridge between the atmospheric sciences, geography, ecology, other more spatially-based sciences, and the natural resource management and planning communities. This requires the representation of complex physical processes as weather forecast and climate system models, which are used to project future climatic conditions and their impact upon innumerable social and environmental processes (Rong and Fennech, 2007).

GEOSPATIAL HEALTH - The effect of climatic changes on parasite distribution should be studied using geospatial tools (e.g. GIS, remote sensing, virtual globes, spatial statistics, ecological niche models, etc.) for the integrated mapping, monitoring and surveillance (Cringoli et al., 2013). The advantage of mapping the location of livestock farms and of studying the spatial distribution of infections is clear since it enable to understand the effects of climatic changes and to focus intervention strategy in a sustainable way. Geospatial tools have now become an integral part of epidemiology and surveillance by driving systematic collection, analysis and interpretation of health data. Translational research has rapidly evolved from approaches requiring specialists in GIS and remote sensing technology to a level where it has become a normal part of health planning and implementation of disease control programmes (Cringoli et al., 2013). Compared to the past decades, the situation is improving with the development of open-source software for GISs (e.g. QGIS), online data warehouses containing freely available geospatial data and increased training opportunities in geospatial sciences.

Furthermore, the ability to define the distribution of infections at regional, national and subnational levels has been enhanced greatly by the increased availability of good quality survey data combined with the use of sophisticated model-based geostatistics, enabling spatial prediction in unsampled locations. Hence, Bayesian geostatistical models are increasingly being used in human and veterinary epidemiological studies to estimate parasitic risk profiling at high spatial resolution.

Also, WebGIS tools have become increasingly popular as a result of advances in computer technologies, improved and established geographical standards which have helped the dissemination of spatial data to different audiences, and the shift from expert tools to community-based tools that are accessible to a wider range of users. Closely related to (simple) web-based GIS tools are spatial decision support systems (SDSS), i.e. interactive GIS-based platforms (including integrated database management systems) that are designed to support place-based decision making at the various stages of a planning process.

In order to stimulate the exchange of information on application of geospatial tools in health research through publications, international conferences, workshops and training courses, GnosisGIS (www.gnosisgis.org) was founded in 2000 as "Network On Snail-borne Infections with special reference to Schistosomiasis (GnosisGIS)". The initial aim was to develop and consolidate collaboration dedicated to validation and use of GIS and other geospatial tools to control schistosomiasis and other snail-borne infections which are strongly affected by climatic changes. However, its scope has since been expanded to include other infectious and parasitic diseases of medical and veterinary importance, including those caused by GI strongyles and liver/rumen flukes. Indeed, in 2005 the acronym GnosisGIS was kept, but the network was renamed "Global Network for Geospatial Health". In August 2013, the name was officially changed to "International Society for Geospatial Health-GnosisGIS". It is a dynamic, multinational and multidisciplinary scientific society, bringing together veterinarians, medical doctors, biologists, parasitologists, climatologistis, geographers, computer scientists, and statisticians. GnosisGIS strives to advance the utilization of geospatial tools in veterinary and public health. Toward this end, one of the main products of GnosisGIS is its official journal "Geospatial Health", an international, peer-reviewed scientific journal, founded in 2006 (Utzinger et al., 2011; Cringoli et al., 2013) publishing several articles dedicated to climatic changes and their effect on health. Recently, as an unique feature of Geospatial Health, a new section predominantly based on visual presentations, including brief video clips, was introduced in 2010 under the banner of "vHealth" (visual health) (Bergquist and Tanner, 2012). We are convinced that the visual approach will facilitate communication with the wide variety of stakeholders involved in research today, e.g. government offices, funding agencies, etc. In addition, vHealth will also provide a rapid system to show the effects of climatic changes on parasitic distribution and other health phenomena.

The use of geospatial tools in studying issues related to climatic changes and challenges in parasitology will gain more and more importance in the near future to improve strategic understanding of parasitic epidemiology and farm-specific models for improved decision support systems in a changing climate and a changing world.

Acknowledgements - The Authors would like to acknowledge GLOWORM (www.gloworm.eu), a project (agreement n° 288975) **funded by the** European Union Seventh Framework Programme FP7–KBBE-2011-5.

References

Bergquist R., Tanner M., 2012. Visual approaches for strengthening research, science communication and public health impact. Geospatial Health 6, 155-156.

Cringoli G., Rinaldi L., Albonico M., Bergquist R., Utzinger J., 2013. Geospatial(s) tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. Geospatial Health 7: 399-404.

Morgan E.R., Charlier J., Hendrickx G., Biggeri A., Catalan D., von Samson-Himmelstjerna G., Demeler J., Müller E., van Dijk J., Kenyon F., Skuce P., Höglund J., O'Kiely P., van Ranst B., de Waal T., Rinaldi L., Cringoli G., Hertzberg H., Torgerson P., Adrian Wolstenholme A., Vercruysse J., 2013. Global Change and Helminth Infections in Grazing Ruminants in Europe: Impacts, Trends and Sustainable Solutions. Agriculture 3: 484-502.

Morgan E.R., van Dijk J., 2012. Climate and epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. Veterinary Parasitology 189: 8-14.

Morgan E.R., Wall R., 2009. Climate change and parasitic disease: farmer mitigation. Trends in Parasitology 25: 308-313.

Rinaldi L., Cringoli G., 2014. Exploring the interface between diagnostics and maps of neglected parasitic diseases. Parasitology 28: 1-8.

Rong R.R., Fenech A., 2007. Geographic information systems as integrative platforms for climate change impact and adaptation analysis. In: Fenech and MacLellan, Linking Climate Models to Policy and Decision-Making, Toronto, Ontario: Environment Canada.

Skuce P.J., Morgan E.R., van Dijk J., Mitchell M. (2013), Animal health aspects of adaptation to climate change: beating the heat and parasites in a warming Europe. Animal 7(s2): 333-345.

Utzinger J., Rinaldi L., Malone J.B., Krauth S.J., Kristensen T.K., Cringoli G., Bergquist R., 2011. Geospatial health: the first five years. Geospatial Health 6: 137-154.

Yatoo M.I., Kumar P., Dimri U., Sharma M.C., 2012. Effects of Climate Change on Animal Health and Diseases. International Journal of Livestock Research 2: 15-24.

Schmallenberg virus (SBV): un patogeno emergente?

G. IOVANE, U. PAGNINI

Dipartimento di Medicina Veterinaria e produzioni animali - Settore Malattie Infettive
Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

Parole chiave: Schmallenberg virus, epidemiologia, patogenesi, diagnosi.

INTRODUZIONE - Il virus di Schmallenberg (SBV) è stato identificato per la prima volta nel novembre 2011 ed il nome deriva dalla località della Germania nord-occidentale dove sono stati accertati i primi casi d'infezione. Il virus è stato individuato quale possibile agente di una malattia dei ruminanti domestici, segnalata nell'estate del 2011 in Germania e Olanda, in seguito in novembre in Belgio, a gennaio 2012 nel Regno Unito ed a febbraio in Francia. La prima segnalazione, in allevamenti bovini, riferisce di un'aumentata incidenza di sintomi clinici aspecifici e autolimitanti quali calo della produzione lattea, depressione del sensorio, diarrea e inappetenza. In seguito sono stati segnalati casi di aborto, natimortalità e soprattutto malformazioni congenite. I test diagnostici iniziali hanno escluso le più frequenti malattie dei bovini con sintomatologia sovrapponibile e l'identificazione di quello che si sarebbe poi rivelato un nuovo agente virale è avvenuta, attraverso l'applicazione biotecnologica della metagenomica, tecnica diagnostica che si basa sul sequenziamento di un pannello molto ampio di un campione e sul suo confronto con le sequenze nucleotidiche riportate nei database genetici internazionali.

Il 16 febbraio 2012 la presenza di SBV è stata confermata anche in Italia, in un feto ritenuto nell'utero di una capra deceduta in un'azienda agricola in Provincia di Treviso. Altri casi sono poi seguiti in Sardegna e in Piemonte. Tra l'inverno 2012 e la primavera 2013 l'infezione si è allargata sia a nord che ad est in Europa, interessando così la maggior parte dei Paesi europei e coinvolgendo, fino ad aprile 2013, più di 8.000 allevamenti, soprattutto ovini e bovini (EFSA, 2013). Le specie interessate dall'infezione, fino a tale data, oltre ai bovini e agli ovicaprini, sono: bisonti, bufali, cervi, alci, alpaca, daini e caprioli.

EZIOLOGIA - Le prime informazioni conseguite dal sequenziamento genomico del virus e da analisi filogenetiche hanno permesso di collocare il nuovo agente eziologico nella famiglia *Bunyaviridae*, genere *Orthobunyavirus*, sierogruppo Simbu (Garigliany *et al.*, 2012).

I virus appartenenti alla famiglia *Bunyaviridae* sono arbovirus presenti soprattutto nelle aree tropicali. Le particelle virali sono sferiche, dotate di envelope, del diametro di 80-120 nm, termolabili, stabili a pH compreso tra 7 e 9 ma acidolabili, facilmente inattivabili dai raggi UV e dai solventi dei lipidi, dai detergenti e dai disinfettanti. Il virus di conseguenza non è capace di sopravvivere al di fuori di ospiti e/o vettori per lunghi periodi di tempo.(OIE, 2013).

Il nucleocapside è diviso in 3 segmenti a simmetria elicoidale, identificati in base alla loro dimensione e peso molecolare come L (*large*), M (*medium*) e S (*small*), costituiti da RNA a singolo filamento di senso negativo, chiuso alle estremità a formare strutture circolari, e dalla nucleoproteina N; ad essi si associa, inoltre, la proteina L (RNA-polimerasi). Le glicoproteine superficiali dell'envelope (Gn e Gc) sono proiezioni esterne, in forma di eterodimeri, che intervengono nel meccanismo di adesione e penetrazione del virus attraverso la fusione dell'envelope stesso con le membrane cellulari e rappresentano i determinanti antigenici tipo-specifici, che inducono la formazione di anticorpi inibenti l'emoagglutinazione e neutralizzanti (Doceul et al. 2013).

I virus appartenenti a questa famiglia, per la natura segmentata del genoma e qualora infettino una cellula contemporaneamente, hanno una forte tendenza ad interagire tra loro dando origine a nuovi tipi per ricombinazione genetica (così come avviene per il virus della Blue Tongue). I componenti dello stesso genere sono antigenicamente correlati tra loro, ma non ci sono cross-reazioni tra generi diversi. La famiglia *Bunyaviridae* comprende 5 generi: 1) *Phlebovirus*; 2) *Orthobunyavirus* 3) *Nairovirus*; 4) *Hantavirus*. I membri del genere *Orthobunyavirus*, a cui appartiene SBV, sono largamente distribuiti in Asia, Africa e Oceania. La trasmissione ad animali avviene prevalentemente attraverso insetti pungitori, principalmente *Culicoides spp*. e zanzare. Le infezioni umane sono rare e sono solo state descritte per alcuni virus (es. Oropouche e Iquitos virus).

Il genere *Orthobunyavirus* contiene oltre 170 diversi virus di pertinenza veterinaria e medica divisi in 18 sierogruppi, tra cui il sierogruppo Simbu che comprende almeno 25 virus e 7 specie (Akabane, Manzanilla, Oropouche, Sathuperi, Shamonda, Suni e virus Simbu).

L'analisi delle sequenze dell'RNA di SBV è stata in grado, di fornire informazioni utili sull'identità del virus, sulla sua natura e sulla sua origine e dimostrano che esso dovrebbe essere classificato come membro della specie Sathuperi ed è probabile che esso sia un antenato di Shav e non derivi da un suo riassortimento. Shav, al contrario, è probabilmente il frutto di un riassortimento comprendente i segmenti S e L di SBV e quello M di un altro virus (Goller *et al.*, 2012).

Pur considerando che ulteriori comparazioni genomiche di SBV con sequenze complete di altri membri del sierogruppo Simbu sono in corso, tali risultati potrebbero già essere alla base dello sviluppo di efficienti vaccini contro SBV.

TRASMISSIONE E PATOGENESI - Attualmente, la via di trasmissione principale di SBV non è perfettamente nota ma i dati epidemiologici esistenti finora sono in accordo con l'ipotesi che sia di natura vettoriale, tramite artropodi, anche in analogia a quanto avviene per altri virus del sierogruppo Simbu. Questa ipotesi è ulteriormente sostenuta dalla identificazione del virus in moscerini del genere *Culicoides. C. obsoletus* è molto probabilmente, il vettore di questo virus e le analisi eseguite sembrano suggerire una forte replicazione di SBV in questi insetti. Il principale fattore che influenza la trasmissione vettoriale potrebbe essere il cambiamento climatico verificatosi negli ultimi 40 anni in Europa, e soprattutto la temperatura ambiente: al di sotto di 10-15 °C il virus è probabilmente inattivo, ma a temperature più elevate replica velocemente all'interno del vettore (Anonimo, 2012c). Le evidenze disponibili ottenute, finora, attraverso infezioni sperimentali suggeriscono che la trasmissione orizzontale diretta per contatto, da animale ad animale, non si verifichi. È stata dimostrata, inoltre, la possibilità di infezione transplacentare (Garigliany *et al.*, 2012). Recentemente il *Friedrich-Loeffler-Institut* (FLI) ha, rilevato il genoma di SBV nello sperma di tori infetti. Se SBV possa essere trasmesso da sperma SBV-positivo è ancora, però, oggetto di indagine. Lo studio indica escrezione del virus nel liquido seminale in modo intermittente. È ancora poco chiaro per quanto tempo dopo la sieroconversione questa situazione possa persistere. Infine, l'ingestione di SBV non conduce all'infezione, ma il suo RNA è stato rilevato nelle feci e in

tamponi orali e nasali effettuati su animali infetti. Sono ancora necessarie, comunque, ulteriori indagini per confermare queste vie di trasmissione e per determinare tutte le specie di insetti implicate nella trasmissione virale.

Sicuramente, SBV presenta un breve periodo di viremia e ciò è concorde con il periodo di viremia osservato per il virus Akabane.

Recentemente alcuni ricercatori hanno dimostrato che l'RNA virale di SBV persiste nel sistema linforeticolare per almeno 5 settimane dopo l'infezione e che l'immunità alla re-infezione persiste per almeno due mesi.

SBV, come gli altri virus del sierogruppo Simbu, attraversa la placenta, infetta il feto e il suo sistema nervoso centrale e causa necrosi e/o arresto dello sviluppo della corteccia cerebrale (Garigliany *et al.*, 2012).

Il meccanismo patogenetico che causa l'aborto non è perfettamente noto, mutuando le conoscenze relative a quanto noto per altri virus del sierogruppo è presumibile che, in relazione alla fase gestazionale, l'evoluzione dal punto di vista clinico possa essere diversa. Un'infezione precoce, durante l'embriogenesi in particolare, potrà causare problematiche teratogene, mentre un'infezione più tardiva potrà causare problemi neurologici o disturbi funzionali nei neonati. È stato dimostrato che, per il virus Akabane, il periodo di determinazione teratogeno varia tra circa 28 e 36 (o fino a 56) giorni nelle pecore e tra 74 e 110 (o fino a 150) giorni nei bovini. Le infezioni che hanno luogo prima o dopo questo periodo potrebbero ancora causare morte embrionale / fetale o malformazioni ma solo più raramente. Se i feti sopravvivono fino alla nascita, a volte è possibile rilevare anticorpi precolostrali o SBV nel liquido amniotico o nel meconio (Conraths *et al.*, 2012).

Nel 2013 uno studio specifico sulla patogenesi di SBV ha dimostrato che esso replica nei neuroni del cervello e del midollo spinale di agnelli e vitelli con infezione congenita naturale, ma anche in quelli di topi infettati sperimentalmente (Varela *et al.*, 2013).

I neuroni del cervello sembrano essere il principale bersaglio per la replicazione virale nel feto in via di sviluppo. Le malformazioni e le deformità muscolari osservate negli agnelli e nei vitelli infetti sarebbero per lo più secondarie ai danni del sistema nervoso centrale (Varela *et al*., 2013).

Così come rilevato nei precedenti studi condotti sugli altri virus del sierogruppo Simbu, l'arco di tempo limitato in cui i feti ovini sembrano essere suscettibili all'infezione da SBV (dal 28° al 50° giorno di gestazione) coincide con lo sviluppo della barriera ematoencefalica. Negli ovini questa inizia a svilupparsi tra il 50° e il 60° giorno di gestazione e raggiunge il pieno sviluppo al 123°. In questo modo, il virus potrebbe avere un facile accesso al cervello del feto nel corso di un breve periodo di tempo: dal 28° giorno di gestazione, quando i placentomi si sono già sviluppati, fino al 50° giorno, quando la barriera ematoencefalica comincia a formarsi. Questo spiegherebbe perché la malattia negli animali adulti, dotati di una barriera ematoencefalica intatta, evolve in modo lieve e senza apparente sviluppo di lesioni del sistema nervoso centrale (Varela *et al.*, 2013).

Da questa analisi risulta evidente che la maggior parte delle infezioni degli agnelli nati malformati e risultati poi positivi per SBV nel 2012 doveva essere avvenuta tra la metà di settembre e l'inizio di novembre 2011 (Conraths *et al*., 2013). Questo periodo coincide con quello di incidenza massima delle infezioni da febbre catarrale degli ovini (sierotipo 8, BTV-8) rilevato negli anni 2006 e 2007 e con il picco massimo di insetti *Culicoides* infetti da BTV-8 rilevati, sempre nel 2007.

SINTOMATOLOGIA - I segni clinici conseguenti all'infezione da SBV variano in base alla specie animale colpita e all'età di infezione e, complessivamente, sono molto simili a quelli causati da infezioni dei virus Akabane e Aino. In particolare i bovini adulti hanno evidenziato una malattia acuta, lieve e transitoria, durante la stagione di diffusione dei vettori mentre le malformazioni fetali congenite hanno interessato oltre al bovino, gli ovini e i caprini, in caso di esposizione al virus delle madri nella prima metà della gravidanza (Conraths *et al*., 2013). Gli animali già infettatisi negli anni precedenti, inoltre, potrebbero essere protetti da ulteriori infezioni.

Sintomatologia nel bovino

Animale adulto - Per quanto riguarda i bovini adulti, l'infezione acuta da SBV è stata associata alla comparsa di sintomi clinici, quando presenti, piuttosto aspecifici quali:- febbre (> 40°C); - abbattimento; - inappetenza; - diarrea in alcuni casi; - drastica riduzione della produzione del latte fino al 50%.

Tale patologia è autolimitante e i segni clinici cessano nel giro di pochi giorni o in una o due settimane al massimo (Conraths et al., 2013)

Vitelli - Un'infezione durante il periodo critico della gravidanza, che nei bovini si colloca tra la 8ª e la 14ª settimana, può avere gravi effetti sullo sviluppo dell'embrione o del feto (Conraths et al., 2013).

Le manifestazioni ed i segni clinici sono vari: si può assistere alla nascita di vitelli non in grado di sopravvivere per l'incapacità, ad esempio, di succhiare, o di altri nati morti. La maggior parte degli animali nasce a termine, ma si segnalano anche aborti, feti mummificati o feti riassorbiti nelle prime fasi di gestazione (Conraths et al., 2013).

Sintomatologia negli ovini - Rispetto ai bovini, nei piccoli ruminanti le manifestazioni cliniche nell'adulto sono estremamente rare, ma la probabilità dell'evento aborto e natimortalità è molto più elevata.

Ovini adulti - La maggior parte degli allevatori non riporta la presenza di segni clinici nelle pecore adulte, se si esclude una lieve diarrea e un'ottusità del sensorio in alcuni soggetti. In alcuni casi è stata segnalata una diminuzione del numero di pecore gravide nel gregge. Questo suggerisce che l'infezione in questi soggetti si evolve in maniera subclinica (Conraths *et al*., 2013).

Agnelli - Negli ovini l'infezione sembra dunque manifestarsi quasi esclusivamente con le sole malformazioni fetali congenite (atassia, paralisi, atrofie muscolari, deviazioni del rachide, torcicollo, brachignatia, cecità e disturbi del sistema nervoso). Il rischio maggiore di infezione fetale, sempre per analogia con altri virus del sierogruppo Simbu, dovrebbe collocarsi tra i 28 e i 56 giorni di gravidanza (EFSA 2013).

Sintomatologia in altri animali - Le capre sono, in genere, meno frequentemente colpite rispetto a pecore e bovini. Nelle capre adulte si riportano: calo della produzione di latte e lieve diarrea. Nella maggioranza dei casi, però, l'infezione è asintomatica. I capretti presentano sintomi e lesioni simili a quelli di agnelli e vitelli. Non sono riportati sintomi clinici in altre specie.

EPIDEMIOLOGIA

Europa - Dopo il primo caso di SBV accertato nella cittadina di Schmallenberg (Germania) nel novembre del 2011, da cui ha origine il nome del virus, la diffusione è avvenuta in maniera progressiva da nord a sud e in senso concentrico molto rapidamente nella popolazione ovina e bovina e secondo dati recenti, anche i ruminanti selvatici possono avere un ruolo da ospite per questa malattia, come testimoniato dal FLI che ha riportato un caso di positività in un bisonte. Il rilievo dell'infezione in altri Paesi europei non ha tardato a presentarsi, e nuovi casi nei ruminanti sono stati registrati in Belgio, Olanda, Francia, Gran Bretagna, Lussemburgo, Italia e Spagna, come ci si può rendere conto dalle mappe epidemiologiche sottostanti.

Molteplici sono i quesiti inerenti l'SBV, soprattutto per quanto concerne l'ingresso nel territorio comunitario, in quanto tale affezione mai segnalata prima, presenta un percorso epidemiologico ben diverso rispetto a quello di altre malattie esotiche di cui si ha finora conoscenza. In conseguenza di ciò, numerose sono state le ipotesi e le comparazioni formulate con altre infezioni morbose al fine di raggiungere una spiegazione sull'accaduto. Paragonando l'SBV alla Blue Tongue (BT) in Europa, l'ingresso di quest'ultima nel periodo 1999-2000 ha avuto un tragitto completamente diverso, in quanto la zona di provenienza fu individuata nel bacino del Mediterraneo. Sovrapponendo però l'endemizzazione del sierotipo 8 del virus del-

la stessa BT con il virus SBV, ci si è resi conto che il percorso è sovrapponibile. Nel 2007-2008 si è assistito all'introduzione del sierotipo 8 BT, mai segnalato nel Mediterraneo, proprio a partire dal Belgio; di conseguenza, è stato possibile giungere ad una conclusione più o meno accreditata che l'SBV abbia iniziato con le stesse modalità e stia ripercorrendo le medesime tappe diffusive, interessando l'Inghilterra meridionale e il centro-nord Europa. Tutto questo ha fatto ipotizzare che l'ingresso della nuova malattia sia da ricercare in 2 possibili cause: o all'immissione di animali esotici, o all'introduzione di insetti attraverso l'importazione di vegetali, specificatamente fiori recisi dall'Africa. In seguito a tale evento si può dedurre come la globalizzazione degli scambi commerciali, se da un lato permetta un'apertura delle "frontiere", dall'altro possa essere responsabile dell'insorgenza improvvisa di nuove patologie causate da virus mai segnalati prima in territori indenni (EFSA, 2012).

Tutto questo è coerente con quanto è avvenuto nella diffusione del virus della BT, che ha lo stesso tipo di vettore invertebrato. Ciò è sostenuto anche dal fatto che l'andamento dell'epidemia di Schmallenberg, è concorde con il periodo di maggiore attività del vettore (tarda estate - autunno) e si interseca perfettamente con l'organizzazione della sincronizzazione delle età gestazionali delle diverse tipologie produttive.

Nelle prove di infezione sperimentali, infatti, è stato visto che la viremia di questo virus è molto breve ed è più duratura durante la fase gestazionale. Di conseguenza, perché il contagio avvenga in maniera più incisiva e duratura, è necessario che durante il periodo di attività del vettore ci siano animali in gestazione attraverso cui il virus si amplifichi e si espanda nell'ambito di quel determinato territorio. Ecco perché è molto avvalorata l'ipotesi di un impatto da non sottovalutare nella prossima stagione di attività del vettore, piuttosto che in seguito. Considerando, quindi, l'estensione geografica dell'area interessata dall'infezione non possiamo escludere un'epidemia in Europa da SBV in futuro (EFSA, 2012).

Gli effetti dell'infezione dovuta ai virus appartenenti al sierogruppo Simbu si hanno quando il virus entra in contatto con una popolazione animale suscettibile indenne, situazione che sembra verificarsi in Europa al momento attuale. In una popolazione dove la malattia è endemica invece, gli animali sembrano sviluppare un'immunità sufficiente a rendere l'infezione asintomatica e a ridurre i fenomeni di infezione transplacentare.

LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE SPECIE BOVINA - Nei vitelli si rileva: artrogriposi, micromelia, curvatura della colonna vertebrale (torcicollo, cifosi, lordosi o scoliosi), malformazioni craniche e brachignatia inferiore. Solo in un caso sono stati rilevati: ectopia cordis, ipoplasia polmonare e difetto del setto ventricolare (Conraths et al., 2013; Garigliany *et al.*, 2012). A livello del SNC nei vitelli è stata rilevata: ipoplasia cerebellare, idrocefalo associato a distruzione del neuro-parenchima adiacente, idranencefalia, ipoplasia del tronco cerebrale e midollo spinale (Conraths et al., 2013; Garigliany *et al.*, 2012). In Belgio è stato descritto un caso di un vitello di una settimana di vita con severe lesioni al sistema nervoso centrale (SNC) causate da SBV in utero. Alla necroscopia, il cervelletto, il tronco encefalico e il diencefalo erano normali per forma e volume. Tuttavia, gli emisferi cerebrali erano sostituiti da due cisti a parete sottile, contenenti fluido, con alcuni isolotti galleggianti e penisole corrispondenti alla corteccia conservata. C'era una variabile conservazione del cervello, totale liquefazione dei lobi occipitali e irregolare conservazione dei lobi temporali e frontali. L'aspetto anatomopatologico era compatibile con una severa porencefalia e idranencefalia. La colonna vertebrale non mostrava segni di scoliosi e il movimento delle articolazioni degli arti non era ridotto, per esempio non presentava artrogriposi.

LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE SPECIE CAPRINA - Nei capretti si è rilevato: artrogriposi, deformità vertebrali, ipoplasia polmonare, porencefalia, idranencefalia, scoliosi, brachignatia, aborti e nati morti.

DIAGNOSI - La diagnosi si può effettuare identificando il virus mediante PCR e isolandolo su colture cellulari, mentre le prove di sierologia che si possono effettuare sono: immunofluorescenza indiretta, siero neutralizzazione virale ed ELISA. La maggior parte delle madri dei vitelli malformati sono SBV anticorpo-positive e si sono infettate con SBV durante la gravidanza.

DIAGNOSI DIFFERENZIALE - Nei bovini adulti si deve fare diagnosi differenziale con: blue tongue, malattia emorragica epizootica (HD), afta epizootica, Bovine viral diarrhea - mucosal disease virus (BVD-MD), Border disease ed altri *Pestivirus*, rinotracheite infettiva del bovino (IBR), Rift Valley Fever (RVF), virus della febbre effimera del bovino e sostanze tossiche. Per i feti e nati malformati si deve fare diagnosi differenziale con: BVD-MD, bluetongue, Border disease virus, sostanze tossiche, fattori genetici e Akabane virus.

PCR (Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) - La PCR rileva la presenza del genoma del virus. Possono essere campionati: sangue prelevato da vacche malate (la viremia dura solo 5 giorni, quindi è consigliabile effettuare il prelievo quando l'animale ha febbre e gli altri sintomi) (Conraths et al., 2013), fluido addominale da vitello nato morto, cervello di agnelli malformati e sistema nervoso centrale (Garigliany *et al.*, 2012). Presso FLI (*Friederich Loeffler Institute*) è stato rilevato SBV con RT-qPCR nello sperma di tori, che avevano anticorpi contro SBV. Se SBV possa essere trasmesso da sperma contenente il virus è ancora da investigare.

COLTURE CELLULARI - SBV può crescere in linee cellulari di insetto e di mammifero. Le linee cellulari di insetto sono: *Culicoides variipennis* larvae cells (KC cells) e *Aedes albopictus* C6/36 cells.

Le linee cellulari di mammifero sono: BHK-21 (hamster) (che si sono dimostrate essere le migliori), Vero E6 (monkey), HuH7 (human), CPT-Tert (sheep). Nelle cellule BHK-21 vengono prodotte placche più chiare e più larghe, mentre nelle Vero E6 sono più piccole. La linea cellulare MDBK (bovine) sono meno efficienti per la crescita di SBV.

VIRUS NEUTRALIZZAZIONE - Un test di virus neutralizzazione (VNT) è stato usato per valutare la presenza di anticorpi neutralizzanti contro SBV in campioni di: siero di vacche, pecore e capre e campioni di fluido toracico di agnelli e vitelli abortiti o nati morti. (Doceul et al. 2013).

TEST ELISA - Tests iELISA e cELISA attualmente disponibili in commercio, sono stati variamente utilizzati per valutare la presenza di anticorpi contro SBV in campioni di: siero di vacche, pecore, capre e ruminanti selvatici e recentemente è stato introdotto un test indiretto ELISA per rilevare anticorpi nel latte contro SBV in bovini e ovini (Doceul et al. 2013).

RISCHIO ZOONOSICO - Almeno 30 orthobunyavirus sono stati associati a malattie nell'uomo. Alcuni membri del sierogruppo Simbu, come per esempio Oropuoche virus, possono causare zoonosi. Tuttavia, a causa della somiglianza con Shamonda virus e dell'assenza di descrizioni di segni clinici nell'uomo, attualmente il rischio per gli umani è valutato da basso a trascurabile.

PROFILASSI - Per i comportamenti da adottare in casi sospetti si rimanda alla Nota del Ministero della Salute del 4 aprile 2012. È consigliabile effettuare sorveglianza passiva per SBV anche sui feti e sui neonati dei cervidi trovati con lesioni sospette. Attualmente non sono disponibili trattamenti o vaccini per SBV in Italia, tuttavia è stata effettuata la registrazione di un vaccino inattivato in Olanda e Gran Bretagna.

Si è pensato anche di vietare l'importazione di vacche, pecore, capre gravide da aree dove è presente SBV verso aree dove non è presente la malattia, fino a quando non si capirà di più sulla trasmissione e sull'epidemiologia.

Il controllo di potenziali vettori può diminuire la trasmissione virale (Belle et al., 2012). È consigliabile trattare gli animali con prodotti farmaceutici ad azione repellente contro i parassiti esterni ogni due settimane durante il periodo compreso tra maggio e settembre, ed in particolare sugli animali gravidi almeno durante la gestazione a causa del rischio elevato di infezioni fetali. Bisognerebbe evitare di allevare gli animali vicino a zone palustri e boschive. È stato rilevato che la sieroprevalenza è inferiore negli animali tenuti permanen-

temente o durante la notte all'interno di ricoveri, rispetto a quelli tenuti sempre all'aperto. Portare gli animali in stalla dopo il tramonto, può aiutare a ridurre l'esposizione agli insetti pungitori.
Trappole per insetti possono essere utili per diminuire il numero di *Culicoides spp*. nelle stalle.

CONSIDERAZIONI - Si può parlare di epidemia da SBV in Europa? Si può sicuramente affermare che gli effetti più gravi dell'infezione dovuta ai virus appartenenti al sierogruppo Simbu si osservano quando tali virus entrano in contatto con una popolazione animale suscettibile indenne, situazione che si sta verificando in Europa. Inoltre il numero di specie di vettori potenzialmente in grado di trasmettere l'infezione sembra elevato. Considerando, quindi, l'estensione geografica dell'area interessata dall'infezione non possiamo escludere un'epidemia in Europa da SBV. Esiste la necessità di disporre di ulteriori dati, forniti da tutti i Paesi europei coinvolti, per monitorare la presenza del virus di Schmallenberg.
Comunque, benché permangano incertezze e lacune nei dati, è importante sottolineare che la situazione odierna evidenzia che, se si ipotizza il peggiore scenario possibile, il numero di ruminanti infetti raffrontato al numero complessivo di tali animali in ciascuno Stato membro risulta basso.
Sicuramente l'emergenza SBV è un avviso che orthobunyavirus sono una potenziale minaccia per il bestiame in Europa. Virus Akabane e Aino sono già presenti nella regione del Mediterraneo e potrebbero essere introdotti in Europa. Di conseguenza, il controllo delle popolazioni animali e vettoriali è fondamentale per monitorare l'insorgere di tali virus in Europa. L'identificazione del virus Batai, un orthobunyavirus appartenente al sierogruppo Bunyamwera, in popolazioni di maculipennis Anopheles catturati nella parte sud-occidentale della Germania nel 2009 illustra l'importanza di questo tipo di sorveglianza.

▮ Schmallenberg virus (SBV): an emerging pathogen?

Key words: Schmallenberg virus epidemiology, pathogenesis, diagnosis.

Bibliografia

Bell R., 2012. Prevention of Schmallenberg virus. Veterinary Record, 170: 212.

Conraths F.J., Peters M., Beer M., 2013. Schmallenberg virus, a novel orthobunyavirus infection in ruminants in Europe: Potential global impact and preventive measures. New Zealand Veterinary Journal, 61(2): 63-67.

Doceul V., Lara E., Sailleau C., Belbis G., Richardson J., Bréard E., Viarouge C., Dominguez M., Hendrikx P., Calavas D., Desprat A., Languille J., Comtet L., Pourquier P., Eléouët J.F., Delmas B., Marianneau P., Vitour D., Zientara S. 2013. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. Vet Res. 44:31.

Garigliany M.M., Bayrou C., Klijnen D., Cassart D., Jolly S., Linden A., Desmecht D., 2012. Schmallenberg virus: a new Shamonda/Sathuperylike virus on the rise in Europe. Antiviral Res, 95:82-87.

Goller K.V., Höper D., Schirrmeier H., Mettenleiter T.C., Beer M., 2012. Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. Emerging Infectious Diseases, 18:1644-1646.

OIE 2013 http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Schmallenberg_virus.pdf

EFSA 2012 – http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/2768.pdf

EFSA 2013 - http://www.efsa.europa.eu/it/supporting/doc/429e.pdf

Varela M., Schnettler E., Caporale M., Murgia C., Barry G., 2013. Schmallenberg Virus Pathogenesis, Tropism and Interaction with the Innate Immune System of the Host. PLoS Pathog 9(1): e1003133. doi:10.1371/journal.ppat.1003133.

Nota ministeriale 4 aprile 2012. Virus di Schmallenberg (SBV), dcfinizioni di caso sospetto e caso confermato. Attività straordinarie e tcmporanee di controllo sul territorio nazionale.

TAVOLA ROTONDA

Proprietà dietetico-nutrizionali dei prodotti ovi-caprini ed effetto sulla salute umana

Ruolo dei grassi nella dieta e le modificazioni del metabolismo lipidico ed energetico in modelli sperimentali e nell'uomo

S. BANNI, A. SIRIGU, D. DEMURTAS, S. LISAI, L. MUREDDA, E. MURRU*, G. CARTA*

Sezione di Fisiologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Cittadella Universitaria, S.S. 554, km. 4,500 09042 Monserrato, Cagliari - *uguale contributo

Gli acidi grassi svolgono diverse funzioni fisiologiche, come substrato energetico e come componente strutturale di membrana. Inoltre, permettono l'ancoraggio di proteine alla membrana tramite la loro acilazione, sono componenti fondamentali della barriera cutanea e del surfattante a livello degli alveoli polmonari, sono ligandi di diversi recettori nucleari e precursori di molecole biologicamente attive. Per svolgere queste funzioni in maniera ottimale i più di 400 diversi tipi di acidi grassi del nostro organismo devono essere presenti, in base alle contingenti condizioni fisiologiche, in un determinato range di concentrazione e di rapporti tra le diverse famiglie. Questo equilibrio tra i diversi acidi grassi è garantito da un loro apporto ottimale tramite la dieta. Infatti, i profili tessutali degli acidi grassi nell'organismo sono più fortemente influenzati dalla dieta rispetto agli altri macronutrienti quali proteine e carboidrati. Gli unici veri acidi grassi essenziali sono l'n-6 acido linoleico (LA) e l'n-3 alfa linolenico (ALA), in quanto l'organismo umano non possiede il corredo enzimatico per sintetizzarli, mentre è dotato degli enzimi per la formazione di acidi grassi altamente polinsaturi (HPUFA) n-6 a partire dal LA, di cui il più rappresentativo in membrana è l'acido arachidonico (ARA), e gli n-3 EPA e DHA che derivano dall'ALA (Fig. 1).

Esiste comunque la possibilità, per periodi relativamente brevi, di sopperire alla carenza grave di grassi nella dieta tramite la produzione endogena.

L'acido grasso primariamente prodotto in maniera endogena è l'acido palmitico che garantisce la sua concentrazione fisiologica nei fosfolipidi (PL) e la formazione di oleico. Questa avviene via elongazione a stearico e susseguente delta 9 desaturazione, che, dopo un'ulteriore desaturazione in posizione delta 6, elongazione e delta 5 desaturazione, produce il c20:3n9, chiamato mead acid (Fig. 1), dal nome di chi lo caratterizzò per primo (Mead and Slaton, 1956). Il mead acid, in caso di carenza da acidi grassi essenziali, sostituisce gli acidi grassi polinsaturi n-6 e n-3 con 20 o più atomi di carbonio nei PL, permettendo il mantenimento delle caratteristiche chimico-fisiche delle membrane ma non il ruolo fondamentale degli HPUFA di membrana come precursore di molecole lipidiche bioattive,

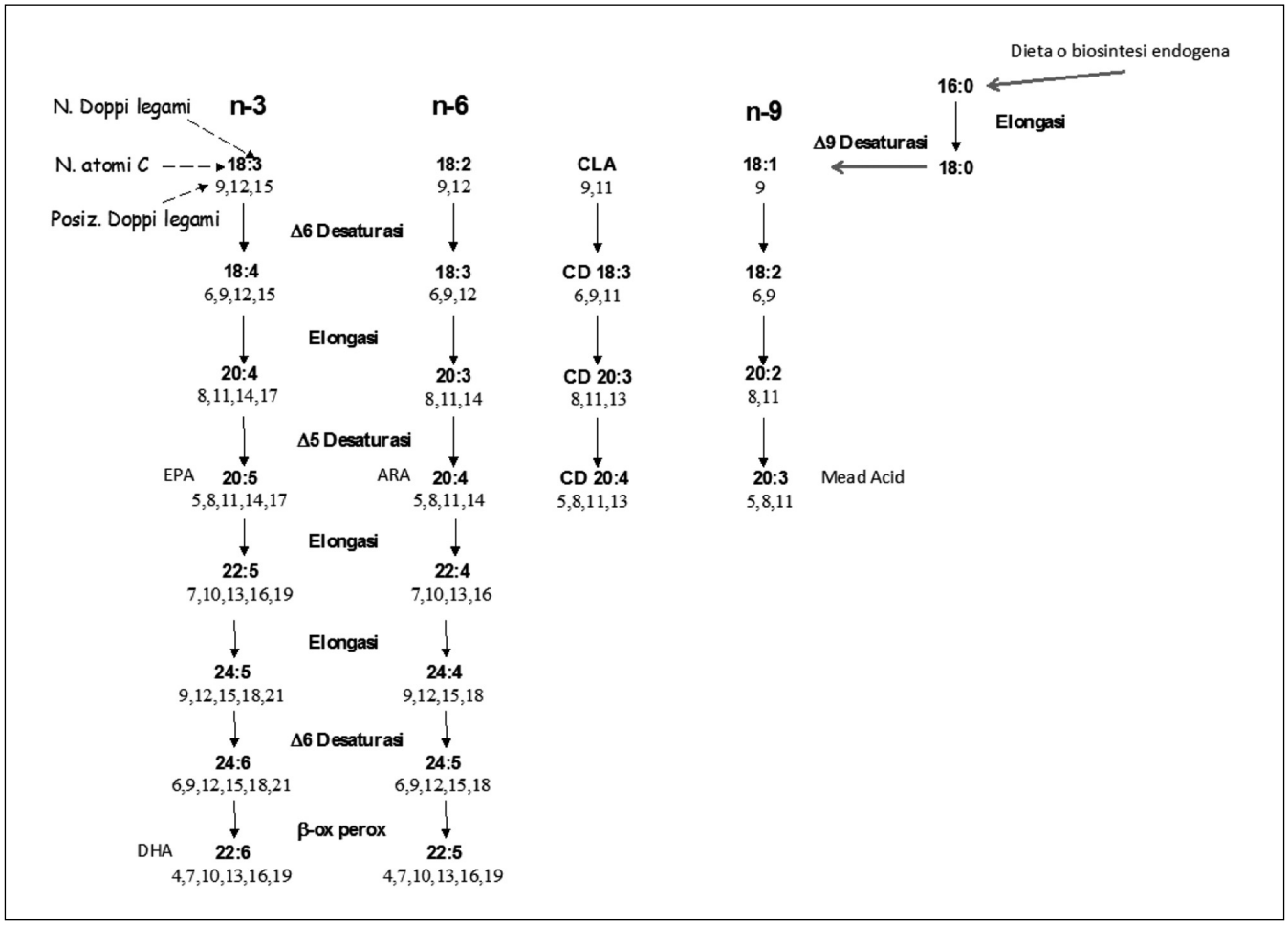


Figura 1 - Metabolismo degli acidi grassi insaturi delle famiglie n-3, n-6, n-9 e CLA.

provocando una serie di sintomi caratteristici da carenza di acidi grassi essenziali. Anche l'assunzione esclusiva di ALA e LA nei mammiferi onnivori, come l'uomo, non è sufficiente. Infatti, la capacità di biosintesi soprattutto per quanto riguarda EPA e DHA dall'ALA, è piuttosto limitata (Burdge, 2006), anche perché quest'ultimo è l'acido grasso maggiormente impiegato come substrato energetico (Burdge, 2006), quindi la sua concentrazione tissutale è piuttosto modesta per fungere da substrato per EPA e DHA. Pertanto, i mammiferi onnivori per raggiungere concentrazioni ottimali di EPA e DHA, devono assumerli direttamente attraverso la dieta e/o favorire con altre strategie nutrizionali la loro biosintesi dall'ALA. L'importanza degli HPUFA, ARA EPA e DHA deriva principalmente dal fatto che sono precursori di molecole bioattive quali eicosanoidi ossigenati (prostaglandine, trombossani, leucotrieni, resolvine, neuroprotettine, HPUFA idroperossidi) (Calder, 2011) ed endocannabinoidi con i loro congeneri (Banni and Di Marzo, 2010) (Fig. 2).

Gli eicosanoidi ossigenati sono coinvolti nel processo infiammatorio (Calder, 2011) mentre gli endocannabinoidi sono coinvolti nella regolazione sia a livello centrale che periferico, del metabolismo lipidico ed energetico (Calder, 2011). Il crocevia di queste classi di molecole lipidiche bioattive è il sistema PPAR, che consiste in una classe di recettori nucleari con diverse isoforme, la cui attivazione tramite queste molecole regola il metabolismo lipidico, energetico e la compartimentalizzazione del tessuto adiposo in base alle diverse condizioni fisio-patologiche (Desvergne and Wahli, 1999). Inoltre,

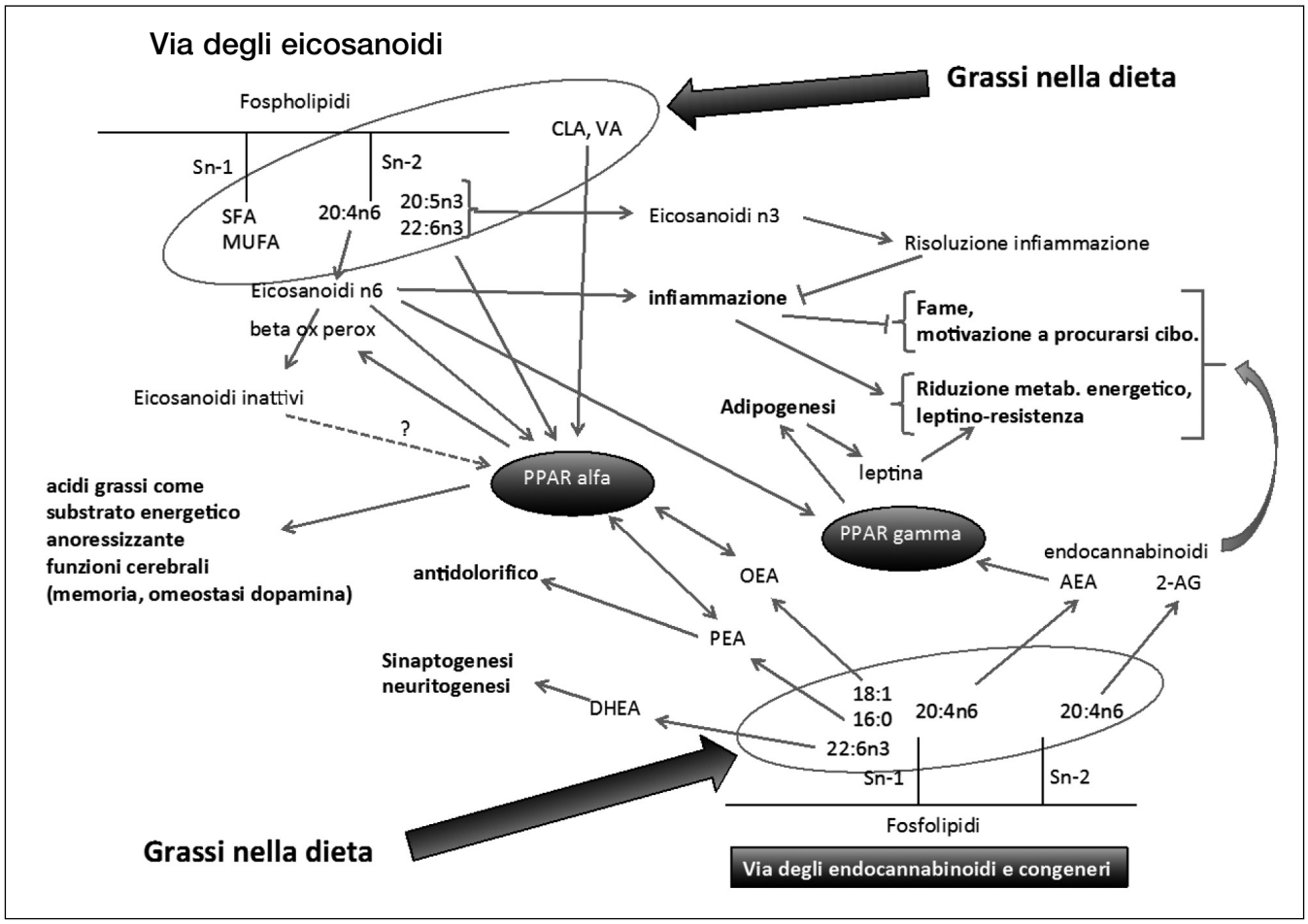


Figura 2 - Interazione tra via degli eicosanoidi, via degli endocannabinoidi e congeneri e PPAR.

Gli acidi grassi della dieta influenzano l'incorporazione degli acidi grassi dei fosfolipidi di membrana che fungono da substrato sia per gli eicosanoidi che per gli endocannabinoidi e congeneri. Gli eicosanoidi che derivano dall'arachidonico (20:4n6) sono proinfiammatori, mentre quelli che derivano dall'EPA e il DHA contribuiscono alla risoluzione dell'infiammazione (Calder, 2011). Il PPAR alfa è attivato dagli eicosanoidi, EPA e DHA (Desvergne and Wahli, 1999) oltre che dai congeneri degli endocannabinoidi palmitoiletanolammide (PEA) (Thabuis et al., 2008) e oleoiletanolammide (OEA)(Thabuis et al., 2008) che derivano rispettivamente dal palmitico e dall'oleico esterificati in posizione sn-1 dei fosfolipidi. L'induzione del PPAR alfa induce la biosintesi di PEA e OEA con un meccanismo di feed-back positivo (Melis et al., 2013). L'attivazione del PPAR alfa induce la beta ossidazione perossisomiale, la via catabolica principale per la degradazione degli eicosanoidi (Leung and Glauert, 1996). Il PPAR alfa inoltre induce la beta ossidazione degli acidi grassi incrementando l'uso dei grassi come substrato energetico (Contreras et al., 2013) e svolgendo un ruolo in diverse funzioni cerebrali (Melis et al., 2013). Gli endocannabinoidi anandamide (AEA) e 2-arachidonilglicerol (2-AG), hanno come precursore, rispettivamente, il 20:4n6 esterificato in posizione sn-1 e il 20:4n-6 esterificato in posizione sn-2 dei fosfolipidi. Gli eicosanoidi e l'endocannabinoide AEA inducono il PPAR gamma (Karaliota et al., 2009) che favorisce l'adipogenesi, incrementando quindi la produzione di leptina. Un eccesso di leptina circolante induce leptino-resistenza. Il PEA oltre che attivare il PPAR alfa si lega ai recettori TRPV1, svolgendo attività antiinfiammatoria e antidolorifica (Re et al., 2007). Il congenere dell'AEA che deriva dal DHA in posizione sn-1, il DHAEA, è stato recentemente dimostrato possedere attività di sinaptogenesi e neuritogenesi (Kim and Spector, 2013). Si può notare che la risposta fisiologica ottimale si ottiene con l'equilibrio tra i diversi acidi grassi incorporati nei fosfolipidi. Un eccesso di PUFA n-6 porterà ad un eccesso di eicosanoidi n-6, pertanto un'aumentata suscettibilità all'infiammazione e tempi più lunghi per la risoluzione, con un maggior rischio di infiammazione cronica. Inoltre, indurrà un aumento degli endocannabinoidi con incremento dell'introito calorico, riduzione del metabolismo energetico e induzione dell'adipogenesi che risulterà in un'aumentata adiposità e quindi maggior rischio di accumulo di grasso viscerale e conseguente sindrome metabolica.

è stato recentemente dimostrato che i PPAR hanno un'attività significativa sulla funzionalità cerebrale (Melis et al., 2013). Quindi, i grassi nella dieta permettono una risposta fisiologica ottimale ai diversi stimoli ambientali contribuendo al mantenimento dei sistemi omeostatici tramite la regolazione dei sistemi PPAR ed endocannabinoide (Fig. 2). Diversi studi hanno dimostrato che un apporto di EPA e DHA di circa 500 mg/d permette una risposta ottimale e previene diverse patologie dismetaboliche (Murru et al., 2013). Infatti, è stata dimostrata una chiara associazione tra n-3 HUFA score (concentrazione plasmatica di [(EPA + DHA)/(EPA+DHA+ tutti i PUFA con 20 o più atomi di carbonio e 3 o più doppi legami)*100] e riduzione del rischio cardiovascolare (Harris, 2008). Nostri dati non pubblicati mostrano che la popolazione italiana ha un n-3 HUFA score di circa 20-21 mentre il valore ottimale è di circa 28. La maniera più ovvia per aumentare questo valore è l'assunzione di EPA e DHA con i prodotti ittici. Dai nostri calcoli risulta che un n-3 HUFA score di 21 corrisponde ad una assunzione giornaliera 125 mg/d di EPA+DHA, quantità che si raggiunge con un apporto alimentare di prodotti ittici 3-4 volte al mese, mentre la frequenza raccomandata è di almeno 3 volte alla settimana. Recentemente abbiamo dimostrato che esistono altre strategie nutrizionali per elevare significativamente l'n-3 HUFA score. In diversi modelli sperimentali è stato dimostrato che un acido grasso inusuale prodotto nel rumine, l'acido linoleico coniugato (CLA), essendo un avido ligando del PPAR alfa è capace di attivare la beta ossidazione perossisomiale (Banni et al., 2004) necessaria per la sintesi del DHA a partire dall'ALA (Fig. 1). Inoltre, la beta ossidazione perossisomiale è anche la via catabolica degli eicosanoidi ossigenati (Leung and Glauert, 1996, Ferdinandusse et al., 2002) esercitando quindi un'azione antinfiammatoria. Pertanto, abbiamo ipotizzato che il CLA e il suo precursore vaccenico (VA), quando presenti in alte concentrazioni nella dieta, sono in grado di aumentare la biosintesi del DHA e quindi l'n-3 HUFA score. Inoltre, il CLA essendo metabolizzato similmente al linoleico (Mele et al., 2013) (Fig. 1) è in grado di diminuire la formazione e incorporazione dell'arachidonico (Banni, 2002) contribuendo all'aumento dell'n-3 HUFA score. I prodotti lattiero caseari posseggono naturalmente CLA e VA in quanto prodotti nel rumine. Inoltre, animali al pascolo aumentano naturalmente questi livelli poiché l'erba è ricca di ALA che viene trasformato dalla flora ruminale in VA, che per successiva metabolizzazione nei tessuti dell'animale si trasforma in parte in CLA. Quindi i ruminanti al pascolo e/o con l'apporto alimentare di ALA, producono un latte arricchito in ALA, CLA e VA (Nudda et al., 2007, Mele et al., 2011).

Per testare la nostra ipotesi, abbiamo eseguito uno studio clinico dove abbiamo alimentato 40 individui sani con diversi tipi di formaggio arricchiti in CLA e VA per 2 mesi. I risultati mostravano un aumento dei livelli plasmatici di CLA, VA e DHA e di conseguenza l'n-3 HUFA score (Manoscritto in preparazione). Per verificare se l'aumento del DHA era dovuto alla maggior concentrazione di CLA nei formaggi, abbiamo alimentato ratti con diverse concentrazioni di CLA e di ALA. I risultati mostravano che quando il rapporto tra CLA e ALA era di 3:1 si aveva la massima biosintesi di DHA, dimostrando quindi che il CLA era in grado di indurre la biosintesi di DHA a partire dall'ALA (manoscritto in preparazione). In studi precedenti in modelli sperimentali di obesità viscerale e su individui sovrappeso e obesi, abbiamo dimostrato che l'aumento dell'n-3 HUFA score riduceva i livelli degli endocannabinoidi e induceva un riequilibrio del metabolismo lipidico ed energetico (Pintus et al., 2013). Per valutare se l'eventuale aumento dell'n-3 HUFA score tramite l'assunzione di formaggio arricchito, era in grado di modificare il metabolismo lipidico tramite la modulazione del sistema endocannabinoide, abbiamo somministrato a individui lievemente ipercolesterolemici e leggermente sovrappeso, 90 g/d di pecorino arricchito naturalmente in ALA, CLA e VA. I risultati mostravano un aumento significativo di CLA, VA e ALA ma anche di EPA e veniva confermato un aumento significativo dell'n-3 HUFA score (Pintus et al., 2013). A questo aumento era associata una diminu-

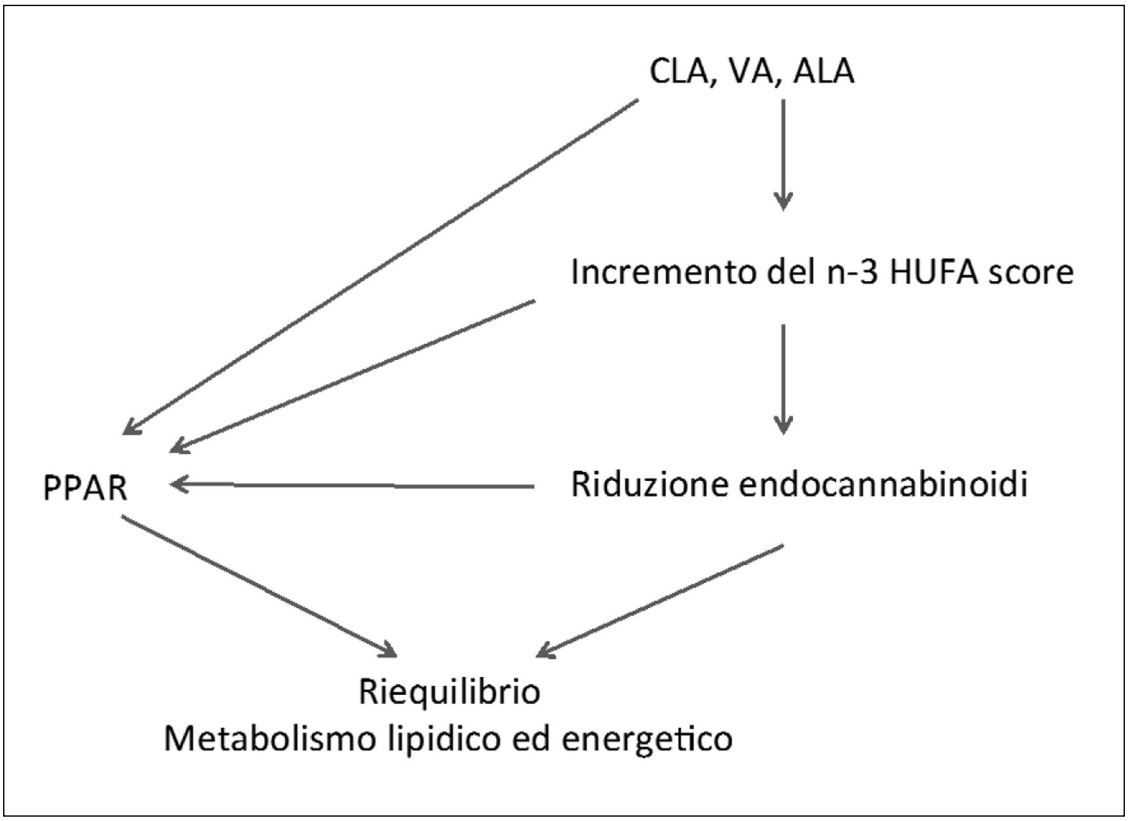


Figura 3 - Possibile meccanismo d'azione tramite il quale l'apporto alimentare di prodotti lattiero caseari arricchiti in CLA, VA e ALA induce un riequilibrio metabolico ed energetico in individui con dislipidemie e sovrappeso.

zione significativa dei livelli plasmatici dell'endocannabinoide anandamide e degli HPUFA idroperossidi. Inoltre, abbiamo riscontrato una diminuzione significativa del colesterolo LDL e del totale di circa il 7% (Pintus et al., 2013). Possiamo concludere che i prodotti lattiero caseari arricchiti naturalmente in CLA, VA e ALA concorrono all'aumento dell'n-3 HUFA score, indipendentemente dall'assunzione di EPA e DHA, e determinano una modulazione del sistema endocannabinoide e probabilmente del PPAR contribuendo al riequilibrio fisiologico del metabolismo energetico e lipidico (Fig. 3). Studi futuri valuteranno se CLA, VA e ALA posseggono, indipendentemente dalla capacità di incrementare l'n-3 HUFA score, attività nutrizionali specifiche tramite la modulazione dei sistemi PPAR ed endocannabinoide

Role of dietary fat and changes in lipid and energy metabolism in experimental models and humans

Bibliografia

Banni S (2002) Conjugated linoleic acid metabolism. Curr Opin Lipidol 13:261-266.

Banni S, Di Marzo V (2010) Effect of dietary fat on endocannabinoids and related mediators: Consequences on energy homeostasis, inflammation and mood. Mol Nutr Food Res 54:82-92.

Banni S, Petroni A, Blasevich M, Carta G, Angioni E, Murru E, Day BW, Melis MP, Spada S, Ip C (2004) Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. Biochim Biophys Acta 1682:120-127.

Burdge GC (2006) Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 75:161-168.

Calder PC (2011) Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. Eur J Pharmacol 668:S50-S58.

Contreras AV, Torres N, Tovar AR (2013) PPAR-alpha as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. Adv Nutr 4:439-452.

Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev 20:649-688.

Ferdinandusse S, Meissner T, Wanders RJ, Mayatepek E (2002) Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of leukotrienes. Biochem Biophys Res Commun 293:269-273.

Harris WS (2008) The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease. Am J Clin Nutr 87:1997S-2002S.

Karaliota S, Siafaka-Kapadai A, Gontinou C, Psarra K, Mavri-Vavayanni M (2009) Anandamide increases the differentiation of rat adipocytes and causes PPARgamma and CB1 receptor upregulation. Obesity (Silver Spring) 17:1830-1838.

Kim HY, Spector AA (2013) Synaptamide, endocannabinoid-like derivative of docosahexaenoic acid with cannabinoid-independent function. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 88:121-125.

Leung LK, Glauert HP (1996) Reduction of the concentrations of prostaglandins E2 and F2alpha, and thromboxane B2 in cultured rat hepatocytes treated with the peroxisome proliferator ciprofibrate. Toxicol Lett 85:143-149.

Mead JF, Slaton WH, Jr. (1956) Metabolism of essential fatty acids. III. Isolation of 5,8,11-eicosatrienoic acid from fat-deficient rats. J Biol Chem 219:705-709.

Mele M, Contarini G, Cercaci L, Serra A, Buccioni A, Povolo M, Conte G, Funaro A, Banni S, Lercker G, Secchiari P (2011) Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with extruded linseed: Effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability. Int Dairy J 21:365-372.

Mele MC, Cannelli G, Carta G, Cordeddu L, Melis MP, Murru E, Stanton C, Banni S (2013) Metabolism of c9,t11-conjugated linoleic acid (CLA) in humans. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 89:115-119.

Melis M, Carta G, Pistis M, Banni S (2013) Physiological role of peroxisome proliferator-activated receptors type alpha on dopamine systems. CNS Neurol Disord Drug Targets 12:70-77.

Murru E, Banni S, Carta G (2013) Nutritional Properties of Dietary Omega-3-Enriched Phospholipids. Biomed Res Int 2013:ID 965417.

Nudda A, Battacone G, Testone S, Pulina G (2007) Seasonal variation of conjugated linoleic acid (CLA) and n-3 fatty acids of goat milk fat and its transfer into cheese. J Dairy Sci 90:483-483.

Pintus S, Murru E, Carta G, Cordeddu L, Batetta B, Accossu S, Pistis D, Uda S, Ghiani ME, Mele M, Secchiari P, Almerighi G, Pintus P, Banni S (2013) Sheep cheese naturally enriched in alpha-linolenic, conjugated linoleic and vaccenic acids improves the lipid profile and reduces anandamide in the plasma of hypercholesterolaemic subjects. Br J Nutr 109:1453-1462.

Re G, Barbero R, Miolo A, Di Marzo V (2007) Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. Vet J 173:21-30.

Thabuis C, Tissot-Favre D, Bezelgues JB, Martin JC, Cruz-Hernandez C, Dionisi F, Destaillats F (2008) Biological functions and metabolism of oleoylethanolamide. Lipids 43:887-894.

Influenza dell'alimentazione sul miglioramento delle caratteristiche nutraceutiche dei prodotti ovini (latte, carne)

A. NUDDA, G. PULINA

Dipartimento di Agraria, Sezione di Scienze Zootecniche, Università di Sassari

Parole chiave: qualità nutrizionale del latte e della carne; acidi grassi; CLA e omega 3; alimentazione degli ovini.

INTRODUZIONE - La crescente attenzione dei consumatori per gli aspetti nutrizionali e salutistici, ha accresciuto nel mercato l'interesse nei confronti di alimenti con specifiche caratteristiche nutraceutiche, ovvero alimenti che oltre ai componenti nutritivi contengono principi attivi naturali con provati e riconosciuti effetti benefici sulla salute umana. Riguardo ai prodotti ovini, numerose ricerche si sono concentrate sull'arricchimento del latte e della carne con acidi grassi (AG) con specifiche proprietà salutistiche, tra i quali l'acido vaccenico (VA, C18:1 trans11, l'acido linoleico coniugato (C18:2 c9t11 **CLA**) e l'acido α-linolenico (C18:3n-3).

Il CLA è un acido grasso con numerose funzioni biologiche ma le più importanti sono quella anticancerogena (confermata per il momento solo su animali da laboratorio e su colture cellulari), antifiammatoria e anticolesterolemica. Il CLA è un componente funzionale del latte e della carne dei ruminanti, che rappresentano la principale fonte di CLA nella dieta dell'uomo. Il latte ovino, rispetto al latte bovino, contiene quantità 3-4 volte superiori di VA e c9t11 CLA (Nudda et al., 2005; Bailoni e Buccioni, 2014). Recentemente il CLA ed il VA hanno acquisito considerevole importanza in seguito agli incoraggianti risultati di studi condotti sull'uomo. Ad esempio, in soggetti clinicamente sani, il consumo di 200 g/settimana per 10 settimane di un pecorino con contenuti naturali di VA e RA (3,26 e 1,56 g/100 lipidi, rispettivamente) rispetto a un formaggio di controllo con concentrazioni di VA e RA inferiori (0,4 e 0,19 g/100 lipidi, rispettivamente) ha ridotto la concentrazione ematica di citochine proinfiammatorie in individui clinicamente sani (Sofi et al., 2010). Il consumo di 90 g/d per 3 settimane di pecorino naturalmente arricchito in CLA (2,5 g/100 g di grasso) rispetto al formaggio di controllo (1,5 g /100 g di grasso), ha ridotto la concentrazione ematica di colesterolo LDL del 7% in individui ipercolesterolemici, accompagnato da una marcata riduzione della concentrazione ematica di un endocannabinoide chiamato anandamide (Pintus et al., 2013). Fortunatamente, il processo di caseificazione non sembra alterare il profilo acidico del latte; pertanto le concentrazioni di AG nel grasso dei prodotti lattiero-caseari dipendono principalmente dal contenuto di acidi grassi del latte crudo non trattato (Nudda et al., 2005). Tra i prodotti ovini, anche la carne dell'agnello è interessante dal punto di vista nutrizionale. Questa carne è la prima ad essere raccomandata dai pediatri italiani per lo svezzamento dei neonati, in quanto considerata potenzialmente meno allergenica rispetto ad altre carni rosse. Inoltre, la carne dell'agnello da latte ha un contenuto lipidico mediamente inferiore al 3%, con una composizione acidica caratterizzata dalla presenza di buone quantità di PUFAn-3 quali l'acido linolenico, l'acido eicosapentenoico (EPA), docosapentenoico (DPA) e docosaesaenoico (DHA) e di elevate quantità di CLA c9t11 (Nudda et al., 2011).

Tra i fattori di variazione del CLA, il tipo di alimentazione è quello che incide maggiormente sulla quantità e sulla composizione acidica del grasso nel latte e nella carne ovina. I principali fattori alimentari che influenzano la concentrazione di CLA nei prodotti ovini sono l'uso di integratori di fonti lipidiche, il rapporto concentrato/foraggio e l'impiego del pascolo e del foraggio fresco nella dieta degli animali.

Effetto del pascolo - L'erba verde rappresenta una eccellente fonte di C18:3n-3 ed è stato dimostrato che è una delle migliori strategie alimentari per spostare il profilo acidico del latte e della carne verso uno spettro più salutistico.

Gli effetti positivi del pascolo sul contenuto di C18:3n-3, VA e CLA nel latte e nella carne sono legati all'elevato contenuto di C18:3n-3 nelle erbe verdi, che è parzialmente bioidrogenato in VA nel rumine e parzialmente convertito in c9t11 CLA nei tessuti, compreso quello mammario, per azione dell'enzima stearoil-CoA desaturasi, conosciuto anche come delta9 desaturasi. Il profilo acidico del grasso del latte è stato migliorato, aumentando sia la disponibilità di pascolo (Nudda et al, 2003) che scegliendo specifiche essenze foraggere (Addis et al., 2005). Infatti, nelle altre aree del Mediterraneo, dove le pecore da latte vengono alimentate prevalentemente al pascolo, le concentrazioni di CLA, VA e C18:3n-3 nel grasso del latte sono più alte nel periodo primaverile, in corrispondenza della maggiore disponibilità quanti-qualitativa dell'erba, e diminuiscono con l'avanzare dello stadio di maturazione dell'erba (Nudda et al., 2005).

Le specie vegetali presenti nel pascolo possono avere un effetto marcato sul profilo acidico del latte. I pascoli ricchi di leguminose sono associati con più alti livelli di CLA e C18:3n-3 rispetto a pascoli di graminacee (Addis et al., 2005). Essenze particolari, come il *Chrysanthemum coronarium* L. hanno favorito la presenza di elevate quantità di CLA nel grasso di latte, mentre l'assunzione di *Hedysarum coronarium* L. ha aumentato notevolmente il contenuto di C18:3n-3 nel latte, raggiungendo oltre i 3 g/100 g di grasso (Addis et al., 2005).

Anche l'altimetria delle aziende, a cui corrisponde una differente disponibilità e composizione di erba da pascolo, è in grado di influenzare le caratteristiche nutrizionali del grasso del latte (Fig. 1). Ad esempio, il contenuto in CLA c9t11 è risultato maggiore nel latte degli animali allevati in pianura, probabilmente per la maggiore presenza di pascoli con essenze foraggere coltivate.

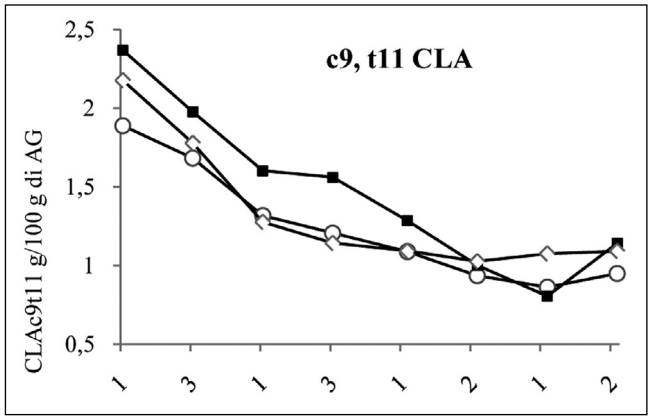


Figura 1 - Andamento del contenuto in CLA nel latte di pecora di razza Sarda allevata in pianura (■), collina (◇) e montagna (○).

L'alimentazione delle pecore al pascolo è anche responsabile dell'aumento dei contenuti di CLA e C18:3n-3 nel grasso intramuscolare della carne di agnelli allattati naturalmente (Nudda et al., 2013).

Il contenuto in acidi grassi di interesse nutrizionale, con particolare riferimento agli acidi grassi a catena lunga della famiglia degli omega3 e del CLA, nella carne di pecora di razza Sarda alimentata al pascolo e degli agnelli da latte, è riportato in Tab. 1. Possiamo vedere come la composizione della carne degli agnelli da latte sia caratterizzata, rispetto alle pecore adulte, da un maggior contenuto di acidi grassi a catena lunga della famiglia degli omega3, per il maggior rapporto fosfolipidi/trigliceridi nel grasso intramuscolare degli animali giovani rispetto a quelli adulti e/o di maggiore peso.

Effetto del rapporto foraggio:concentrato e del tipo di carboidrati - Il rapporto foraggio:concentrato non è efficiente nel modificare il contenuto in CLA nel latte ovino. Infatti, pecore alimentate con diete contenenti un rapporto foraggio:concentrato 75:25 e 60:40 ha manifestato solo piccole variazioni nella concentrazione di VA e CLA nel latte (Antongiovanni et al., 2004; Mele et al., 2006). In pecore alimentate con diete contenenti alto (430 g/kg di SS) o basso (280 g/kg di SS) contenuto in carboidrati non strutturali (NFC), il latte degli animali alimentati con alto NFC ha mostrato un più alto contenuto in VA e *cis*-9, *trans*-11 CLA (Nudda et al., 2004), probabilmente per una più lenta bioidrogenazione e un più alto "escape" ruminale degli acidi grassi insaturi.

Supplementazione con oli vegetali - Questa strategia alimentare è particolarmente utile quando la dieta è costituita da erba secca o foraggi conservati.

Il contenuto nel latte e nella carne di acidi grassi di interesse nutrizionale è influenzato dal contenuto lipidico della dieta, dalla fonte lipidica utilizzata e dalla forma fisica del supplemento.

Il contenuto in CLA è influenzato positivamente dalla dose di grassi aggiunti nella razione. Ad esempio, utilizzando i dati di differenti esperimenti (Nudda et al., 2014), è stata trovata una relazione lineare e positiva (R2 = 0,78) tra la quantità di supplemento lipidico ricco in acido linoleico (C18:2n-6) e in C18:3n-3 ed il contenuto di CLA nel latte. In particolare, un contenuto di latte CLA superiore a 2 g/100 g di grasso, ma inferiore a 3 g/100 g di grasso è stato raggiunto con un apporto lipidico nella dieta tra 50 e 100 g/d (ottimale la dose di 70 g/d/capo).

Invece, una concentrazione di CLA nel latte superiore a 3 g/100 g di grasso (cioè, 3,44 g/100 g di grasso) è stato raggiunto con una dose molto elevata di olio di soia (140 g/d) associato ad una dieta ricca di concentrato (Fig. 2).

Questi valori di CLA potrebbero essere la conseguenza di una inferiore bioidrogenazione ruminale del C18:2n-6 e un più alto flusso ruminale e duodenale degli intermedi della bioidrogenazione, soprattutto il trans11 C18:1.

Lino, soia, cartamo e girasole sono le fonti vegetali di acidi grassi insaturi più comunemente utilizzate per migliorare i contenuti in CLA e AG insaturi nel grasso di latte, ma i loro effetti dipendono dalla dose utilizzata.

La supplementazione di semi di lino ha aumentato il contenuto di VA, CLA e PUFAn-3, senza influenzare negativamente la produzione e la composizione del latte (Mele et al., 2011). La supplementazione con olio di soia o olio di girasole è ritenuta generalmente più efficace dell'olio di lino, per aumentare il contenuto di CLA nella carne, nel latte e nel formaggio di pecora. Tuttavia l'impiego del lino consente di aumentare contemporaneamente sia le concentrazioni di CLA che di C18:3 n3.

Questo suggerisce che la bioidrogenazione ruminale degli AG insaturi della dieta è più completa in pecore alimentate con lino che con olio di soia e quindi il flusso di VA e CLA verso l'intestino è maggiore negli ovini alimentati con diete integrate con oli ricchi in C18:2n-6 che in pecore alimentate con diete ricche di C18:3n-3. Inoltre, il CLA nel latte e nella carne origina in parte come prodotto intermedio del processo di bioidrogenazione ruminale del C18:2n-6, e principalmente mediante sintesi endogena nella ghiandola mammaria o nel tessuto adiposo a partire dal VA per azione dell'enzima Delta-9-desaturasi.

Tuttavia l'impiego del lino consente di aumentare contemporaneamente sia le concentrazioni di CLA che di C18:3 n3, con conseguente miglioramento nutrizionale del rapporto n3/n6.

La supplementazione lipidica è generalmente più efficace nell'aumentare la concentrazione di CLA, nella forma di olio rispetto ai semi. Per esempio, 70 g olio di lino (Bodas et al., 2010) è stato più efficace nell'aumentare il c9t11 CLA rispetto a 70 g di grasso proveniente da lino estruso (Gómez-Cortés et al., 2014). Questo probabilmente perché l'olio presente nel seme intero è rilasciato gradualmente mentre se somministrato come olio libero è immediatamente disponibile nel rumine.

Inoltre, le fonti lipidiche trattate con processi di estrusione, schiacciamento, micronizzazione, oppure i semi tostati, sembrano essere più efficienti nell'aumentare il contenuto in CLA nei prodotti rispetto ai semi non trattati, probabilmente perché il seme non trattato disperde il suo contenuto lipidico nel rumine più lentamente e in maniera meno completa rispetto ai semi trattati, con conseguente minore impatto sull'ambiente ruminale (Mughetti et al., 2007).

La supplementazione di lino estruso a pecore di razza Sarda alimentate su pascoli con erba secca e matura, ha comportato un aumento del contenuto in CLA e C18:3n-3 sia nel latte che nel formaggio Fiore Sardo prodotto con quel latte (Tab. 2).

Tabella 1 - Profilo acidico della carne di pecore di razza Sarda e dell'agnello da latte.

Acidi grassi	Pecora	Agnello da latte
C18:0	18.2	13.2
C18:1 *cis* - 9	40.0	33.8
C18:1 *trans* - 11 (VA)	2.0	2.1
C18:2 *n*-6 (LA)	4.3	6.5
C18:2 *cis9trans11* (CLA)	0.9	1.4
C18:3 *n*-3 (ALA)	0.9	1.5
C20:4 *n*-6 (AA)	0.1	2.2
C20:5 *n*-3 (EPA)	0.07	0.92
C22:5 *n*-3 (DPA)	0.18	1.20
C22:6 *n*-3 (DHA)	0.18	0.77
n-6/*n*-3	4.1	2.6

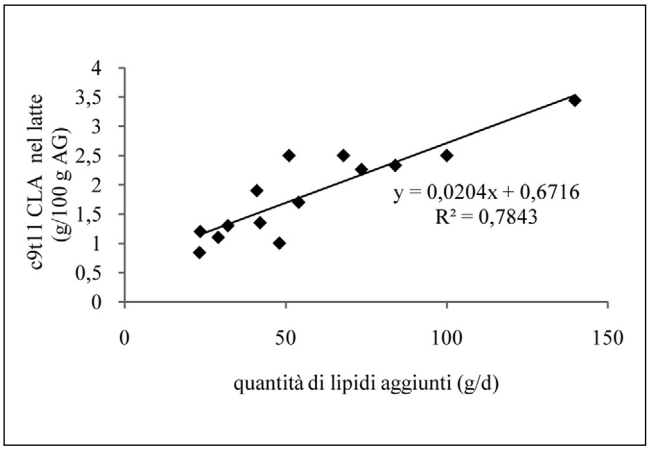


Figura 2 - Relazione tra la quantità di lipidi aggiunti nella dieta (g/capo/d) e il contenuto in c9t11 CLA nel latte di pecora (dati di esperimenti di diversi autori citati da Nudda et al., 2014).

Tabella 2 - Profilo acidico del latte e del formaggio di pecore al pascolo su erba secca senza integrazione (CON) o con supplementazione di lino estruso (LIN).

	Latte		Formaggio	
Acidi grassi	CON	LIN	CON	LIN
Saturi	61.4	56.6	62.5	59.4
Monoinsaturi	32.4	34.9	30.5	31.7
PUFA	6.2	8.6	7.0	8.8
n6/n3	2.2	2.6	2.1	2.2
C18:3n-3	0.8	1.1	1.0	1.3
CLA cis9trans11	1.0	2.2	1.6	2.3
CLA totale	1.6	2.8	2.2	3.0

Fonti di oli marini - Tra tutti i supplementi lipidici, gli oli marini risultano essere quelli che danno la più alta concentrazione di CLA, VA e AG omega-3 nel latte di pecora. Infatti, olio di pesce protetto, somministrato in dosi di 30 e 45 g/d aumenta marcatamente il contenuto in CLA nel latte di pecora (Mozzon et al., 2002). Nonostante sia povero in CLA, l'efficacia dell'olio di pesce nell'aumentare il VA e CLA nel latte è dovuto alla inibizione della riduzione del VA in 18:0 da parte dei batteri ruminali. La supplementazione con oli marini rumino-protetti, ricchi in acido eicosapentaenoico (EPA; C20:5n-3) e docosaesanoico (DHA; C22:6n-3), è stata in grado di aumentare notevolmente la concentrazione di questi acidi grassi a catena lunga nel grasso del latte e della carne rispetto a quella degli animali che non hanno avuto integrazione, sebbene l'entità di trasferimento dagli alimenti al latte sia molto limitata. Purtroppo, l'arricchimento del latte in PUFA omega-3 a catena lunga acidi, come EPA e DHA, è difficile, a causa dell'elevato livello di bioidrogenazione di questi FA nel rumine. Nelle pecore, è stato riscontrato nel latte un aumento lineare dei contenuti in EPA (+425%) e DHA (+188%) all'aumentare della dose di alghe da 23.5 g/d a 94 g/d nella dieta, mentre questi FA non sono stati rinvenuti nel latte del gruppo di controllo (Papadopoulos et al., 2002).

Impiego dei tannini - Differenti esperimenti (vedi Nudda et al., 2014) che hanno testato l'impiego di tannini di castagno e di quebracho, singolarmente o combinati, hanno evidenziato che questi non sono una strategia alimentare efficace per aumentare la concentrazione di CLA e VA nel grasso del latte, probabilmente per l'effetto depressivo dei tannini sull'attività microbica ruminale e sui processi di bioidrogenazione ruminale.

In conclusione, l'alimentazione è la principale strategia per migliorare la qualità nutrizionale del grasso del latte e della carne ovina. Questa review, sintetizza le numerose strategie alimentari finalizzate a migliorare le proprietà nutraceutiche del latte, dei prodotti lattiero-caseari e della carne di agnello.

Feeding strategies to enhance ovine milk and meat nutritional properties

Key words: nutritional quality of milk and meat, fatty acid, CLA and PUFAn-3; sheep nutrition.

Bibliografia

Addis M.; Cabiddu A.; Pinna G.; Decandia M.; Piredda G.; Pirisi A. and Molle G. 2005. Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid cis-9, trans-11. J. Dairy Sci.:3443-3454.

Antongiovanni M.; Mele M.; Buccioni A.; Petacchi F.; Serra A.; Melis M. P.; Cordeddu L.; Banni S. And Secchiari P. 2004. Effect of forage/concentrate ratio and oil supplementation on C18:1 and CLA isomers in milk fat from Sarda ewes. J. Anim. Feed Sci. 13 Suppl. 1:669-672.

Bailoni L., Buccioni A. 2014. Il latte e i prodotti lattiero-caseari: caratteristiche chimiche e nutrizionali. In Alimenti di origine animale e salute. pp 91-117. Ed. Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia.

Bodas, R.; Manso, T.; Mantecón, A.R.; Juárez, M.; De La Fuente, M.A. and Gómez-Cortés, P. 2010. Comparison of the fatty acid profiles in cheeses from ewes fed diets supplemented with different plant oils. J. Agr. Food Chem. 58:10493-10502.

Gómez-Cortés P.; Gallardo B.; Mantecón A.R.; Juárez M.; de la Fuente M.A. and Manso T. 2014. Effects of different sources of fat (calcium soap of palm oil vs. extruded linseed) in lactating ewes' diet on the fatty acid profile of their suckling lambs. Meat Sci. 96:1304-1312.

Mele M.; Buccioni A.; Petacchi F.; Serra A.; Banni S.; Antongiovanni M. and Secchiari P. 2006. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. Anim. Res. 55:273-285.

Mele M.; Contarini G.; Cercaci L.; Serra A.; Buccioni A.; Povolo M.; Conte G.; Funaro A.; Banni S.; Lercker G. and Secchiari P. 2011. Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with extruded linseed: Effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability. International Dairy Journal 21:365-372.

Mozzon M.; Frega N. G.; Fronte B. and Tocchini M. 2002. Effect of dietary fish oil supplements on levels of n-3 polyunsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in ewe milk. Food Techn. Biotech. 40:213-219.

Mughetti L.; Acuti G.; Antonini C.; De Vincenzi S.; Olivieri O. and Trabalza Marinucci M. 2007. Effects of feeding raw or extruded linseed on the ruminal ecosystem of sheep. It. J. Anim. Sci. 6, Suppl. 1:327-329.

Nudda A.; Fancellu S.; Porcu F.; Boe F. and Cannas A. 2004. Responses of milk fat composition to dietary non-fiber carbohydrates in Sarda dairy sheep. J. Dairy Sci. 87, Suppl. 1:310.

Nudda A; McGuire M.A.; Battacone G and Pulina G. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta. J. Dairy Sci. 88:1311-1319.

Nudda A.; Mele M.; Battacone G.; Usai M.G. and Macciotta N. P. P. 2003. Comparison of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and goats with the same dietary regimen. It. J. Anim. Sci. 2 Suppl. 1:515-517.

Nudda A., Battacone G., Boaventura O.N., Cannas A., Francesconi A.H.D., Atzori A.S., Pulina G. 2014. Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. Rev. Bras. Zootec. (accettato).

Nudda A, Mcguire Mk, Battacone G, Manca Mg, Boe R, Pulina G (2011). Documentation of Fatty Acid Profiles in Lamb Meat and Lamb-Based Infant Foods. J. Food Sci., 76: H43-H47.

Nudda A, Battacone G, Boe R, Rassu SP, Pulina G 2013. Influence of outdoor and indoor rearing system of suckling lambs on fatty acid profile and lipid oxidation of raw and cooked meat. It. J. Anim. Sci. 12:459-467.

Papadopoulos G.; Goulas C.; Apostolaki E. and Abril R. 2002. Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. J. Dairy Res. 69:357-365.

Pintus S.; Murru E.; Carta G.; Cordeddu L.; Batetta B.; Accossu S.; Pistis D.; Uda S.; Ghiani M. E.; Mele M.; Secchiari P.; Almerighi G.; Pintus P. and Banni S. 2013. Sheep cheese naturally enriched in α-linolenic, conjugated linoleic and vaccenic acids improves the lipid profile and reduces anandamide in the plasma of hypercholesterolaemic subjects. Br. J. Nutr. 109:1453-1462.

Sofi F.; Buccioni A.; Cesari F.; Gori A. M.; Minieri S.; Mannini L.; Casini A.; Gensini G. F.; Abbate R. and Antongiovanni M. 2010. Effects of a dairy product (pecorino cheese) naturally rich in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid on lipid, inflammatory and haemorheological variables: a dietary intervention study. Nutr Metab Cardiovasc Dis 20:117-124.

Polimorfismi genetici lattoproteici caprini e ovini ed effetti sulla qualità del latte

S. CHESSA[1], A.M. CAROLI[2]

[1] Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR, Lodi
[2] Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli studi di Brescia

Parole chiave: caprini, ovini, lattoproteine, varianti genetiche.

INTRODUZIONE - La produzione mondiale di latte al 2012 ammonta a circa 754.000 tonnellate (FAO, 2014) così ripartite: l'83% è latte bovino, il 12,9% bufalino, il 2,37% caprino, l'1,34% ovino e lo 0,37% di cammella. In Europa, principale produttore mondiale di latte, vengono prodotti il 14,21% del latte caprino e il 29,79% del latte ovino totali. L'Italia si colloca al decimo posto nella classifica europea della produzione di latte caprino (1,10%) e al quarto posto (13,47%) in quella di latte ovino. Secondo i dati FAO la popolazione mondiale crescerà fino a superare i 9 miliardi di individui entro il 2050, determinando un incremento della domanda di cibo, e soprattutto di proteine animali (+25%). Sebbene il latte vaccino sia quello più diffuso nel mondo, il latte ovino e caprino sono una fonte di proteine che può aiutare a rispondere a questa richiesta. Queste specie hanno, infatti, un'importanza strategica poiché costituiscono già la principale fonte di proteine animali (latte e carne) per le popolazioni rurali dei Paesi in via di sviluppo fornendo un alimento completo e bilanciato facendo uso di risorse limitate. Inoltre la domanda di prodotti ovi-caprini è in costante aumento poiché ad essi i consumatori associano un'immagine di salubrità e produzione a basso impatto ambientale.

La ricerca si sta attivando per rispondere alle sfide proposte da questo quadro mondiale dando sempre maggiore attenzione a queste specie e alla qualità dei loro prodotti intesa in senso globale, ovvero considerando parametri sanitari, nutrizionali, tecnologici e sensoriali. Tutti questi aspetti dipendono da numerosi fattori e dalle loro interazioni, e sono strettamente legati ai principali componenti del latte (grasso, proteine e lattosio), così come ai microelementi in esso contenuti (minerali, vitamine, colesterolo e terpeni) (Morand-Fehr et al., 2007). Considerata la sua importanza a livello mondiale, la ricerca nella specie bovina è stata molto più attiva di quanto non lo sia stata nei piccoli ruminanti.

Nel database OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals, http://omia.angis.org.au) il numero di geni contenenti varianti causative di diversi fenotipi nel bovino (93) è di oltre due volte superiore a quello nella pecora (44) e oltre undici volte rispetto quello nella capra (8).

In generale la ricerca sulle mutazioni causative dei fenotipi si è sviluppata molto più nella pecora che nella capra (Luhken, 2012), ma questo trend s'inverte se si considerano i geni delle lattoproteine. È ben nota l'influenza che la variabilità dei geni delle lattoproteine esercita sulle caratteristiche nutrizionali e tecnologiche del latte bovino (Caroli et al., 2009).

Il presente lavoro ha come obiettivo quello di fare il punto della situazione sulla variabilità genetica delle lattoproteine ovine e caprine e dei loro effetti sulle caratteristiche nutritive e tecnologiche del latte di queste due specie.

POLIMORFISMO GENETICO DELLE CASEINE - Le proteine del latte dei ruminanti sono costituite per il 95% dalle 4 caseine, α_{S1}-, β-, α_{S2}-, κ-caseina, e da due sieroproteine, l'α-lattoalbumina e la β-lattoglobulina. Le 4 caseine dei ruminanti costituiscono l'80% delle lattoproteine e sono codificate da altrettanti geni (rispettivamente *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* e *CSN3*) collocati sul cromosoma 6 sia nella specie caprina, sia in quella ovina. Questi geni sono caratterizzati da un'elevata variabilità. Considerando tutte le varianti, comprese quelle non completamente caratterizzate e quelle sinonime, si trovano descritte in letteratura un totale di 81 varianti (Hayes et al., 2006; Garro et al., 2012; Giambra & Erhardt, 2012; Corral et al., 2013; Mestawet et al., 2013; Selvaggi et al., 2014) così distribuite: 23 varianti di α_{S1}-caseina caprina e 10 ovina, 9 di β-caseina caprina e 4 ovina, 7 di α_{S2}-caseina caprina e 9 ovina, 16 di κ-caseina e 3 ovina (Tab. 1 e Tab. 2). La maggior parte delle mutazioni causative ufficialmente riconosciute in capra e pecora sono singole sostituzioni nucleotidiche (SNP), e più raramente indel (Luhken, 2012). Anche le mutazioni che caratterizzano le varianti genetiche delle caseine sono prevalentemente SNP, e in particolare mutazioni non-sinonime: 42 delle 81 varianti totali si distinguono dalle 8 di riferimento per 1 (19 varianti), 2 (16 varianti), 3 (4 varianti) o 4 (3 varianti) cambiamenti amminoacidici. Le varianti caratterizzate da 4 differenze amminoacidiche sono tutte di κ-caseina caprina (*CSN3*D*, *CSN3*E*, *CSN3*M*).

Delle restanti 31 varianti, 10 sono caratterizzate da mutazioni che determinano delezioni nella sequenza amminoacidica (e in alcuni casi anche la totale assenza della proteina nel latte) dovute a indel presenti nella sequenza nucleotidica o a *skipping* esonico. Queste ultime si osservano più frequentemente nella capra che nella pecora: sono 6 varianti di α_{S1}-caseina caprina (*CSN1S1*D, CSN1S1*D*$_1$, *CSN1S1*F, CSN1S1*G*, *CSN1S1*N*, *CSN1S2*0*$_1$) e una di α_{S2}-caseina caprina (*CSN1S2*D*) e 3 di α_{S1}-caseina ovina (*CSN1S1*E, CSN1S1*H*, *CSN1S1*I)*.

La *CSN1S1*E* caprina è caratterizzata dall'inserzione di 371 bp costituita da un LINE (Long INterspersed Element, elemento mobile di origine retrotrasposizionale) a livello del diciottesimo esone. Poiché questa indel si colloca in una regione non codificante, la variante non subisce alcuna modificazione nella sequenza amminoacidica. Altre mutazioni di particolare rilievo che caratterizzano le caseine riguardano 3 dei 6 alleli nulli: si tratta di mutazioni di singoli nucleotidi che determinano condoni di stop (*CSN2*0*, *CSN2*0*', *CSN1S2*0*). A complicare ulteriormente questo quadro estremamente articolato sono inoltre almeno 11 varianti silenti, di cui ben 4 identificate solo nella κ-caseina caprina.

I geni delle lattoproteine sono quindi in continua evoluzione e molto più variabili di quanto si pensasse in passato e ciò rende particolarmente importante il continuo monitoraggio di questi geni nelle diverse razze.

POLIMORFISMO GENETICO DELLE SIEROPROTEINE - Le due principali sieroproteine, la β-lattoglobulina e l'α-lattoalbumina, costituiscono insieme circa il 70% delle proteine del siero. Sono codificate dai geni *LGB* (la β-lattoglobulina) e *LALBA* (l'α-lattoalbumina) collocati su 2 diversi autosomi nella specie caprina (*LGB* sull'11 e *LALBA* sul 5) e su un unico autosoma, il 3, in quella ovina. Questa differenza dipende dal fatto che il cromosoma 3 nella specie ovina deriva per traslocazione robertsoniana dei corrispondenti cromosomi 5 e 11 bovino e caprino.

Il polimorfismo di questi geni è più modesto di quello delle caseine. Nella capra non sono state descritte mutazioni responsabili di cambiamenti amminoacidici nella β-lattoglobulina, sebbene sia stato identificato del polimorfismo in diversi esoni e le regioni 5' e 3' UTR del gene mostrino una certa variabilità in diverse razze (Sel-

Tabella 1 - Varianti genetiche delle lattoproteine nella specie caprina.

VARIANTE	POSIZIONE AMMINOACIDICA										
CSN1S1	1	8	14	16	59	66	77	90	100	110	195
B_1	R	H	E	L	Q	S	E	R	R	E	T
B_2				P							
B_3				P					K		
B_4 & E				P					K		A
A							Q				A
A_3							P				A
C		I		P					K		
D				P	11[a]						
F & D_1				P	37[a]						
G			13[a]				Q				
H	K						Q				
I							Q				
L				P				H			
M				P		L	Q				
N					37[a]						
0_1							Q			90[a]	
0_2, A_2, 0_4	Varianti non completamente caratterizzate										
A', B'	Varianti silenti (A' di A, B' di B_4 all'aa S_{66}, ed E di B_4 per inserzione di LINE nell'esone 18)										

CSN2	58	166	167	177	207
A	L	S	Q	A	V
C				V	
E		Y			
D					N
0	st[b]				
0'			st[b]		
B	Variante non caratterizzata				
A_1, C_1	Varianti silenti di A e C al nucleotide 180, esone 9				

CSN1S2	7	64	110	121	167	193
A	V	E	W	T	K	P
B		K				
C					I	
D				4[a]		
E					I	R
F	I					
0				st[b]		

CSN3	43	44	53	56	61	65	90	119	145	156	159
A	T	Q	N	L	Y	V	D	V	V	A	S
B								I			
C	T[c]			L[c]		I		I		V	P
D[d]	T[c]	R				I		I			P
E[d]							G	I			
F	T[c]							I			P
H			S					I			
I						I		I			
J					C			I			
K[d]		R						I			
L						I		I			P
M[d]	T[c]						N	I	A		P
B', B", C', G	Varianti silenti di B all'aa F_{18} (B' e B") e L_{56} (B"), di C all'aa T_{131} (C') e di L all'aa T_{43} (G)										

LALBA	100
A1	L
A2	P
+3 varianti	Varianti caratterizzate da una mutazione silente rispettivamente nell'esone 1 (razze cinesi), 3 (razze italiane), e 4 (razze indiane)

[a]Numero di amminoacidi deleti a partire dalla posizione indicata; [b]st=codone di stop; [c]mutazione silente; [d]varianti B^{IEF}.

Tabella 2 - Varianti genetiche delle lattoproteine nella specie ovina.

VARIANTE	POSIZIONE AMMINOACIDICA						
CSN1S1	13	43	51	68	70	186	
A	S	D	D	Sp[b]	E	I	
C'	P					T	
C"	P						
D	P			N			
E	?[a]			S	8[c]	?[a]	
H	P		8[c]				
I	P	8[c]					
B, F, G	Varianti non completamente caratterizzate						

CSN2	183	196
A	M	L
G	V	
X		I
Y	Variante silente di X all'aa Q_{192}	

CSN1S2	45	46	48	49	75	105	161	200
A	V	R	A	N	D	I	R	N
A'						V		
B					Y	V		
B'					Y			
C	I		S					
D		S						
E				D				
F								K
G							H	

CSN3	35	104
C	Y	S
T		L
X	Variante silente di C all'aa Y_{35}	

LGB	20	148
A	Y	R
B	H	
C		Q
LALBA		
A, B	Varianti non caratterizzate	

[a]Posizione non caratterizzata; [b]Sp=serina fosforilata; [c]numero di amminoacidi deleti a partire dalla posizione indicate.

vaggi et al., 2014). Nell'α-lattoalbumina caprina, invece, è nota soltanto una mutazione non silente, anche se sono state descritte mutazioni silenti in almeno 3 esoni in razze di diversa origine (Tab. 1). Nella pecora (Tab. 2) sono state identificate tre varianti della β-lattoglobulina distinte per due SNP entrambi responsabili di sostituzioni amminoacidiche, mentre per l'α-lattoalbumina sono descritte due diverse forme proteiche non ancora caratterizzate (Giambra & Erhardt, 2012).

ASSOCIAZIONI FRA CASEINE E CARATTERI PRODUTTIVI IN CAPRA - La più nota associazione del polimorfismo dell'α_{S1}-caseina caprina sulle caratteristiche del latte è quella col livello di sintesi della stessa caseina. Le varianti possono, infatti, essere distinte in 4 gruppi in funzione del quantitativo di α_{S1}-caseina prodotto per ciascun allele: alto (varianti A, A', A_2, A_3, B_1, B_2, B_3, B_4, B', C, H, L e M), corrispondente a 3,5 g/L di proteina; intermedio (varianti D_1, E ed I), corrispondente a 1,1 g/L; basso (varianti D, F e G), corrispondente a 0,45 g/L; nullo (varianti N, 0_1, 0_2 e 0_4), dovuto alla totale assenza di sintesi di questa caseina nel latte. Va specificato che per alcune di queste varianti il livello di sintesi non è stato verificato sperimentalmente, ma dedotto dalla variante da cui originano gli alleli identificati più di recente (ad esempio la *CSN1S1*A'*). Alcuni nuovi studi hanno quindi verificato i livelli di sintesi delle

singole caseine nel latte delle razze analizzate, confermando i suddetti livelli per le varianti A ed F, e mettendo in luce un'associazione con un contenuto ancora maggiore di α_{S1}-caseina per la variante B nella razza Girgentana (5,4 + 0,5 g/L; Montalbano et al., 2014) e Sarda (Balia et al., 2013).

Diversi livelli di sintesi della stessa caseina nel latte si riscontrano anche per la α_{S2}-caseina, per la quale sono note varianti associate a un livello normale (varianti A, B, C, E, F e G), ridotto (variante D) e nullo (allele 0). Per la β-caseina sono noti solo due livelli di sintesi, uno normale e uno nullo. Quest'ultimo è determinato da due varianti identificate rispettivamente in capre di origine italiana (allele 0) e pirenaica, corsa e creola (allele 0').

Le varianti ad alto contenuto di α_{S1}-caseina e β-caseina nel latte sono generalmente associate anche a un maggiore contenuto di proteina totale nel latte e in particolare l'allele *CSN1S1*B* è risultato associato ai livelli maggiori (Balia et al., 2013; Pazzola et al., 2014). Le differenze quantitative nel livello di sintesi di ciascuna caseina o di caseina totale, determinano delle differenze nelle caratteristiche nutraceutiche e tecnologiche del latte.

Caratteristiche tecnologiche - Latte con alti livelli di solidi totali, grasso e caseina in particolare, sono associati con tempi di coagulazione inferiori (RCT), maggiore consistenza del coagulo (a_{30}) e migliore resa casearia (Mestawet et al., 2013). Altri elementi fondamentali per la coagulazione del latte sono la dimensione delle micelle caseiniche e il contenuto in κ-caseina: minore è la dimensione delle micelle e migliori sono le caratteristiche di coagulazione del latte e maggiore è il contenuto in κ-caseina e minore è la dimensione delle micelle.

La gran parte degli studi di associazione si è concentrata sull'α_{S1}-caseina, data l'elevata variabilità e differenza nei livelli di sintesi di questa caseina nel latte. Inoltre è l'unica in cui nelle diverse razze sono presenti con una discreta frequenza alleli associati a diversi livelli di sintesi (in particolare *CSN1S1*A*, *CSN1S1*B*, *CSN1S1*E*, e *CSN1S1*F*). Tuttavia, vista la difficoltà di trovare un numero di capre sufficientemente elevato per osservare gli effetti di ogni singolo allele, i lavori pubblicati tendono a differenziare effetti degli alleli forti rispetto a quelli degli alleli deboli. Le varianti con alleli forti di α_{S1}-caseina nel latte sono associate sia a un maggiore contenuto in caseina totale, sia a micelle di minori dimensioni e conseguentemente a migliori caratteristiche di trasformazione casearia.

I casi in cui l'attenzione è stata focalizzata su specifici alleli sono più rari. La variante *CSN1S1*A*$_3$, identificata in capre etiopi è associata (Mestawet et al., 2013) a micelle di dimensioni più piccole e RCT inferiori rispetto alle altre varianti. È noto che la variante *CSN1S1*F* è associata a un minore contenuto in grasso del latte, con conseguente peggioramento anche nelle caratteristiche di coagulazione dello stesso, in particolare tempo di rassodamento più lungo, risultato recentemente confermato nella razza Sarda (Pazzola et al., 2014). Gli stessi autori hanno dimostrato che nella razza Sarda anche la variabilità genetica dell'α_{S2}-caseina a parità di livello di sintesi influisce sui parametri di coagulazione del latte: la maggiore consistenza del coagulo si ottiene per latti prodotti da individui con genotipo *CSN1S2*CC* e *CSN1S2*AC*.

Latti con alleli nulli di β-caseina richiedono tempi di coagulazione maggiori e sono responsabili di cagliate meno salde e rese casearie inferiori rispetto a quelli contenenti varianti associate a livelli normali di sintesi della stessa caseina nel latte.

Per la κ-caseina sono state descritte associazioni significative con il contenuto totale di proteina e caseina nella razza Orobica (Chiatti et al., 2007), con effetto favorevole della variante B^{IEF} (che comprende gli alleli *D*, *E*, *K* e *M*). Tali varianti sono però piuttosto rare. Nella razza Murciano-Granadina il genotipo *CSN3*BB* è risultato associato a tempi di coagulazione maggiori rispetto al genotipo *CSN3*AB* (Caravaca et al., 2011). Anche nella razza Sarda il genotipo *CSN3*BB* è risultato associato a tempi di coagulazione e rassodamento del coagulo più lunghi, mentre il genotipo *CSN3*AA* a una maggiore consistenza del coagulo. Inoltre il genotipo *CSN3*BD* è risultato associato a tempi di coagulazione inferiori rispetto a tutti gli altri genotipi e a una consistenza del coagulo maggiore rispetto al genotipo *CSN3*BB* (Pazzola et al., 2014), da cui si possono presumere effetti favorevoli dell'allele *CSN3*D*.

Caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche - Il genotipo α_{S1}-caseinico sembra influire anche sulla composizione in acidi grassi del latte. Se capre con alleli forti mostrano maggiore efficienza energetica e utilizzazione proteica (Bonanno et al., 2013), gli alleli deboli risultano associati a un minore contenuto in acidi grassi saturi (in particolare quelli a corta e media catena, prevalentemente di sintesi endogena), a catena ramificata o con numero dispari di atomi di carbonio (acidi grassi di derivazione batterica) e a indici di desaturazione generalmente più alti (Chilliard et al., 2013). La presenza di alleli deboli o nulli di α_{S1}-caseina, essenziale per la formazione delle micelle, determina l'accumulo delle altre caseine nel reticolo endoplasmatico delle cellule mammarie e una riduzione del trasporto delle caseine attraverso le stesse cellule. Conseguentemente si assiste a una riduzione della secrezione di grasso, con feedback negativo sulla sintesi *ex novo* di acidi grassi (Ollier et al., 2008). Alcune differenze sono state riscontrate anche fra alleli forti: animali con genotipo *CSN1S1*AA* sono caratterizzati da una maggiore concentrazione di alcuni acidi grassi a corta e media catena, mentre quelli con genotipo *CSN1S1*BB* da una maggiore concentrazione di gran parte degli acidi grassi a lunga catena (Balia et al., 2013). Un'influenza è stata notata anche su dimensioni, carica e composizione della membrana dei globuli di grasso (*CSN1S1*0$_1$0$_1$* associato a globuli di dimensione minore rispetto a *CSN1S1*AA*), con possibili ripercussioni su aspetti tecnologici e nutrizionali (Cebo et al., 2012).

Inoltre, sebbene non ci siano sufficienti evidenze a sostegno di tale ipotesi, sembra che latti con varianti deboli e nulle di α_{S1}- e α_{S2}-caseina siano dotati di minore potenziale allergenico. L'elevato polimorfismo di α_{S1}-caseina, raramente preso in considerazione negli studi sull'allergenicità al latte delle diverse specie potrebbe giustificare l'inconsistenza dei risultati. Infatti, la diversa risposta di pazienti allergici al latte vaccino a campioni individuali di latte caprino caratterizzati da differenti genotipi di α_{S1}-caseina suggerisce la possibilità di destinare il latte caprino prodotto da animali con particolari genotipi all'alimentazione di pazienti selezionati per la loro intolleranza a specifiche frazioni di caseina (Ballabio et al., 2011). Tuttavia, data l'elevata similarità delle sequenze lattoproteiche dei ruminanti permane il rischio di cross-reattività al latte vaccino, e sono pertanto necessari ulteriori studi per confermare tale risultato.

Infine il genotipo α_{S1}-caseinico sembra influire anche sulla componente glucidica del latte. Oltre al lattosio, il latte di tutti i mammiferi contiene oligosaccaridi non digeribili dai neonati, ma che consentono la crescita di batteri specifici in grado di competere con i patogeni riducendone l'adesione nell'intestino dell'infante (Meyrand et al., 2013).

Il contenuto in oligosaccaridi del latte di capra è più simile a quello del latte umano. In particolare il latte caprino, rispetto a quello vaccino, contiene una maggior concentrazione di oligosaccaridi sialilati e di alcuni acidi fucosilati, che svolgono un ruolo essenziale nello sviluppo cerebrale e nell'immunità del neonato (Meyrand et al., 2013). Sebbene il contenuto totale in oligosaccaridi associato al genotipo *CSN1S1*0$_1$0$_1$* o al genotipo *CSN1S1*AA* non cambi, si nota una differenza nella loro composizione presumibilmente a causa di un'interferenza nella sintesi degli oligosaccaridi. Questa, infatti, avviene nel reticolo endoplasmatico, dove si accumulano le altre caseine in presenza di alleli deboli o nulli (Meyrand et al., 2013).

ASSOCIAZIONI FRA SIEROPROTEINE E CARATTERI PRODUTTIVI IN CAPRA - Per quanto concerne le sieroproteine, è stata notata della variabilità individuale nel contenuto in β-lattoglobulina di capre di razza Girgentana, ma nessuno dei numerosi polimorfismi genetici identificati nelle regioni 5' e 3' UTR è risulta-

to associato a differenti livelli di sintesi della proteina nel latte (Selvaggi et al., 2014). Invece, per l'α-lattoalbumina sono state trovate associazioni con altri caratteri produttivi: il genotipo A1A2 con una maggiore produzione di cashmere rispetto al genotipo A1A1 (Lan et al., 2008), mentre la mutazione silente descritta nell'esone 1 è risultata associata ad una differenza nella circonferenza toracica in due diverse razze cinesi (Ma et al., 2010).

ASSOCIAZIONI FRA CASEINE E CARATTERI PRODUTTIVI IN PECORA - Gli effetti del polimorfismo delle caseine nella pecora sono molto meno studiati di quelli della capra e riguardano prevalentemente le caratteristiche strutturali e tecnologiche. Per quanto concerne l'α_{S1}-caseina, il genotipo *CSN1S1*CC* ha mostrato effetti positivi sul contenuto di proteina e grasso nel latte, nonché caratteristiche di coagulazione migliori rispetto ai genotipi *CSN1S1*CD* e *CSN1S1*DD*. La sequenza amminoacidica Sp-Sp-Sp-E-E è coinvolta nell'assemblaggio della micella caseinica ed è alterata nella variante D (Sp-Sp-N-E-E) con notevoli ripercussioni. Infatti, questa è l'unica variante nota in pecora a essere associata con un contenuto inferiore di α_{S1}-caseina nel latte e rende la cagliata di consistenza più molle rispetto al latte contenente le altre varianti.

Anche per l'α_{S2}-caseina sono state descritte associazioni: il genotipo *CSN1S2*AB* è risultato associato con un contenuto in latte e grasso maggiore rispetto a *CSN1S2*AA* e l'allele *CSN1S2*B* con il contenuto in proteina (Giambra & Erhardt, 2012). In uno studio condotto recentemente nella razza Merinos sono state identificate due varianti derivate per ricombinazione dalle varianti A e B e pertanto rinominate A' e B' (Corral et al., 2013). Dallo studio di queste quattro varianti l'associazione con le caratteristiche del latte è stata attribuita alle singole sostituzioni amminoacidiche: le varianti contenenti Y_{75} (B e B') sono risultate associate con una maggiore concentrazione di solidi non-grassi, mentre le varianti contenenti V_{105} (A' e B) sono risultate associate a una minore percentuale di lattosio.

Il genotipo *CSN2*GG* è risultato positivamente associato con la quantità di latte e il genotipo *CSN2*AA* col contenuto in grasso e proteina (Corral et al., 2010).

Gli stessi autori hanno analizzato anche la variabilità di un microsatellite localizzato nel gene *CSN3*, per il quale sono stati descritti 5 alleli denominati da K_1 a K_5. I genotipi K_1K_4 e K_3K_3 del microsatellite sono risultati associati a una maggiore quantità di latte. Nello stesso studio è stato preso in considerazione anche il genotipo composito di β- e κ-caseina trovando associazioni positive dei genotipi AGK_3K_5 e GGK_3K_3 con la quantità di latte e la percentuale di lattosio, confermando l'effetto positivo degli alleli *CSN2*G* e *CSN3*K3*.

ASSOCIAZIONI FRA SIEROPROTEINE E CARATTERI PRODUTTIVI IN PECORA - Il maggior numero di studi di associazione fra varianti genetiche lattoproteiche ovine e caratteri produttivi del latte ha riguardato la β-lattoglobulina, con risultati contraddittori. Infatti, il genotipo *LGB*AA* è risultato associato con minori quantità di latte rispetto al genotipo *LGB*AB* e a un maggior contenuto in grasso rispetto al genotipo *LGB*BB* in alcuni studi, mentre si è riscontrato esattamente l'opposto in altri (Giambra & Erhardt, 2012).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE - La qualità dei prodotti lattiero-caseari ovini e caprini sta continuamente migliorando. Nell'ultimo decennio è stato dato un nuovo impulso alle ricerche nel settore della qualità globale di latte e derivati: controllo dei contaminanti, formulazione delle diete e nuove supplementazioni, utilizzo di strumenti innovativi e sensori per monitorare le fasi di trasformazione, uso di cagli e starter diversi e incorporazione di vari ingredienti aromatici per ottenere nuovi prodotti, studi di associazione fra genotipi e fenotipi. Solo a livello genetico questo ha portato alla descrizione di una notevole variabilità a livello di lattoproteine e alla definizione di associazioni con diverse caratteristiche tecnologiche e nutrizionali del latte. Spesso però sono state analizzate poche regioni di ciascun gene e solo in specifiche razze. Inoltre la genotipizzazione con i metodi tradizionali richiede la combinazione di più analisi, che non sempre possono essere eseguite su tutte le frazioni lattoproteiche, escludendo quindi anche la possibilità di analizzare efficacemente tutti gli effetti nonché gli effetti degli aplotipi caseinici. Per attribuire a un latte particolari caratteristiche bisogna non soltanto provare la relazione causale, ma bisogna anche verificare che le componenti utili siano presenti e presenti in quantità sufficiente. Pertanto una più precisa caratterizzazione della variabilità genetica su popolazioni più ampie potrebbe risolvere le situazioni riguardanti i risultati contrastanti e fornire le corrette indicazioni per la selezione. È chiaro che l'associazione fra le componenti del latte e come l'ambiente interno ed esterno all'animale le influenzino costituiscono un sistema complesso.

Tuttavia la ricerca sta sviluppando nuovi approcci per poterli analizzare simultaneamente. I progressi della tecnica e il coinvolgimento del mondo scientifico e le collaborazioni con organismi internazionali sono oggi più che mai di un'importanza strategica in questo settore.

Genetic polymorphism of goat and sheep milk proteins and effects on milk quality

Key words: sheep, goat, milk proteins, genetic variants.

Bibliografia

Balia F., Pazzola M., Dettori M.L., Mura M.C., Luridiana S., Carcangiu V., Piras G., Vacca G.M. (2013). Effect of CSN1S1 gene polymorphism and stage of lactation on milk yield and composition of extensively reared goats. J. Dairy Res. 80: 129-137.

Ballabio C., Chessa S., Rignanese D., Gigliotti C., Pagnacco G., Terracciano L., Fiocchi A., Restani P., Caroli A.M. (2011). Goat milk allergenicity as a function of αS1-casein genetic polymorphism. J. Dairy Sci. 94: 998-1004.

Bonanno A., Di Grigoli A., Montalbano M., Bellina V., Mazza F., Todaro M. (2013). Effects of diet on casein and fatty acid profiles of milk from goats differing in genotype for αS1-casein synthesis. Eur. Food. Res. Technol. 237 (6): 951-963.

Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphism in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. J. Dairy Sci. 92: 5335-5352.

Caravaca F., Ares J.L., Carrizosa J., Urrutia B., Baena F., Jordana J., Badaoui B., Sanchez A., Angiolillo A., Amills M., Serradilla J.M. (2011). Effects of αS1-casein (CSN1S1) and k-casein (CSN3) genotypes on milk coagulation properties in Murciano-Granadina goats. J. Dairy Res. 78: 32-37.

Cebo C., Lopez C., Henry C., Beauvallet C., Menard O., Bevilacqua C., Bouvier F., Caillat H., Martin P. (2012). Goat αS1-casein affects milk fat globule physicochemical properties and the composition of the milk fat globule membrane. J. Dairy Sci. 95: 6215-6229.

Chiatti F., Chessa S., Bolla P., Cigalino G., Caroli A., Pagnacco G. (2007). Effect of κ-casein polymorphism on milk composition in the Orobica goat. J. Dairy Sci. 90: 1962-1966.

Chilliard Y., Rouel J., Guillouetc P. (2013). Goat alpha-s1 casein genotype interacts with the effect of extruded linseed feeding on milk fat yield, fatty acid composition and post-milking lipolysis. Anim. Feed. Sci. Tech. 185: 140-149

Corral J.M., Padilla J.A., Izquierdo M. (2010). Associations between milk protein genetic polymorphisms and milk production traits in Merino sheep breed. Livest. Sci. 129: 73-79.

Corral J.M., Padilla J.A., Izquierdo M., Martinez-Trancon M., Parejo J.C., Salazar J., Hernandez-Garcıa F.I. (2013). Detection and genetic characterization of ovine CSN1S2*B polymorphisms and their associations with milk production traits. Livest. Sci. 153: 10-19.

FAO (2014). Total Milk Production (tonnes), FAO Statistics Division 2014,

Garro G., Ferranti P., De Pascale S., Nicolai M.A., Mauriello R., Quarto M., Pilla F., Chianese L. (2012). The occurrence of genetic polymorphism and related non-allelic proteins increases the compositional complexity of goat αs1-CN. Electrophoresis 33(15): 2337-2344.

Giambra I., Erhardt G. (2012). Milchproteine, Milchproteinvarianten und deren Bedeutung fur die Schafzucht - Ubersichtsartikel. Züchtungskunde 84 (1): 52-73.

Hayes B., Hagesæther N., Ådnøy T., Pellerud G., Berg P., Lien S. (2006). Effects on production traits of haplotypes among casein genes in Norwegian goats and evidence for a site of preferential recombination. Genetics 174: 455-464.

Lan X.Y., Chen H., Tian Z.Q., Liu S.Q., Zhang Y.B., Wang X., Fang X.T. (2008). Correlations between SNP of LALBA gene and economic traits in Inner Mongolian white cashmere goat. Hereditas 30 (2): 169-174.

Luhken G. (2012).Genetic testing for phenotype-causing variants in sheep and goats. Mol. Cell. Probe 26: 231-237.

Ma R.N., Deng C.J., Zhang X.M., Yue X.P., Lan X.Y., Chen H., Lei C.Z. (2010). A Novel SNP of α-Lactalbumin Gene in Chinese Dairy Goats. Mol. Biol. 44 (4): 536-540.

Meyrand M., Dallas D.C., Caillat H., Bouvier F., Martin P., Barile D. (2013). Comparison of milk oligosaccharides between goats with and without the genetic ability to synthesize αS1-casein. Small Rumin. Res. 113: 411-420.

Mestawet T.A., Girma A., Adnøy T., Devold T.G., Vegarud G.E. (2013). Newly identified mutations at the CSN1S1 gene in Ethiopian goats affect casein content and coagulation properties of their milk. J. Dairy Sci. 96 (8): 4857-4869.

Montalbano M., Tortorici L., Mastrangelo S., Sardina M.T., Portolano B. (2014). Development and validation of RP-HPLC method for the quantitative estimation of αs1-genetic variants in goat milk. Food Chem. 156: 165-169.

Morand-Fehr P., Fedele V., Decandia M., Le Frileux Y. (2007). Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. Small Rumin. Res. 68: 20-34.

Ollier S., Chauvet S., Martin P., Chilliard Y., Leroux C. (2008). Goat's aS1-casein polymorphism affects gene expression profile of lactating mammary gland. Animal 2: 566-573.

Pazzola M., Dettori M.L., Pira E., Noce A., Paschino P., Vacca G.M. (2014). Effect of polymorphisms at the casein gene cluster on milk renneting properties of the Sarda goat. Small Rumin. Res. 117: 124-130.

Selvaggi M., Laudadio V., Dario C., Tufarelli V. (2014). Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. Mol. Biol. Rep. 41: 1035-1048.

Alimentazione animale e qualità del latte di capra

M. AVONDO

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, Università di Catania

Parole chiave: Latte caprino, pascolo, polimorfismo proteico, qualità del latte.

INTRODUZIONE - La produzione italiana di latte caprino rappresenta solo l'1,6% della produzione di latte totale. La diffusione degli allevamenti di capre da latte risulta per lo più limitata, nell'ordine, alle isole, alle regioni meridionali, al Piemonte e alla Lombardia. Si evidenzia tuttavia una crescita costante che dal 2001 al 2012 ha comportato un incremento del 136% passando da 11840 t a 27940 t (Eurostat). L'interesse per il latte di capra, da sempre considerato una valida alternativa al latte vaccino in quanto ritenuto più digeribile e meno "allergenico", è oggi aumentato forse anche a causa della sempre maggiore apertura del consumatore nei confronti di prodotti caseari per gourmet, dal sapore deciso e particolare, peraltro molto diversificato, a seconda della lavorazione. Al latte di capra va riconosciuto un ruolo dietetico importante dovuto a diverse caratteristiche: esso contiene una maggiore percentuale di globuli di grasso di piccole dimensioni, rispetto al latte vaccino, che rende il latte più digeribile; è più ricco di acidi grassi a catena corta e media (C6:0, caproico, C8:0, caprilico e soprattutto C10:0, caprico) che, a differenza di altri acidi grassi, vengono digeriti e assorbiti molto rapidamente, seguendo la via ematica; questa caratteristica rende il latte di capra utilizzabile da soggetti con problemi di malassorbimento; la maggiore proporzione di questi acidi sembra anche inibire lo sviluppo e il deposito di colesterolo. Il latte di capra contiene anche elevati livelli di oligosaccaridi, peraltro molto simili a quelli riscontrabili nel latte umano, che passano indigeriti nell'intestino crasso, dove agiscono da prebiotici, contribuendo al mantenimento e allo sviluppo della flora intestinale deputata alla competizione con i batteri patogeni.

Le caratteristiche degli allevamenti sono estremamente variabili in relazione all'area di produzione (aree Alpine o zone marginali mediterranee) e ai tipi genetici adottati. Sussistono infatti in Italia svariate tipologie di allevamento che vanno dall'altamente intensivo, assimilabile ai sistemi per vacche da latte ad alta produzione, generalmente con impiego di razze di tipo alpino, ai sistemi estensivi basati esclusivamente sull'impiego di pascolo naturale, presenti in aree montane estremamente degradate, come in alcune aree del sud Italia e delle isole. Ciò a dimostrazione della notevolissima adattabilità della specie caprina alle condizioni ambientali più diverse. Naturalmente ciò è possibile anche grazie alla grande varietà di razze e popolazioni (molte delle quali considerate "a rischio" di estinzione) presenti in Italia che presentano caratteristiche produttive molto diverse fra loro.

La presente relazione ha lo scopo di evidenziare come l'alimentazione al pascolo e l'interazione tra alimentazione e genotipo al locus dell'alfa s1 caseina siano spesso causa di importanti variazioni dei livelli produttivi e di alcune caratteristiche qualitative del latte.

Effetti del pascolo - La capra viene definita "intermediate o opportunistic feeder" a causa della sua spiccata capacità di adattarsi, a seconda delle situazioni ambientali in cui si trova, a diete altamente energetiche e proteiche, a pascoli erbacei gestiti in modo altamente intensivo o a pascoli naturali di tipo erbaceo o arbustivo, in condizioni estremamente estensive. Ciò grazie alla possibilità di modulare, in funzione delle condizioni alimentari a sua disposizione, alcuni aspetti morfologici (volume dei prestomaci, dimensioni della superficie assorbente), fisiologici (secrezione salivare, riciclo dell'azoto) e comportamentali (selezione della dieta). È stato dimostrato che le capre, sono in grado di selezionare al pascolo le essenze o le parti di pianta più ricche di sostanze nutritive, e di scartare le essenze tossiche, grazie all'esperienza acquisita e ai conseguenti processi di apprendimento. Inoltre, in carenza di foraggi di buona qualità riescono a soddisfare le proprie esigenze ingerendo essenze botaniche poco appetibili e ricche di polifenoli; queste sostanze, che in altre specie rappresentano una fonte di tossicità, nelle capre, forse a causa di meccanismi difensivi più spiccati, come la possibile presenza nella saliva di particolari proteine (TBS, tannin-binding salivary proteins) in grado di legare e neutralizzare i tannini, sembrano poter essere utilizzate senza subire fenomeni tossici. Inoltre, gli stessi tannini possono diventare strumento di prevenzione di fenomeni di avvelenamento da altre sostanze, per esempio alcuni alcaloidi, presenti in alcune specie spontanee. Tali attitudini comportamentali non possono che riflettersi sulle prestazioni produttive: escludendo le situazioni estreme in cui i livelli di tannini sono talmente elevati da determinare una riduzione di ingestione e un drastico calo produttivo, se la loro presenza nella dieta ingerita al pascolo risulta contenuta (non oltre il 4% della sostanza secca), si possono ottenere interessanti risposte qualitative: infatti il latte di capre alimentate su pascoli spontanei con presenza di piante arbustive risulta più ricco in fenoli che ne migliorano la stabilità ossidativa e le caratteristiche sensoriali. Inoltre la presenza di tannini nella dieta sembra sia responsabile dell'aumento nel latte di acidi grassi polinsaturi della serie omega 3, acido linolenico in particolare, a causa della aumentata protezione dei PUFA dall'azione di bioidrogenazione ruminale. I pascoli naturali, più dei pascoli coltivati, grazie alla loro composizione floristica molto eterogenea, garantiscono una più elevata concentrazione di carotenoidi, retinolo, alfa-tocoferolo e di oli essenziali prevalentemente rappresentati dai terpenoidi; la maggior parte di queste sostanze passa nel latte arricchendone il valore salutistico e sensoriale. Tuttavia i terpeni, una volta ingeriti, possono essere convertiti in vari metaboliti, sia nel rumine che nei tessuti, ed essere poi eventualmente riconvertiti nella loro struttura originaria. Ciò rende non facile l'impiego di tali molecole come traccianti del pascolo nel latte o nei formaggi.

In generale l'erba fresca nell'alimentazione dei ruminanti rappresenta la principale e più naturale fonte di precursori di sostanze ad azione nutraceutica presenti nei loro prodotti. Tra le caratteristiche salutistiche associate alla presenza del pascolo nella dieta, il profilo acidico del grasso del latte, ma anche della carne, è stato probabilmente il più studiato dai nutrizionisti animali negli ultimi decenni. Dall'analisi dei risultati di diverse prove di alimentazione di capre al pascolo sui livelli produttivi e su alcune caratteristiche qualitative del latte sembra evidente che, mentre la produzione di latte non sempre migliora in presenza di pascolo nella dieta, a fronte di diete basate su fieno e concentrati, o di animali al pascolo ma con elevati livelli di supplemento concentrato, le percentuali di acido linoleico coniugato e di acido linolenico risultano quasi sempre più elevati con pascolo *vs* fieno e con solo pascolo *vs* pascolo + supplemento, confermando sostanzialmente i risultati riscontrabili in letteratura su latte ovino.

Tra i pochi aspetti negativi riferibili al pascolo vi è la presenza, nell'erba fresca, di una notevole quota di proteine altamente degradabili associate a bassi livelli di carboidrati solubili, una combinazione che rende poco efficiente la sintesi di proteine microbiche; tra le conseguenze di tale squilibrio tra fonti di azoto e di carboidrati vi sono: l'abbassamento del contenuto proteico e l'innalzamento dell'urea nel latte e l'aumento dell'escrezione azotata, La carenza di carboidrati solubili potrebbe essere, almeno in parte ovviata, sfruttando la naturale tendenza degli zuccheri ad aumentare durante il giorno a causa dell'accumulo dei prodotti della fotosintesi: spostando l'orario di pascolamento di capre Girgentane dalle ore mattutine (9,00 alle 13,00) a quelle pomeridiane (dalle 12,00 alle 16,00), sono stati riscontrati: un incremento medio di zuccheri solubili (WSC) pari al 17% (20,4 vs 17,4% SS) e un aumento del rapporto WSC/proteina grezza mediamente pari al 43% (1,3 vs 0,9) (Avondo et al., 2008). Ciò ha comportato un aumento della proteina del latte e una riduzione dell'urea. Anche la consistenza del coagulo è risultata migliore nel latte delle capre che hanno pascolato durante il pomeriggio. È stata inoltre rilevata una riduzione di CLA ed un aumento di acido linolenico.

Aumenti produttivi di rilievo, associati a proteina più elevata ma ad urea non significativamente diversa tra gruppi sono stati riscontrati da Pagano et al. (2011) somministrando, a capre Girgentane alimentate in stalla, del foraggio di trifoglio sfalciato la mattina (alle 9,00) o il pomeriggio (alle 16,00). Considerato che il sistema di allevamento più diffuso in ambiente mediterraneo prevede, per i piccoli ruminanti, un pascolamento di breve durata (short grazing system, 4-7 ore al giorno e ricovero notturno in stalla), la pratica dello spostamento dell'orario di pascolamento risulterebbe di semplice applicazione e di notevole efficacia.

Polimorfismo proteico e alimentazione - La specie caprina è caratterizzata da un notevole polimorfismo ai loci lattoproteici. La proteina di cui sono state individuate più varianti genetiche è l'αs_1-caseina con 17 varianti alleliche associate a differenti livelli di sintesi di αs_1-caseina: varianti nulle (CSN1S1 0_1, 0_2, N), 0 g/l; varianti deboli (F, G), 0,6 g/l; varianti intermedie (E, I), 1,6 g/l e varianti forti (A, B1, B2, B3, B', C, H, L, M), 3,6 g/l). Pertanto gli studi più approfonditi sulle caratteristiche qualitative del latte sono stati effettuati sulle suddette varianti. Gli alleli forti al locus dell'αs_1-caseina determinano maggiori percentuali di caseina, grasso, calcio e fosforo, sapore ircino meno intenso, minore diametro delle micelle caseiniche e pH più basso, aspetti che nell'insieme migliorano le caratteristiche dei formaggi. Anche la composizione acidica del grasso del latte sembra essere influenzata, soprattutto gli acidi grassi a catena media e gli acidi indicatori di attività dell'enzima delta-9-desaturasi, sebbene i risultati di letteratura siano talvolta contrastanti, forse a causa dell'impiego, in tali studi, di razze molto diverse fra loro (Chilliard et al., 2013).

Recentemente l'interesse è stato rivolto allo studio delle possibili interazioni tra tale polimorfismo genetico e l'alimentazione delle capre (Tab. 1). De la Torre et al. (2009) hanno riscontrato che capre a genotipo forte producevano più latte, rispetto a capre deboli, quando assumevano una dieta meno proteica (proteina grezza 14%); al contrario le capre a genotipo debole rispondevano meglio a una dieta più proteica (proteina grezza 18%).

Un altro approccio allo studio delle relazioni tra alimentazione e genotipo (Avondo et al., 2009), è stato quello di studiare l'attività selettiva di capre portatrici di varianti forti (AA) e deboli (FF) in una prova di alimentazione free-choice in cui le capre disponevano di 5 alimenti separati (fieno, orzo, mais, favino e panello di girasole). È stato infatti ipotizzato che le capre, con la loro capacità di autoregolazione alimentare, potessero modificare la selezione della loro dieta in funzione della diversa attitudine alla produzione di caseina. Mediamente tutte le capre, pur ingerendo quantità di alimenti decisamente superiori rispetto ai fabbisogni, non hanno mai manifestato segni di malessere legato a tali eccessi, grazie ad un comportamento alimentare "difensivo" nei confronti di eventuali dismetabolie, che è consistito nell'ingerire, insieme a grandi quantità di alimenti energetici anche grandi livelli di fieno e girasole, caratterizzati da elevate percentuali di fibra grezza. Il comportamento selettivo che nel complesso ha portato agli stessi livelli di ingestione nei due gruppi genetici, è risultato tuttavia determinante sulle risposte produttive: è da sottolineare infatti che nella fase presperimentale dello stesso esperimento, i due tipi genetici sono stati alimentati con gli stessi alimenti, sebbene in quantità minori, ma somministrati in miscela. Durante tale fase non sono state evidenziate differenze di rilievo nelle produzioni di latte fra genotipi.

Nel periodo free-choice, invece, la produzione di latte, è risultata significativamente più alta nelle capre AA; tali soggetti infatti hanno selezionato una dieta con un maggior rapporto tra alimenti energetici (mais e orzo) e alimenti proteici (favino e girasole) e caratterizzata da proteina meno degradabile; ciò potrebbe aver migliorato l'efficienza microbica ruminale e aumentato la disponibilità di aminoacidi per la sintesi di proteine del latte, come dimostrato anche dai minori livelli di urea rilevati nel latte dei soggetti con alleli forti.

Alla luce di tali risultati è stata realizzata una prova in cui capre AA, AF e FF sono state alimentate con pellettati a 3 diversi livelli di inclusione di fieno: 100%, 65% e 30%. È stato evidenziato un importante effetto dell'interazione tra genotipo e dieta sulla produzione di latte: gli alimenti più energetici (con 65% e 30% di fieno) hanno determinato, nelle capre a genotipo forte, un notevole incremento produttivo, rispetto alle capre deboli, mentre non si sono riscontra-

Tabella 1 - Produzione e caratteristiche del latte in funzione dell'interazione tra genotipo al locus dell'αs_1-caseina e diverse condizioni alimentari.

Dieta	G	Prod. Latte l/d	Grasso %	Caseina %	MCFA % tot FAME	CLA % tot FAME
[1]Modalità di somm.						
-Miscela	GF	0,7	3,3	2,9		-
	GD	0,7	3,2	2,4		-
-Free	GF	1,2	2,4	2,7		-
choice	GD	0,8	2,8	2,4		-
[2]Fieno						
-100 %	GF	0,9	4,4	3,1	22,2	1,11
	Et	0,9	3,6	2,8	-	-
	GD	1,0	3,4	2,4	20,0	1,29
-65 %	GF	1,5	3,5	2,9	23,3	0,95
	Et	1,3	2,9	2,8	-	-
	GD	1,1	3,2	2,5	23,9	1,22
-30%	GF	1,5	3,7	3,1	-	-
	Et	1,2	2,9	3,0	-	-
	GD	1,2	3,2	2,7	-	-
[3]PG						
-14%	GF	1,3	5,2	2.8	19,2	0,35
	GD	1,1	4,8	2,6	18,0	0,29
-18%	GF	1,2	5,5	2,9	17,7	0,47
	GD	1,5	4,8	2,5	14,0	0,42
[4]Pascolo						
-100%	GF	1,4	3,5	2,8	22,1	0,48
	Et	1,3	3,7	2,6	15,4	0,65
-Pasc+ C	GF	1,7	3,1	2,8	26,4	0,28
	Et	1,6	3,3	2,7	22,0	0,30
-Fieno+C	GF	1,4	2,9	2,7	21,5	0,28
	Et	1,5	3,0	2,5	21,4	0,27
[5]Semi lino						
-No	GF	3,8	3,5	-	24,8	0,18
	GD	4,4	2,9	-	22,0	0,22
-Sì	GF	3,7	4,5	-	18,0	1,33
	GD	4,2	3,7	-	17,8	1,83
[6]Pascolo	GF	0,8	4,9	3,3	25,0	-
	Et	0,9	4,8	3,2	24,4	-

G, genotipo al locus dell'αs1-caseina; GF, capre a genotipo forte; GD, capre a genotipo debole; Et, capre eterozigoti; PG, proteina grezza; C, concentrato. [1]Avondo et al., 2009; [2]Pagano et al., 2010; e Valenti et al., 2010; [3]De la Torre et al., 2009; [4]Bonanno et al., 2013a e 2013b; [5]Chilliard et al., 2013; [6]Balia et al., 2013.

te differenze tra genotipi quando le capre erano alimentare con la dieta a base di solo fieno. In linea con tali risultati, Bonanno et al. (2013) in una prova con pascolo hanno riscontrato maggiori livelli produttivi in capre AA rispetto a capre eterozigoti (AF) solo quando gli animali ricevevano un supplemento di 800 g di granella di orzo; Balia et al. (2013), utlizzando pascolo estensivo, non hanno riscontrato differenze produttive tra genotipi. Al contrario, Chilliard et al. (2013) riportano produzioni mediamente più elevate in capre ad alleli deboli, rispetto a capre a genotipo debole.

In generale l'interazione tra genotipo e caratteristiche della dieta fornita agli animali non ha dato risultati degni di nota su grasso e proteine del latte. Bonanno et al. (2013b) e De la Torre et al. (2009) non hanno evidenziato variazioni nel profilo acidico del grasso del latte in relazione a tale interazione; Chilliard et al. (2013) alimentando animali a genotipo forte e debole con o senza integrazione a base di semi di lino, sebbene abbia riscontrato interazioni tra i due fattori statisticamente significative, in realtà non riporta risultati che evidenzino risposte diverse nei due genotipi a seguito della somministrazione di semi di lino. Al contrario, secondo Valenti et al. (2010), una dieta più ricca di energia (fieno 65% e concentrato 35%), se paragonata a una dieta a base di solo fieno (100%), ha determinato risposte diverse nei due genotipi: nelle capre FF si è verificato un aumento di acidi C8:0÷C16:0 e una diminuzione degli acidi grassi a catena lunga quando passavano dalla dieta 100% alla dieta 65%, mentre nelle capre AA non si sono evidenziate differenze nella percentuale di acidi a catena media mentre si sono verificati una riduzione del C16:0 e un aumento degli acidi grassi a catena lunga. In particolare l'aumento di acidi a catena media nelle capre FF con la dieta più energetica potrebbe essere associabile alla maggiore sintesi di α_{s1}-caseina (+7 g/d) riscontrata a seguito del passaggio dalla dieta 100% alla dieta 65%. La maggiore disponibilità di caseina potrebbe aver attenuato l'accumulo di proteine immature nel reticolo endoplasmatico delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria di capre FF. Sembra infatti che tale accumulo possa svolgere un effetto inibente sull'attività di alcuni enzimi responsabili della sintesi di lipidi.

Conclusioni - Le peculiarità comportamentali delle capre alimentate al pascolo e la grande variabilità genetica legata al polimorfismo dell'α_{s1}-caseina offrono opportunità uniche di miglioramento delle prestazioni produttive e della qualità nutrizionale e sensoriale del latte, rispetto agli altri ruminanti.

La gestione del pascolamento e dell'eventuale integrazione alimentare andrebbe quindi rivolta ad una adeguata valorizzazione della capacità selettiva delle capre; inoltre l'alimentazione dovrebbe essere diversificata in funzione del profilo genetico "forte" o "debole", allo scopo di ottimizzare le risposte produttive e qualitative e di minimizzare i costi di produzione.

Animal feeding and goat milk quality

Key words: goat milk, pasture, milk protein polymorphism, milk quality.

Bibliografia

Avondo M., Bonanno A., Pagano R.I., Valenti B., Di Grigoli A., Alicata M.L., Galofaro V., Pennisi P. 2008. Milk quality as affected by grazing time of day in Mediterranean goats. Journal of Dairy Research, 75, 48-54.

Avondo M., Pagano R.I., Guastella A.M., Criscione A., Di Gloria M., Valenti B., Piccione G., Pennisi P. 2009. Diet selection and milk production and composition in Girgentana goats with different αs1-casein genotype. Journal of Dairy Research, 76, 202-209.

Balia F., Pazzola M, Dettori M.L., Mura M.C., Luridiana S., Carcangiu V., Piras G., Vacca G.M. 2013. Effect of CSN1S1 gene polymorphism and stage of lactation on milk yield and composition of extensively reared goats. Journal of Dairy Research, 80, 129-137.

Bonanno A., Di Grigoli A., Di Trana A., Di Gregorio P., Tornambè G., Bellina V., Claps S., Maggio G., Todaro M. 2013a. Influence of fresh forage-based diet and αs1-casein (CSN1S1) genotype on nutrient intake and productive, metabolic, and hormonal responses in milking goats. Journal of Dairy Science, 96, 2107-2117.

Bonanno A., Di Grigoli A., Montalbano M., Bellina V., Mazza F., Todaro M. 2013b. Effects of diet on casein and fatty acid profiles of milk from goats differing in genotype fpr αs1-casein synthesis. European Food Research and Technology, 237, 951-963.

Chilliard Y., Rouel J., Guillouet P. 2013. Goat alpha-s1 casein genotype interacts with the effect of extruded linseed feeding on milk fat yield, fatty composition and post-milking lipolysis. Animal Feed Science and Technology, 185, 140-149.

De la Torre G., Ramos Morales E., Serradilla J.M. Gil Extremera F., Sanz Sampelayo M.R. 2009. Milk production and composition in Malaguena dairy goats. Effect of genotype for synthesis of αs1-casein on milk production and its interaction with dietary protein content.

Pagano R.I., Pennisi P., Valenti B., Lanza M., Di Trana A., Di Gregorio P., De Angelis A., Avondo M. 2010. Effect of CSN1S1 genotype and its interaction with diet energy level on milk production and quality in Girgentana goats fed ad libitum. Journal of Dairy Research, 77, 245-251.

Pagano R.I., Valenti B., De Angelis A., Avondo M., Pennisi P. 2011. Morning versus afternoon cutting time of Berseem clover (Trifolium alexandrinum L.) affects feed intake, milk yield and composition in Girgentana goats. Journal of Dairy Research, 78, 500-504.

Valenti B., Pagano R.I., Pennisi P., Lanza M., Avondo M. 2010. Polymorphism at αs1-casein locus. Effect of genotype x diet interaction on milk fatty acid composition in Girgentana goat. Small Ruminant Research, 94, 210-213.

TAVOLA ROTONDA

Aborti e malattie neonatali: nuovi aspetti di vecchie conoscenze

Aggiornamenti sulle infezioni protozoarie causa di aborto negli ovicaprini in Italia

D. PIERGILI FIORETTI[1], M.T. MANFREDI[2]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia
[2] Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: ovini, caprini, aborto, protozoi.

La produttività degli allevamenti dei piccoli ruminanti è legata principalmente alla loro efficienza riproduttiva; per tale motivo l'aborto, sia che intervenga per cause traumatiche, alimentari o infettive, è il fattore maggiore di perdite economiche in campo zootecnico.
Le dimensioni economiche del fenomeno sono spesso legate alle specifiche cause nei diversi allevamenti, ma, considerando che il 5% del patrimonio ovicaprino nazionale ogni anno abortisce, il danno economico dovuto sia alla perdita di agnelli/capretti sia alla mancata lattazione e possibile infecondità può essere quantificato in una cifra di circa 20 milioni di Euro/anno.
In una larga percentuale di aborti non si riesce a risalire ad una causa precisa; relativamente agli aborti di natura infettiva, ritenuti predominanti negli ovicaprini, la diagnosi è spesso difficoltosa sia per il mancato invio del materiale patologico ai laboratori o per l'invio di materiale inadeguato (non fresco, in autolisi, contaminato da altri batteri, ecc...) sia perché sono necessarie metodiche laboratoristiche affidabili, specifiche e sensibili, effettuabili solo in strutture specializzate.
Molti sono gli agenti patogeni di natura infettiva, alcuni dei quali anche con potenziale zoonotico, classicamente riportati come abortigeni (*Brucella melitensis*, *Coxiella burnetii*, *Chlamidophila abortus*, *Salmonella enterica serovar abortusovis* e l'emergente *Campylobacter jejuni*); *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, parassiti sporozoari appartenenti al Phylum Apicomplexa, sono i più importanti protozoi indentificati come causa di danno riproduttivo nei piccoli ruminanti.
Toxoplasma gondii è un parassita zoonotico a diffusione cosmopolita in grado di infettare la maggioranza dei vertebrati omeotermi (selvatici e domestici, compreso l'uomo) nonché gli uccelli che, nel ciclo biologico del parassita, fungono da ospiti intermedi; il ruolo di ospite definitivo è affidato al gatto ed ai felidi selvatici che vengono, tuttavia, definiti ospiti completi perché contemporaneamente presentano la fase di sviluppo asessuata-extraintestinale del parassita tipica degli ospiti intermedi.
L'enorme circolazione in natura di *T. gondii* è dovuta ad un ciclo biologico unico che permette al parassita di a) passare dagli ospiti definitivi agli intermedi e viceversa; b) diffondersi da un ospite intermedio ad un altro ospite intermedio sia in senso verticale per via transplacentare, che in senso orizzontale, per carnivorismo o per contatto con materiale infetto; c) passare da un ospite definitivo ad un altro senza intervento degli ospiti intermedi ed, inoltre, alla possibilità di trasmettere l'infezione attraverso tre forme biologiche quali: la forma vegetativa (Tachizoite), la forma cistica (Bradizoite) e la forma oocistica (Sporozoite).
L'infezione negli ovicaprini viene acquisita al pascolo con l'ingestione di oocisti emesse dai felidi e divenute infettanti dopo sporulazione nel terreno entro 2-5 giorni a seconda delle condizioni climatiche (T° e Umidità). L'escistazione delle oocisti avviene nel piccolo intestino e dopo soltanto 5 giorni i tachizoiti, attraverso la via linfoematogena, disseminano l'infezione in tutti i tessuti passando attraverso stadi pseudocistici (pseudociste di Frenkel). La cessazione della parassitemia coincide con l'inizio della risposta immune protettiva che porta alla formazione cistica.
In pecore e capre gravide, il passaggio transplacentare del parassita (favorito dalla struttura sindesmocoriale della placenta) durante la fase parassitemica porta a manifestazioni diverse (toxoplasmosi congenita) secondo il momento gestazionale in cui l'animale si infetta e di conseguenza secondo la maturità del sistema immune fetale. Più precisamente, morte e aborto embrionale o riassorbimento (primi 40 giorni), morte e aborto fetale o natimortalità per malformazioni congenite (fra i 70 e 90 giorni), nascita di animali sani ma congenitamente infetti (dopo 110 giorni di gestazione) che possono comunque presentare segni di malattia dopo la nascita ed anche aborto al primo parto (Dubey, 1980; Buxton, 1998). La presenza sporadica di aborti ripetuti può essere ascritta ad una riattivazione endogena con passaggio transplacentare da caduta dell'immunità cellulo-mediata.
Neospora caninum, considerato fra i più importanti agenti eziologici dell'aborto bovino, è stato ed è tuttora ritenuto svolgere un ruolo meno rilevante negli ovicaprini, considerate le poche segnalazioni di casi abortigeni riportate in letteratura a partire dai primi reports di Dubey et al. (1990, 1996). La stretta affinità con *T. gondii* è evidenziata dalla similarità del ciclo biologico pur con elementi differenziali importanti dal punto di vista patogeno e diagnostico.
Il cane ed i canidi selvatici sono considerati ospiti definitivi nonché completi ma, a monte di sieropositività accertate nei cani presenti negli allevamenti, la quasi totale mancanza di positività coprologica rende in natura la trasmissione orizzontale del parassita, tramite oocisti sporulate, una modalità non rilevante. Il passaggio transplacentare dei tachizoiti è responsabile del mantenimento dell'infezione all'interno di un allevamento e delle possibili manifestazioni patogene in corso di gravidanza, ricalcanti lo schema già illustrato in corso di toxoplasmosi. Importante pertanto l'età gestazionale, il sistema immune materno, il sistema immune fetale, la patogenicità dei ceppi parassitari circolanti. Gli studi sul modello bovino hanno accertato la non stimolazione da parte del parassita di una forte immunità cellulo-mediata (a differenza di *T. gondii*) e quindi la possibilità di aborti ripetuti sia per una nuova infezione che soprattutto per riattivazione di infezione pregressa in seguito a stress gravidico (Piergili Fioretti *et al.,* 2003). Aborti ripetuti in pecore infette sono stati riportati da Jolley *et al.* (1999) e da Hassig *et al.* (2003).
Il ciclo biologico vede infine la fase parassitemica sotto forma pseudocistica in tutti i tessuti e l'evoluzione a forma cistica (con parete spessa 4 µm diversamente da quella di *T. gondii* di 1 µm) quasi esclusivamente nel tessuto nervoso (Fig. 1).
L'iter diagnostico negli eventi abortigeni, volto a stabilire una relazione causa-effetto, necessita delle risultanze di esami in grado di evidenziare il parassita (esami biologici, istopatologici, immunoistochimici, biomolecolari) o la risposta immune da esso evocata (test sierologici).
L'esame istologico ed immunoistochimico viene eseguito su prelievi bioptici da materiali abortigeni (cotiledoni placentari, cervello fetale o altri organi) (Fig. 2). Il reperimento a livello placentare di aree multifocali di necrosi e d'infiltrazione perivascolare di cellule linfocitarie e mononucleate rappresenta il classico quadro in corso

di toxoplasmosi e neosporosi; i parassiti sono raramente reperiti in posizione intra ed extracellulare alla periferia delle lesioni. Le lesioni fetali a livello cerebrale si manifestano come una meningoencefalite non suppurativa, anche con presenza di calcificazioni. L'esecuzione di tecniche immunoistochimiche permette di evidenziare più sensibilmente forme tachizoitiche, pseudocistiche o cistiche specie in caso di infezioni pauciparassitarie ed in un materiale fortemente degenerato (Fig. 3).

La scarsità di lavori sull'argomento non permette di ben valutare possibili differenze patologiche tra capre e pecore.

Lo stesso materiale bioptico viene utilizzato per l'esecuzione delle prove biologiche quali l'inoculazione per via peritoneale, in topini cortisonizzati, di emulsioni antibiotate di tali prelievi con sviluppo, in caso di positività parassitaria, delle classiche cisti terminali dopo 6-8 settimane dall'inoculo. Le prove biologiche, permettendo la riproducibilità del parassita, facilitano la diagnosi di infezioni pauciparassitarie.

Alla diagnosi su animale di laboratorio vengono oggi preferite le prove *in vitro* su colture cellulari (*T. gondii* e *N. caninum*, riproducendosi in tutti i tessuti dell'organismo ospite, non hanno specificità di linee cellulari) in quanto presentano la stessa sensibilità ed evidenziano la presenza parassitaria già dopo 48-72 ore dall'inoculo con aree di lisi cellulare e tachizoiti liberi (Fig. 4).

Le tecniche biomolecolari, in grado di evidenziare il DNA parassitario (PCR, Nested PCR, Realtime PCR), sono attualmente le più utilizzate, soprattutto su campioni di encefalo fetale, per la loro sensibilità anche su materiale con autolisi tissutale. Poiché la diagnosi di certezza necessita sempre della messa in evidenza del parassita, le prove biomolecolari vanno sempre integrate dalle prove in vitro o dagli esami istopatologici. Analogamente, la similarità dei quadri istopatologici, in corso di neosporosi e toxoplasmosi, necessita di prove biomolecolari per la speciazione della causa eziologica. Solo la diversa morfologia delle forme cistiche permette di differenziare le due infezioni.

I metodi sierologici sono utili per la diagnosi indiretta negli animali adulti e nei neonati e la messa in evidenza di anticorpi specifici può essere eseguita anche su latte colostrale. Poiché il primo movimento anticorpale IgM ed IgG è diretto verso gli antigeni cuticolari, il test di Immunofluorescenza Indiretta (IFAT) è considerato il golden test; titoli ≥ 1/64 e ≥ 1/160 sono considerati positivi rispettivamente per *T. gondii* e *N. caninum* anche se in corso di infezione acuta, come nelle manifestazioni abortigene, gli anticorpi presentano titoli molto più elevati. La specificità dell'IFAT (100%) è comprovata dall'assenza di cross-reattività tra i due parassiti.

Tra le metodiche che utilizzano antigeni endocitoplasmatici solo l'ELISA dimostra caratteristiche paragonabili all'IFAT anche se la minore sensibilità ne consiglia l'uso per indagini epidemiologiche e non per una diagnosi clinica.

L'indagine sierologica post-abortiva sulle madri è essenziale per validare i test istopatologici e biomolecolari sui materiali abortigeni, ma la sola positività sierologica delle madri non può essere correlata direttamente con l'aborto in quanto la presenza di infezioni croniche comporta positività sierologica.

Recentemente la tecnica IgG Avidity ELISA, messa a punto e validata sul modello usato in medicina umana, si è rivelata altamente sensibile nel discriminare tra infezione acuta e cronica e quindi nel diagnosticare negli ovicaprini l'eziologia sia toxoplasmica che neosporosica dell'aborto (Clementino *et al.,* 2007).

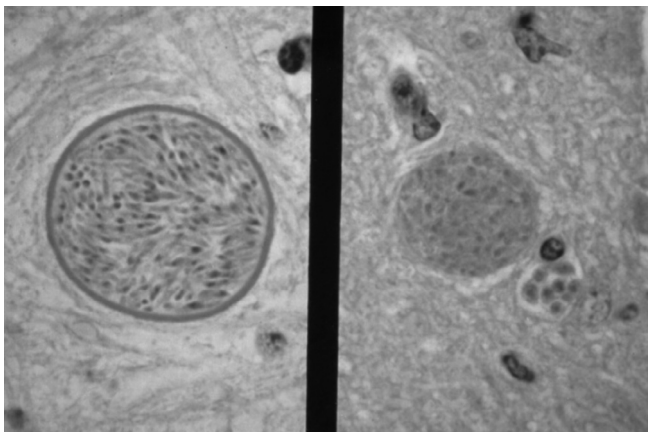


Figura 1 - Cisti tissutali di *Neospora caninum* (sx) e *Toxoplasma gondii* (dx).

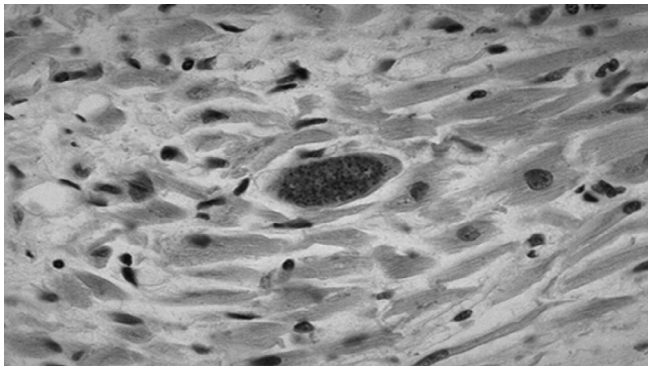


Figura 2 - Cisti di *Toxoplasma gondii* in tessuto miocardico di agnello abortito.

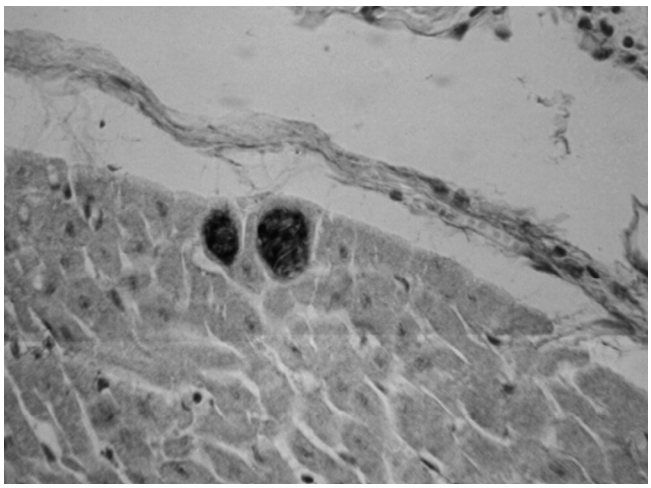


Figura 3 - Immunoistochimica su sezione di miocardio: pseudociste di *Neospora caninum*.

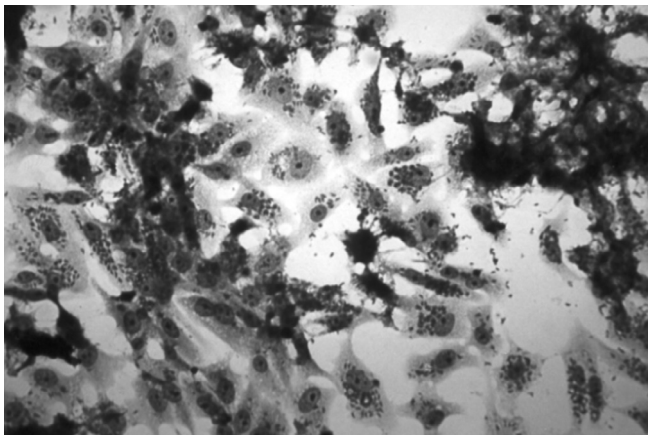


Figura 4 - Cultura di fibroblasti con aree di lisi cellulare e clusters di tachizoiti di *Toxoplasma gondii*.

Negli agnelli e capretti neonati precolostrati, una sierologia positiva è diagnostica per forme congenite; il passaggio di anticorpi materni IgG con il colostro impone, in caso di sierologia positiva dopo assunzione del colostro, un secondo test a distanza di alcuni giorni per osservare la presenza di sieroconversione, significativa di infezione in atto, oppure il dosaggio delle IgM poiché non vengono trasmesse attraverso il colostro (Blewett e Watson, 1984). La discriminazione isotipica tra i livelli degli anticorpi IgG_1 (trasmessi principalmente per via colostrale) e IgG_2 può portare un contributo nella determinazione tra passaggio passivo di anticorpi e produzione attiva.

A monte della possibilità di indagini diagnostiche sensibili e specifiche, pochissimi i dati epidemiologici italiani sugli aborti.

Riportiamo l'esauriente lavoro di Masala et al. (2007), condotto in 107 allevamenti del Nord della Sardegna, dove l'esame totale di 399 campioni abortigeni portava al riscontro di *T. gondii* DNA nel 18,1% dei feti ovini e nel 13,1% delle placente, mentre, relativamente ai caprini, la positività si attestava al 13% nei feti ed al 25% nelle placente. Molto più contenuta la presenza di *N. caninum* DNA con valori del 2% e dell'8,6% nei feti ovini e caprini rispettivamente; le placente risultavano negative. La presenza, nel 41% dei feti ovini e nel 17,3% di quelli caprini, di altri agenti abortigeni batterici, spesso in associazione, rende difficile stabilire l'importanza patogena di ognuno.

Analoga conclusione può essere tratta, relativamente a *N. caninum*, dai risultati riportati da Costarelli et al. (2004) in un allevamento ovicaprino dell'Italia Centrale dove l'accertamento in forma pura di *N. caninum* in un feto caprino (PCR ed esame istopatologico), contrapposto alla presenza in altri 4 feti di soli agenti batterici, rende dubbia l'importanza del ruolo ricoperto dal parassita.

Recentissime indagini condotte nel periodo 2010-2012 presso l'IZSUM (non pubblicate), pur riscontrando l'11% di positività per *T. gondii* negli aborti ovini ed il 17% in quelli caprini, non portano nessun contributo data la compresenza dei maggiori agenti abortigeni batterici.

Più numerose le indagini epidemiologiche sierologiche, soprattutto riguardanti *T. gondii*, che confermano comunque la presenza dei due parassiti all'interno degli allevamenti.

La Tabella 1 (Rinaldi e Cringoli, 2010) riporta sinotticamente le indagini relative a *T. gondii* dal 1980 al 2009.

Le differenze di sieropositività riportate trovano spiegazione nelle differenti tecniche diagnostiche usate, nei diversi management di allevamento, età degli animali nonché differenti condizioni climatiche che influiscono sull'infettività delle oocisti.

Significativo il riscontro di Fusco *et al.* (2007) di *T. gondii* DNA nel 3,4% dei campioni di latte ovino; i tachizoiti, anche se rapidamente digeriti a livello gastrico, sono ugualmente importanti per l'infezione umana dato che possono prendere direttamente la via linfoematogena nel cavo orale in presenza di piccole lesioni o abrasioni. L'ingestione di latte crudo non pastorizzato o di formaggi locali da consumare freschi rappresenta, pertanto, un fattore di rischio per la salute pubblica.

Cenci Goga et al. (2013), in una indagine su allevamenti di pecore da latte in Toscana, segnala una positività sierologica del 34% negli animali e del 97% negli allevamenti. L'analisi dei fattori di rischio, mostrando una forte associazione con l'accesso dei gatti all'acqua di abbeverata, ma non alle riserve di mangime (granaglie ed insilati) non protette all'interno dei capannoni, supporta la recente acquisizione della toxoplasmosi come water-borne disease.

Degno di nota il lavoro di Gazzonis et al. (2014, in press) sulla epidemiologia di *T. gondii* in pecore e capre in Nord Italia, area geografica dove l'allevamento dei piccoli ruminanti, ed in special modo delle capre, ha assunto negli ultimi 35 anni particolare rilevanza tanto che il latte caprino rappresenta il 37,7% della produzione nazionale (ISTAT, 2010). Il 96,6% degli allevamenti di capre ed il 41,7% dei capi sono risultati positivi contro l'87,5% degli allevamenti ovini ed il 59,3% dei capi. La maggiore sieropositività è risultata nella fascia d'età 4 anni, con un decremento negli animali > 6 anni. Tra i fattori di rischio significativi, a supporto dell'importanza rivestita dal management, l'allevamento misto pecore e capre, l'allevamento estensivo o semi-intensivo (fino al 60% di prevalenza contro il 22% di quello intensivo) ed anche la transumanza.

Il recentissimo lavoro di Mancianti et al. (2013), considerata l'importanza sanitaria rivestita dall'assunzione umana di carne e latte caprino con presenza di *T. gondii*, riporta una sieroprevalenza, in 125 capre in lattazione in allevamenti della Toscana, del 60,6% e la presenza parassitaria nel latte nel 13% delle capre sieropositive e PCR positive su campioni di sangue.

Inesistenti i dati epidemiologici riguardanti *N. caninum* al di là di quelli riportati da Mula et al. (2012) su 493 pecore appartenenti a 5 allevamenti del Nord della Sardegna, dove alte positività (66,9%) erano riscontrate sia nel siero che nel latte in un allevamento con storia di aborti.

Negli altri allevamenti la prevalenza mostrava valori intorno al 10% ma con alta concordanza fra siero e latte.

I riscontri epidemiologici riportati, tutti riguardanti *T. gondii*, sottolineano i limiti di un possibile controllo della parassitosi in quanto individuano come principale fattore di rischio il diverso management dell'allevamento che favorisce, in misura maggiore o minore, il contatto tra aree pascolative contaminate o, nel caso di allevamenti intensivi, l'ingestione di cibo ed acqua inquinati da feci di gatti positive per oocisti.

Una profilassi gestionale negli allevamenti estensivi o semi-intensivi vedrebbe venire meno attività tradizionali che rappresentano importanti risorse per la conservazione del territorio e della sua economia, mentre una profilassi ambientale risulta quasi impossibile in quanto comporta il controllo delle popolazioni feline randagie o rinselvatichite sia dal punto di vista numerico che come fonte di infezione oocistica.

Tabella 1 - Dati di prevalenza di *Toxoplasma gondii* in ambito italiano.

Regione	N. animali esaminati (prevalenza)	Tecnica Diagnostica	Bibliografia
Ovini			
Lombardia	352 (78%)	LAT	Gaffuri et al., 2006
Emilia Romagna	374 (69%)	IFAT	Baldelli e Pietrobelli, 1985
Campania	1.170 (28.5%)	IFAT	Fusco et al., 2007
Puglia e Basilicata	306 (88.6%) 321 (56.1%)	IFAT IFAT	Puccini et al., 1981 Puccini et al., 1983
Sicilia	1.380 (0.1%) 1.876 (49.9%)	IFAT ELISA	Balbo et al., 1980 Vesco et al., 2007
Sardegna	7.149 (28.4%) (9.9%) 29.886 (19.2%) (5.4%) 1.043 (51.3%) 422 (31.5-62.6%) (14.9%)	IFAT IgG IFAT IgM IFAT IgG IFAT IgM ELISA IFAT IgG IFAT IgM	Masala et al., 2003 Tola et al., 2006 Natale et al., 2007 Zedda et al., 2009
Caprini			
Lazio	198 (95%)	MAT	De Capraris e Gravino, 1981
Puglia e Basilicata	244 (68.9%)	IFAT	Puccini et al., 1983
Sardegna	2.445 (12.3%) (5.6%) 4.562 (11.7%) (4%)	IFAT IgG IFAT IgM IFAT IgG IFAT IgM	Masala et al., 2003 Tola et al., 2006

Mantenere piccole popolazioni di felidi è importante per il controllo dei roditori ma i roditori sono, a loro volta importanti fonti di infezione per i felidi. I gatti giovani alla prima infezione eliminano milioni di oocisti.

L'unica profilassi valida ed attuabile è quella vaccinale, non autorizzata in Italia ma utilizzata in numerosi paesi europei ed extraeuropei come la Nuova Zelanda.

Il vaccino, costituito dal ceppo S48, isolato da un feto abortito ovino ed attenuato da > 3000 passaggi in vivo, induce una immunità protettiva contro l'aborto in quanto, limitando l'invasione tissutale del parassita attraverso la via linfoematogena, protegge la placenta ed il feto dall'infezione. L'immunità così acquisita persiste per un periodo di 18 mesi.

Tra i protozoi appartenenti al Phylum Apicomplexa, il genere *Sarcocystis* con la specie *Sarcocystis ovicanis* riveste ugualmente un ruolo importante negli aborti ovini anche se sottovalutato a causa delle difficoltà diagnostiche.

Le sarcosporidiosi degli ovini insorgono a seguito dell'ingestione di sporocisti infettanti eliminate con le feci dai carnivori, ospiti definitivi. La particolarità del ciclo biologico, che vede nell'ospite intermedio gli sporozoiti dapprima prendere la via linfoematogena e poi compiere due fasi schizogoniche negli endoteli vasali di diversi organi e visceri (diversamente dagli altri sporozoi in cui le fasi schizogoniche erano proprie dell'ospite definitivo) ed una terza nei linfociti, con successivo incistamento dei merozoiti nella muscolatura striata (sarcocisti), rende ragione della gravità della sintomatologia osservata negli ospiti intermedi.

Gli ovini possono costituire gli ospiti intermedi di 4 specie di Sarcosporidi, fra cui si riconoscono forme non patogene trasmesse dai gatti che esitano in sarcocisti macroscopiche (*S. ovifelis, S. medusiformis*) e forme altamente patogene trasmesse dai canidi che esitano in sarcocisti microscopiche (*S. ovicanis, S. arieticanis*). Queste possono rendersi responsabili, nella fase acuta dell'infezione (studi sperimentali), di encefaliti, encefalomieliti, diatesi emorragica e talvolta morte dell'animale (Dubey et al., 1989) così come di riassorbimento embrionale o aborto e natimortalità nelle pecore gravide (Fayer e Dubey, 1988).

L'escrezione di una sarcotossina, fortemente necrotizzante amplifica sinergicamente il potere patogeno del parassita.

Le contraddittorietà emerse durante gli studi sperimentali circa la possibilità di trasmissione transplacentare del parassita, hanno portato ad ipotizzare possibili meccanismi con cui il *Sarcocystis* può portare alla morte fetale. Le alterazioni vascolari, causate sia meccanicamente dalle fasi schizogoniche che tramite metaboliti tossici, causando anossia tissutale sono responsabili *in primis* degli episodi abortigeni.

Il sospetto passaggio della sarcotossina e non del parassita rende difficile una diagnosi diretta sui materiali abortigeni, in quanto basata sull' evidenziazione del parassita; la diagnosi è effettuabile con le stesse metodiche in uso per *T. gondii.*

La presenza nello stesso animale di infezioni polispecifiche, rende ugualmente difficile negli animali adulti l'utilizzo di test sierologici specifici e sensibili causa la notevole cross-reattività antigenica tra le varie specie. Più recentemente, la diagnostica biomolecolare (Heckeroth e Tenter, 1999) sta portando un notevole contributo riuscendo a diagnosticare l'infezione anche a livello di specie parassitaria.

La mancanza di mezzi diagnostici, se non quelli di riscontro come reperto di macellazione soprattutto su muscolatura esofagea, laringea, linguale, diaframmatica e miocardica, ha portato di conseguenza alla mancanza di dati epidemiologici certi e non supposti sulla base del carattere cosmopolita del parassita.

Gli unici dati in Italia risultano quelli di Varcasia ed altri (2002) in cui l'utilizzo di una Nested-PCR ha permesso di segnalare per la prima volta la presenza di *S. ovicanis* nel 96% dei cuori dei soggetti esaminati (n. 88 ovini regolarmente macellati) contro una positività del 73% per *Sarcocystis* spp. del classico esame a fresco. Questi dati confermano l'importanza di proseguire gli studi su questo parassita considerato il potere abortigeno delle forme microscopiche e dei numerosi casi di aborto in cui non si riesce a determinare l'agente eziologico (circa il 47% in Sardegna).

Recent advances on protozoan infections in ovine and caprine abortions in Italy

Key words: sheep, goat, abortion, protozoa.

Bibliografia

Blewett D.A., Watson W.A. (1984), The epidemiology of ovine toxoplasmosis. III. Observations on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. Br Vet J 140(1): 54-63.

Buxton D. (1998), Protozoan infections (Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Sarcocystis spp.) in sheep and goats: recent advances. Vet Res 29: 289-310.

Cenci Goga B.T., Ciampelli A., Sechi P., Veronesi F., Moretta I., Cambiotti V., Thompson P. N. (2013), Seroprevalence and risk factors for Toxoplasma gondii in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. BMC Veterinary Research 9: 25.

Clementino M.M., Souza M.F., Andrade Neto V.F. (2007), Seroprevalence and Toxoplasma gondii-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. Vet Parasitol 146(3-4):199-203.

Costarelli S., Manuali E., Eleni C., Crotti S., Filippini G., Moscati L., Antenucci P., Marocchi A., Magnino S. (2004), Ruolo di Neospora caninum negli episodi abortivi di un allevamento ovi-caprino dell'Italia centrale. Large Animal Review 10 (2): 53-57.

Dubey J.P., Hartley W.J., Lindsay D.S., Topper M.J. (1990), Fatal congenital Neospora caninum infection in a lamb. J Parasitol 76: 127-130.

Dubey J.P., Morales J.A., Villalobos P., Lindsay D.S., Blagburn B.L., Topper M.J. (1996), Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. J Am Vet Med Assoc 208(2): 263-265.

Dubey J.P., Sharma S.P., Lopes C.W., Williams J.F., Williams C.S., Weisbrode S.E. (1980), Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical signs, and distribution of Toxoplasma in tissues of goats fed Toxoplasma gondii oocysts. Am J Vet Res 41(7): 1072-1076.

Dubey J.P., Speer C.A., Munday B.L., Lipscomb T.P. (1989), Ovine sporozoan encephalomyelitis linked to Sarcocystis infection. Vet Parasitol 34: 159-163.

Fayer R., Dubey J.P. (1988), Sarcocystis induced abortion and fetal death. Progr Clin Biol Res 281.

Fusco G., Rinaldi l., Guarino A., Proroga Y.T.R., Pesce A., De Marco G., Cringoli G. (2007), Toxoplasma gondii in sheep from the Campania region (Italy). Vet Parasitol 149: 271-274.

Gazzonis A.L., Veronesi F., Di Cerbo A.R., Zanzani S.A., Molineri G., Moretta I., Moretti A., Piergili Fioretti D., Invernizzi A., Manfredi M.T. (2014), Toxoplasma gondii in small ruminants in Northern Italy: an epidemiological survey. Annals of Agricultural and Environmental Medicine: accepted

Hässig M., Sager H., Reitt K., Ziegler D., Strabel D., Gottstein B. (2003), Neospora caninum in sheep: a herd case report. Vet Parasitol 117: 213-220.

Heckeroth A,.R., Tenter A.M. (1999), Development and validation of specific Nested PCRs for diagnosis of acute sarcosporydiosis in sheep. Int J for Parasitology 29: 1331-1349.

Jolley W.R., McAllister M.M., McGuire A.M., Wills R.A. (1999), Repetitive abortion in Neospora-infected ewes. Vet Parasitol 82(3): 251-257.

Mancianti F., Nardoni S., D'Ascenzi C., Pedonese F., Mugnaini L., Franco F., Papini R. (2013), Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of Toxoplasma gondii in a goat population in Italy. BioMed Research International 2013: 905326.

Masala G., Porcu R., Daga C., Denti S., Canu G., Patta C., Tola S. (2007), Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. J Vet Diagn Invest 19: 96-98.

Mula P., Salis F., Zidda A., Tamponi C., Dore F., Garippa G., Scala A., Varcasia A. (2012), Evaluation of Iscom ELISA for Neospora caninum detection in sheep milk. XXVII Congr. Naz. SOIPA, Alghero 26-29 Giugno 2012, pp. 209.

Piergili Fioretti D., Pasquali P., Diaferia M., Mangili V., Rosignoli L. (2003), Neospora caninum infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50(8): 399-404.

Rinaldi L., Cringoli G. (2010), La toxoplasmosi negli animali da reddito in Italia. LXIV Congresso Nazionale S.I.S.Vet., Asti.

Varcasia A., Piazza C., Sardo D., Cancedda G.M., Chighine C., Tola S., Garippa G., Scala A. (2002), XV Congresso Nazionale SIPAOC, Cagliari.

Aborti e natimortalità di origine batterica e parassitaria nei piccoli ruminanti: esperienze diagnostiche nel Lazio e nella Toscana

A. CAPRIOLI, A. BATTISTI, A. FRANCO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma, Italia

Parole chiave: piccoli ruminanti, aborto infettivo, sorveglianza passiva, Lazio e Toscana.

INTRODUZIONE - L'allevamento ovi-caprino rappresenta nel Lazio e nella Toscana una realtà zootecnica ed economica di primaria importanza con un totale di circa 9000 allevamenti ovini e di circa 2400 allevamenti caprini registrati nella Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica (BDN). L'aborto nella specie ovi-caprina è molto frequente e costituisce uno dei principali motivi di mancato introito da parte dell'allevatore. In realtà, con il termine generico di aborto, spesso si intende una serie più ampia di problemi riproduttivi che vanno dal riassorbimento fetale, all'aborto vero e proprio, alla nascita di animali mummificati, fino alla mortalità neonatale e alla nascita di animali a termine con disfunzioni di vario tipo (disvitali) (Menzies, 2011).

Tutte queste problematiche provocano ingenti danni economici agli allevatori, sia di tipo diretto che indiretto quali: ritorni in calore e necessità di dover fecondare nuovamente l'animale, mancato ritorno in calore dell'animale e/o necessità di indurre farmacologicamente l'estro, perdita diretta di animali, riduzione o assenza della produzione lattea, perdita di patrimonio "genetico" a causa di metriti e ritenzioni placentari che possono portare ad infertilità o ipofertilità, deprezzamento del gregge (De curtis et al., 2004). In genere si ritiene che più del 60% degli aborti dei piccoli ruminanti siano di origine infettiva. I principali agenti eziologici batterici e parassitari implicati sono: *Brucella melitensis*, *Salmonella enterica subsp. enterica*, in particolare la serovariante Abortus-ovis, *Chlamydophila spp.*, in primis *Chlamydophila abortus*, *Coxiella burnetii*, *Campylobacter fetus subsp. fetus* e *Campylobacter jejuni*, *Listeria spp*., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (Givens e Marley, 2008; Masala et al., 2007). In rari casi si possono avere aborti legati ad infezioni da *Leptospira spp*., miceti, micoplasmi e altri agenti infettivi opportunistici (es. *Trueperella pyogenes*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus spp*.) (Givens e Marley, 2008). Accertare le cause di aborto con accuratezza diagnostica è di fondamentale importanza, sia per prevenire il ripetersi di tali episodi e la diffusione della condizione patologica intra/inter-allevamento, sia per evitare l'insorgenza di possibili malattie trasmissibili all'uomo (zoonosi). In tal senso, tutti i principali agenti patogeni abortigeni sopra citati sono oggetto di indagini diagnostiche di routine svolte presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT).

Scopo di tale lavoro è quello di presentare le esperienze diagnostiche sulle cause di aborto infettivo in ovini e caprini messe in atto a vantaggio della sorveglianza passiva e realizzate presso l'IZSLT durante il biennio 2012-2013 ed il primo semestre del 2014.

MATERIALI E METODI - Nell'ambito della sorveglianza passiva nei confronti degli agenti abortigeni, tutti i Laboratori dell'IZSLT dislocati sul territorio eseguono indagini per la diagnosi diretta degli agenti batterici e parassitari potenzialmente coinvolti. In base al materiale biologico conferito, vengono effettuati gli esami anatomopatologici, le prove microbiologiche di primo livello, seguite se necessario da analisi di secondo livello. Queste ultime vengono in gran parte svolte presso la Direzione Operativa Diagnostica Generale della Sede Centrale di Roma. Attualmente, la diagnosi diretta dei principali agenti abortigeni batterici e parassitari si basa principalmente su esami colturali e sull'impiego di tecniche di biologia molecolare. Nello specifico, per quanto riguarda gli esami colturali per *Brucella spp., Campylobacter spp., Salmonella spp.* e *Listeria spp.* vengono impiegate Procedure Operative Standard che hanno come riferimento il *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE)*. Per quanto riguarda la ricerca diretta di agenti difficilmente coltivabili, o non coltivabili nelle condizioni diagnostiche di routine quali *Chlamydophila spp.*, *Coxiella burnetii*, *Toxopla-*

Tabella 1 - Metodiche impiegate presso l'IZSLT per la diagnosi diretta dei principali agenti abortigeni batterici e parassitari.

Agente infettivo	*Organi di elezione da esaminare*	*Metodiche*
Brucella spp.	Milza, polmone, contenuto IV stomaco, placenta.	Esame colturale e PCR, PCR Real-Time
Campylobacter jejuni	Fegato, contenuto IV stomaco, placenta.	Esame colturale e PCR
Campylobacter fetus subsp. fetus	Fegato, contenuto IV stomaco, palcenta.	Esame colturale e PCR
Chlamydiales	Polmone, fegato, placenta.	PCR, Ricerca Antigene mediante Kit commerciale*
Chlamydophila abortus, pecorum, pneumoniae, psittaci	Polmone, fegato, placenta.	PCR/RFLP
Coxiella burnetii	Milza, fegato, polmone, placenta.	PCR
Listeria spp.	Fegato, cervello.	Esame colturale
Neospora caninum	Cervello, fegato, cuore, placenta.	PCR
Salmonella spp.	Milza, polmone, contenuto IV stomaco, placenta.	Esame colturale
Toxoplasmatidae	Cervello, fegato, cuore, placenta.	PCR
Toxoplasma gondii	Cervello, fegato, placenta.	PCR

*Test in uso presso 2 Sezioni.

sma gondii e *Neospora caninum,* sono invece principalmente impiegati saggi di *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sviluppati presso la Direzione Operativa di Diagnostica Generale dell'IZSLT. Le metodiche impiegate e le matrici di elezione per l'esecuzione delle prove sono riportate in Tabella 1.

In alcuni casi, a seconda della tipologia e delle condizioni del materiale conferito (materiale idoneo/non idoneo per l'analisi), della storia anamnestica e clinica dell'allevamento di origine, dei rilievi anatomopatologici e di una certa variabilità interlaboratorio, non è stato tuttavia possibile testare tutte le matrici di elezione per tutti gli agenti sopraindicati.

Nel complesso, nell'ambito della sorveglianza passiva di laboratorio per agenti abortigeni, campioni biologici sono stati conferiti alle varie sedi/sezioni territoriali dell'IZSLT da 131 allevamenti ovini e da 37 allevamenti caprini. Nella maggior parte dei casi sono pervenuti singoli campioni (un feto, prodotti da un singolo aborto) o talvolta due campioni, spesso in caso di aborto gemellare. Tale numero di allevamenti purtroppo rappresenta solo una piccola frazione (< al 2%) di quelli in attività sul territorio bi-regionale.

RISULTATI - Durante il periodo considerato (biennio 2012-2013 e primo semestre del 2014), non si sono avute evidenze né di aborto di origine brucellare, né da *Campylobacter spp.,* né da *Neospora caninum*. Durante lo stesso periodo non sono stati inoltre segnalati aborti dovuti a *Leptospira spp., Border disease* o virus di *Schmallemberg* (comunicazione personale da parte della Direzione Operativa Diagnosi Malattie Virali e Leptospirosi dell'IZSLT). Nel complesso, nell'arco di tempo considerato, gli agenti più frequentemente riscontrati nelle aziende ovine colpite da aborti e problemi riproduttivi sono stati: *Chlamydophila spp.*, con 32 allevamenti positivi su 131 esaminati (24.4%), *Salmonella spp*., con 28 allevamenti positivi su 119 esaminati (23.5%), *Toxoplasma gondii* con 11 allevamenti positivi su 73 esaminati (15.1%) e *Coxiella burnetii* con 16 allevamenti positivi su 112 esaminati (14.3%). In un solo allevamento dei 64 esaminati veniva rilevata la presenza, in un feto abortito, di *Listeria ivanovii.* Per quanto riguarda gli allevamenti caprini, gli agenti più frequentemente riscontrati sono stati: *Coxiella burnetii* con 15 allevamenti positivi su 35 esaminati (42.9.%), *Chlamydophila spp.* con 5 allevamenti positivi su 37 esaminati (13.5%) e *Listeria spp.* con 4 allevamenti positivi su 35 esaminati (11.4%). Per quest'ultimo patogeno, in due allevamenti veniva riscontrata la presenza di *Listeria monocytogenes*, mentre negli altri due di *Listeria ivanovii*. In uno solo dei 22 allevamenti esaminati veniva rilevata la presenza di *Toxoplasma gondii,* in concomitanza con *Coxiella burnetii*. In nessuno degli allevamenti caprini esaminati veniva invece riscontrata la presenza di *Salmonella spp.*.

Nel dettaglio, per quanto riguarda *Chlamydophila spp.*, nei casi in cui è stata eseguita l'identificazione di specie mediante *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), è stata sempre riscontrata la presenza di *Chlamydophila abortus.* Per quanto riguarda l'andamento temporale, per la pecora, specie più colpita, a fronte di un incremento nel 2013 (59 allevamenti testati) e nel primo semestre del 2014 (45 allevamenti testati) degli allevamenti esaminati rispetto al 2012 (38 allevamenti testati), la percentuale di positività non cambiava in maniera significativa, attestandosi sempre intorno al 20%. Differente era la situazione nella capra, dove nel 2012 non veniva riscontrata alcuna positività sui 10 allevamenti testati, mentre nel 2013 si rilevava la positività di due allevamenti sui 14 testati (14.2%) e nel 2014 di tre allevamenti sui 18 testati (16.7%).

Per quanto riguarda *Coxiella burnetii,* la capra è risultata la specie con il tasso di positività più elevato, con il 42.9% di allevamenti positivi, mentre nella pecora tale percentuale si è attestata al 14.3%. Da segnalare come nel primo semestre del 2014 si sia riscontrato sia un incremento generale degli allevamenti esaminati (63 rispetto ai 40 del 2012 e ai 58 nel 2013), sia un aumento della percentuale di allevamenti infetti. A fronte di una percentuale di positività del 10% circa in entrambe le specie nel biennio 2012-2013, si passava infatti nel 2014 a valori rispettivamente del 60% per gli allevamenti caprini e del 20.9% per gli allevamenti ovini.

Sia per *Chlamydophila spp.* che per *Coxiella burnetii*, per quanto riguarda la distribuzione geografica degli allevamenti positivi in base alla regione o alla provincia di origine, l'analisi dei dati ha risentito fortemente della variabilità nel numero di campioni pervenuti per le analisi; non è stato quindi possibile individuare alcun chiaro *pattern* epidemiologico (dati non mostrati).

Per quanto riguarda *Toxoplasma gondii,* bisogna sottolineare come la diagnosi diretta di tale agente sia entrata a far parte delle analisi effettuate di routine nei vari Laboratori dell'IZSLT solo a partire dal 2013. La pecora è risultata essere l'unica specie significativamente colpita, con percentuali di positività del 14% nel 2013 e dell' 11.9% nella prima metà del 2014, senza nessuna differenza rilevante per quanto riguarda la distribuzione geografica per provincia.

Per quanto riguarda l'aborto da *Salmonella spp.*, la pecora è risultata l'unica specie animale interessata. La sierovariante più frequentemente riscontrata è stata *Salmonella* Abortus-ovis (23 isolati su 28 identificati e tipizzati). Particolarmente interessate sono risultate la provincia di Viterbo, con 18 allevamenti positivi dei 37 esaminati (48.6%) e la provincia di Roma, con 4 aziende positive su 11 esaminate (36.4%). Il rilevamento di altre sierovarianti risultava sporadico, con 4 allevamenti, tutti ubicati in Toscana, in cui veniva rilevata la presenza di *Salmonella enterica subsp. diarizonae* (IIIb) ed un singolo allevamento in provincia di Grosseto in cui veniva riscontata la presenza di *Salmonella* Veneziana. Per quanto riguarda l'andamento temporale dell'infezione, un picco delle percentuali di positività veniva registrato nel 2012 con il 29% di aziende positive (9 aziende su 21 esaminate) per poi attestarsi intorno al 20% negli anni successivi, nonostante un numero superiore di campioni pervenuti ed esaminati.

Casi di coinfezioni da due agenti eziologici sono stati rilevati principalmente nella pecora (6 casi) ed in due capre. In entrambe le specie, invece, non è mai stata rilevata la presenza di più di due agenti infettivi contemporaneamente nello stesso animale/allevamento. In tabella 2 sono riportati nel dettaglio gli agenti implicati in episodi di coinfezione in funzione della specie, dell'anno e della provincia di origine.

Tabella 2 - Agenti implicati in episodi di coinfezione in funzione della specie, dell'anno e della provincia di origine.

Anno	Agenti patogeni	Specie	Provincia
2012	*Chlamydophila+Coxiella*	Pecora	GR
2013	*Toxoplasma gondii+Salmonella enterica subsp. diarizonae*	Pecora	FI
2013	*Chlamydophila+Salmonella enterica subsp. diarizonae*	Pecora	PT
2013	*Coxiella+Salmonella abortus ovis*	Pecora	VT
2013	*Coxiella+Toxoplasma gondii*	Pecora	RM
2014	*Chlamydophila+Coxiella*	Capra	FR
2014	*Coxiella+Toxoplasma gondii*	Pecora	GR
2014	*Coxiella+Toxoplasma gondii*	Capra	RM

CONSIDERAZIONI- Dall'analisi dei risultati di laboratorio relativi agli allevamenti testati, che purtroppo rappresentano solo una piccola frazione del totale degli allevamenti presenti nel Lazio e nella Toscana, si evince che gli agenti maggiormente implicati nei casi di aborto infettivo sono *Chlamydophila abortus* e *Salmonella* Abortus-ovis nella pecora e *Coxiella burnetii* e *Chlamydophila abortus* nella capra. Per quanto riguarda la chlamydiosi, negli allevamenti ovini l'andamento dell'infezione sembra essere stabile nel tempo, mentre nella capra l'evoluzione in termini di aumento di positività necessita di essere ulteriormente monitorata.

Nei casi di aborto salmonellare, come prevedibile, *Salmonella* Abortus-ovis, sierovariante strettamente ospite-associata, è stata la più frequentemente riscontrata. Tale agente, nonostante una sostanziale diminuzione in termini di allevamenti positivi dal 2012 ad oggi, rimane ancora un problema di una certa importanza, in particolare nella provincia di Viterbo. Per quanto riguarda *Salmonella enterica subsp. diarizonae,* sarebbero invece necessari ulteriori approfondimenti per meglio comprenderne l'epidemiologia e la rilevanza come agente patogeno negli allevamenti ovini italiani. È infatti possibile che l'impatto di questa sottospecie, agente eziologico della *winter disentery* e causa di aborto e natimortalità nella pecora (Alvseike e Skjerve, 2002), sia sottostimato in Italia, anche in considerazione delle caratteristiche fenotipiche di crescita che presenta nelle condizioni colturari impiegate routinariamente. Del tutto occasionale sembra invece essere il riscontro di *Salmonella* Veneziana in un unico feto ovino.

Per quanto riguarda gli agenti parassitari, nelle nostre Regioni l'infezione da *Toxoplasma gondii* sembra rappresentare un problema di una certa rilevanza solo nella pecora, con percentuali di positività costanti (10-15%) negli anni considerati, mentre nell'ultimo triennio la presenza di *Neospora caninum* non è mai stata accertata nei piccoli ruminanti, a differenza degli anni precedenti in cui erano stati registrati casi sporadici. Come già ampiamente riportato in letteratura (Mearns, 2007), l'aborto da *Listeria spp*., sia *Listeria monocytogenes* che *Listeria ivanovii,* si è manifestato tipicamente in forma sporadica, andamento prevedibile specialmente nelle comuni condizioni di allevamento (prevalentemente allevamento da latte o a carattere estensivo) delle nostre Regioni.

Per quanto riguarda *Coxiella burnetii*, è difficile valutare quanto il considerevole aumento di positività riscontrato nel 2014 sia dovuto ad aumento dei campioni pervenuti/testati, oppure sia conseguente ad un reale aumento dell' incidenza. Di sicuro il riscontro di tali positività desta preoccupazione, sia per i risvolti zoonosici dell'infezione, sia per la difficoltà di gestione dei focolai in termini di controllo e di management aziendale.

Nella nostra realtà zootecnica, il rilevamento simultaneo in caso di aborto di più agenti infettivi nello stesso allevamento/animale è risultato un evento minoritario, nella maggior parte dei casi verificatosi nella pecora e che ha spesso visto *Coxiella burnetii* tra gli agenti implicati (Tab. 2). Il basso tasso di coinfezioni rilevato, potrebbe essere indice del fatto che una larga parte degli allevamenti esaminati, forse più attenti alle problematiche aziendali di tipo infettivo rispetto a quelli mai testati, adottano pratiche di igiene e biosicurezza quantomeno basilari ed un corretto management. Va inoltre sottolineato che, nonostante *Brucella spp.* non sia mai stata rilevata nel periodo oggetto di studio, l'attenzione nei confronti di questo agente zoonosico di grande rilevanza per la Sanità Pubblica deve essere sempre mantenuta alta, così come vanno sempre tenuti in considerazione patogeni emergenti, quali ad esempio il virus di *Schmallemberg,* soprattutto nei periodi a rischio.

Infine, nonostante negli anni sia stato fatto uno sforzo per migliorare costantemente gli strumenti diagnostici, in taluni casi (circa il 40% degli allevamenti esaminati) non è stato possibile arrivare ad una diagnosi eziologica ed i motivi possono essere stati molteplici; *in primis* non bisogna mai escludere la possibilità di aborti di tipo non infettivo, in secondo luogo bisogna sempre considerare come fattore determinante per una buona sensibilità diagnostica il corretto campionamento. È infatti fondamentale che i campioni pervenuti in laboratorio siano idonei, sia in termini qualitativi (matrici idonee, correttezza del prelievo da effettuare nella maniera più sterile possibile, correttezza nella conservazione e nel conferimento del campione), sia quantitativi (sarebbe preferibile il conferimento di campioni da più animali, rappresentativi della condizione morbosa osservata). In questo senso, al fine di ottimizzare l'efficienza diagnostica, sarebbe sempre utile perseguire un miglioramento dell'informazione e della comunicazione relativa all'offerta analitica che i vari laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) propongono. Sarebbe fondamentale inoltre una costante sensibilizzazione degli allevatori e dei veterinari operanti sul territorio riguardo la necessità di comunicare sempre gli episodi di aborto ai Servizi Veterinari competenti e di conferire campioni idonei ed in numero rappresentativo agli IIZZSS territoriali. In tal senso, l'analisi dei dati per quanto riguarda gli allevamenti positivi ad uno o più agenti abortigeni in funzione della distribuzione geografica, risente fortemente della forte variabilità nel numero di campioni pervenuti per le analisi. Nonostante l'importanza di riuscire a definire la reale incidenza dei vari agenti sul territorio, la sorveglianza passiva come strumento epidemiologico risente quindi ancora troppo della sensibilità individuale e di iniziative sostanzialmente non coordinate. I motivi di questa insufficiente sensibilità del sistema di sorveglianza ha molteplici cause, non ultima la scarsa attitudine degli allevatori e dei veterinari aziendali a conferire agli IIZZSS campioni "sensibili", quali feti e campioni biologici prelevati in seguito ad aborti, forse anche perché potrebbero generare esiti di laboratorio da segnalarsi alle Autorità Veterinarie competenti. Mancano inoltre indagini epidemiologiche di una certa sistematicità in grado di fornire dati rappresentativi dell'intera popolazione.

In definitiva la Sanità Animale e la Sanità Pubblica Veterinaria hanno oggettive difficoltà ad acquisire le informazioni epidemiologiche (*non-laboratory based surveillance*) in maniera integrata e di conseguenza sono in grado di avere una stima soltanto approssimativa della reale prevalenza/incidenza dell'evento "aborto", basandosi spesso soltanto sulle informazioni derivanti dalla diagnostica di laboratorio di una piccola frazione di "casi" esaminati.

A questo punto ci si chiede: se conferisse campioni una parte più rappresentativa degli allevatori ovi-caprini, la frequenza e la distribuzione degli agenti abortigeni riscontrati sarebbe simile? Oppure: quanto finora osservato è dovuto ad una "distorsione" campionaria (*sampling bias*), per il fatto che per ora conferisce campioni da aborti soltanto una frazione "elitaria" di allevatori, più consapevole e più attenta alla prevenzione?

Bacterial and parasitic causes of abortion and stillbirth in sheep and goats in Latium and Tuscany, Italy

Key words: sheep and goats, infectious abortion, surveillance, Italy.

Bibliografia

Alvseike O., Skjerve E. (2002). Prevalence of a Salmonella subspecies diarizonae in Norwegian sheep herds. Prev. Vet Med. 22;52(3-4):277-85.

De Curtis P., Filippini G., Magistrali C. (2004). Salmonella abortus ovis: una problematica sempre attuale. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria, n. 23, Gennaio Febbraio, http://indice.spvet.it#203.

Givens MD., Marley MS. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. Theriogenology 70(3):270-85.

Masala G., Porcu R., Daga C., Denti S., Canu G., Patta C., Tola S. (2007). Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. J. Vet. Diagn. Invest. 19(1):96-8.

Mearns R. (2007). Abortion in sheep 2. Other common and exotic causes. In Practice, vol. 29, pp. 83-90.

Menzies PI. (2011). Control of important causes of infectious abortion in sheep and goats. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 27(1):81-93.

World Organisation for Animal Health (OIE) (2014). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris. Disponibile al seguente URL: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/

“L’ambiente che non c’è”. Quale zootecnia nei siti industriali e nei vari SIN del nostro Paese? Il caso di Taranto e non solo...

Gli ovini quali bioindicatori della contaminazione ambientale da diossine e policlorobifenili

M. AMORENA, G. DI MAIO

Facoltà di Bioscienze e tecnologie agro alimentari e ambientali,
Università degli Studi di Teramo

Parole chiave: diossine, ovini, Geographical Information System GIS, bioindicatori.

INTRODUZIONE - I PCB diossina-simili (dl-PCB) sono un gruppo di 12 policlorobifenili, aventi caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche simili a quelle delle diossine. Sono diffusi in maniera ubiquitaria nell'ambiente e sono classificati come Contaminanti Organici Persistenti (POPs). L'esposizione umana a questi contaminanti è motivo di preoccupazione a causa dei loro effetti negativi sulla salute, come interferenze sulla funzione tiroidea, sul sistema riproduttivo, sul sistema immunitario ed effetti teratogeni e cancerogeni. Queste sostanze, una volta rilasciate nell'atmosfera, si legano al particolato, vengono trasportate dal vento e si depositano nel suolo e sulla vegetazione per deposizione secca ed umida. Come riportato nel documento "parere scientifico sui rischi per la salute pubblica connessi alla presenza di tenori elevati di diossine e PCB diossina-simili nel fegato di ovini e cervidi" redatto dal gruppo di esperti scientifici dell'EFSA sui contaminanti nella catena alimentare, il suolo e i sedimenti sono un serbatoio naturale di diossine e PCB. Il pascolare rappresenta un fattore primario di esposizione per gli ovini. Durante il pascolo gli animali possono ingerire particelle di suolo presenti sui vegetali, oppure in modo diretto dall'erba del pascolo vicina alla superficie del suolo. Le quantità di suolo ingerito è molto variabile poiché dipende notevolmente dalla stagione; è stata riportata un'assunzione media nell'ordine dell'8% della quantità di sostanza secca ingerita. I dl-PCB sono rapidamente assorbiti dal tratto gastroenterico ed essendo lipofili si accumulano nel fegato e nel tessuto adiposo degli animali e vengono secreti nel latte durante la lattazione. Considerando che il sistema di allevamento degli ovini è permanentemente all'aperto, si è pensato che il latte ovino potesse essere una matrice ideale per monitorare la presenza di PCB nell'ambiente, fornendo informazioni sull'esposizione attraverso un metodo di raccolta non invasivo. Per verificare questa ipotesi, i dati sulla contaminazione del suolo della regione Campania con dl-PCB e quelli sulla concentrazione di questi contaminanti nel latte di ovini allevati in Campania, sono stati georeferenziati ed inseriti in un Sistema Informativo Geografico (Geographical Information System, GIS).

MATERIALI E METODI - Tutti i dati sperimentali sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, dall'ORSA Campania e dalla Regione Campania e derivano dal piano di monitoraggio Europeo 2008-2009, dal Piano Nazionale Residui (PNR) e dal Piano Regionale di Sorveglianza per le diossine nella Regione Campania. Prima di iniziare ad elaborare i dati sperimentali, è stato effettuato un controllo della qualità degli stessi per identificare eventuali valori anomali (outliers) che avrebbero potuto influenzare le successive interpolazioni. Per questo scopo sono stati utilizzati diversi strumenti, come ad esempio istogrammi (Fig. 1) e grafici box-plot (Fig. 2). Si è proceduto alla creazione di una mappa continua della distribuzione dei dl-PCB nel terreno a partire dai dati del 2008. Per stimare i valori nei punti non campionati, sono state applicate due delle tecniche di interpolazione più usate: Inverse Distance Weighting e Kriging. I risultati prodotti dalle due metodiche sono stati confrontati mediante cross-validation (Tab. 1). La tabella riporta, per il metodo di Kriging, i risultati relativi agli 11 semivariogrammi utilizzati (sferico, circolare, gaussiano, ecc). Tra i due metodi di interpolazione utilizzati, il Kriging ha prodotto stime più accurate, in quanto caratterizzate da un minor RMSE (Root Mean Square Error). I migliori risultati per la contaminazione del suolo con dl-PCB sono stati ottenuti utilizzando il Kriging Ordinario con un semivariogramma circolare, effettuando un detrend dei dati prima dell'interpolazione. Non essendo stata evidenziata alcuna differenza significativa tra i semivariogrammi sperimentali per le diverse direzioni testate (isotropia), è stato utilizzato un semivariogramma omnidirezionale. La mappa finale (Fig. 3) ha mostrato che le aree a più alto livello di contaminazione con dl-PCB nel suolo si trovano tra le Province di Caserta e di Napoli. Le mappe di inquinamento del suolo sono state integrate con i dati sulla contaminazione del latte del 2008, per eseguire un'analisi della regressione tra le due variabili e determinare la correlazione esistente tra loro. Inoltre, per investigare l'affidabilità del modello, è stata eseguita una serie di test statistici (t, Koenker, Jarque-Bera e Global Moran's Index). Per creare il modello predittivo dell'inquinamento del suolo, sono state applicate due diverse tecniche di re-

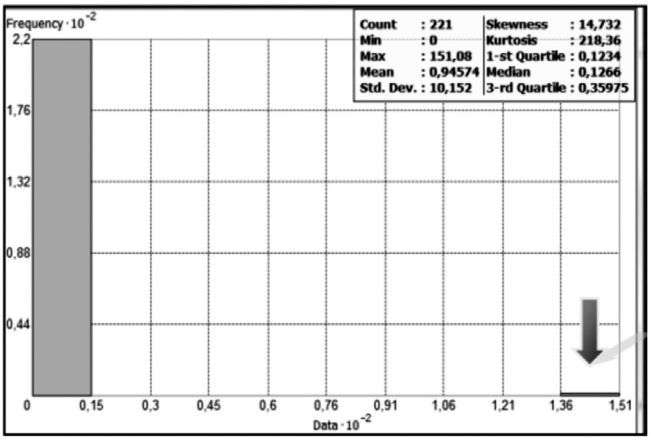


Figura 1 - Identificazione degli outliers tra i valori di dl-PCB nel terreno utilizzando un istogramma.

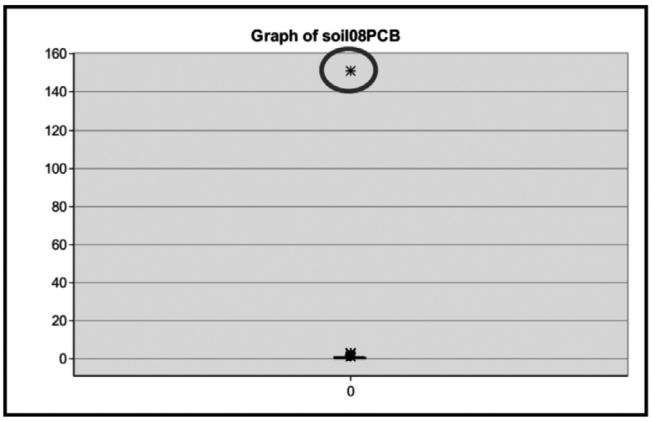


Figura 2 - Identificazione dell'outlier globale utilizzando un grafico box-plot.

Tabella 1 - Confronto tra i differenti parametri e metodi utilizzati per le interpolazioni.

METODI		RMSE
Kriging	Stable	0.1735
	J-Bessel	0.1736
	K-Bessel	0.1734
	Hole Effect	0.1739
	Rational Quadratic	0.1749
	Gaussian	0.1736
	Exponential	0.1741
	Pentaspherical	0.1734
	Tetraspherical	0.1732
	Circular	0.1729
	Spherical	0.1731
IDW		0.1750

gressione: Ordinary Least Squares (modello globale) e Geographically Weighted Regression (modello locale). La GWR ha permesso di ottenere risultati migliori rispetto all'OLS. Ciò è dovuto al fatto che l' OLS è un'analisi non spaziale, pertanto parte dal presupposto implicito che il rapporto tra la contaminazione del latte e del suolo è costante per tutta l'area di studio, il che è alquanto irrealistico, dato che grandi aree possono presentare sostanziali variazioni geografiche legate a molti fattori, quali ad esempio le condizioni ambientali. Entrambe le tecniche hanno comunque dimostrato che la contaminazione del suolo aveva una positiva e statisticamente significativa influenza sulla contaminazione del latte ovino, il che significa che, quando la contaminazione del suolo aumenta, aumenta anche la contaminazione del latte. Una volta ottenuto, mediante la GWR, il modello che definisce il rapporto tra suolo e latte, i dati sulla contaminazione del latte campionato nel 2009 sono stati introdotti nel modello per ottenere i valori di inquinamento del suolo. I risultati sono stati mappati per ottenere una superficie continua della contaminazione del latte ovino con dl-PCB (OMS-TEQ pg/g di grasso) (Fig. 4). Per confrontare i valori stimati, calcolati al punto 4, con quelli osservati, è stata creata una mappa continua della contaminazione del suolo nel 2009, utilizzando la stessa procedura utilizzata con i dati del 2008. La mappa continua delle concentrazioni di dl-PCB nel suolo nel 2009 ha mostrato che l'area più contaminata era la Provincia di Napoli (Fig. 5). La validazione delle stime è stata eseguita semplicemente calcolando le differenze aritmetiche tra i valori osservati e quelli stimati. La differenza è stata espressa come percentuale. L'errore medio delle stime è risultato essere del 22,9%.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Considerando l'alto grado di correlazione evidenziato dalla GWR tra la contaminazione del suolo con dl-PCB e la concentrazione degli stessi nel latte ovino ed il basso valore dell'errore medio, si può affermare che il latte di pecora può essere considerato un buon bioindicatore dell'inquinamento ambientale con dl-PCB.

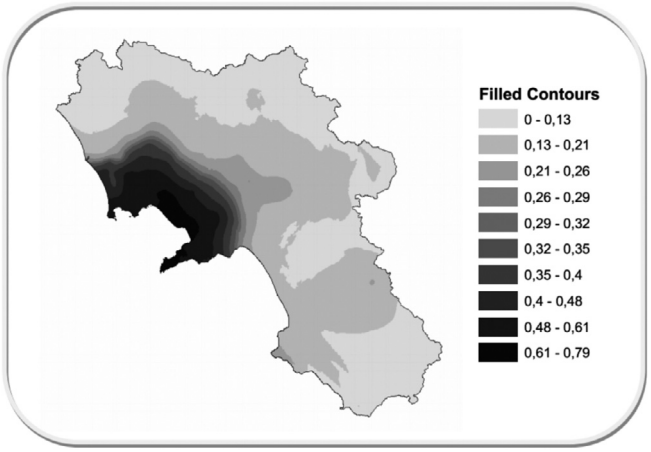


Figura 3 - Mappa predittiva delle concentrazioni di dl-PCB nel terreno utilizzando il Kriging Ordinario dopo il detrend dei dati.

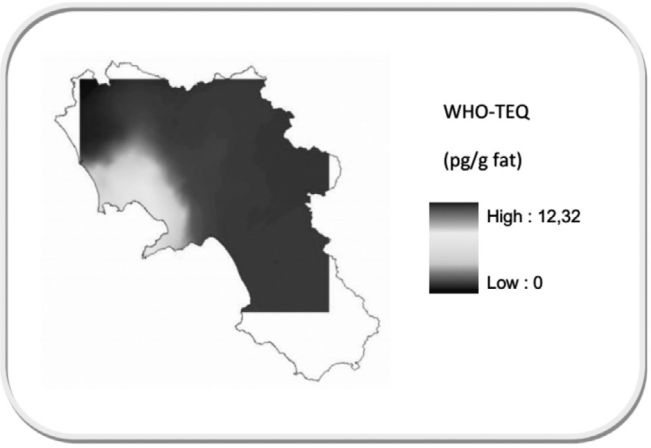


Figura 4 - Mappa predittiva della contaminazione del latte ovino con dl-PCB.

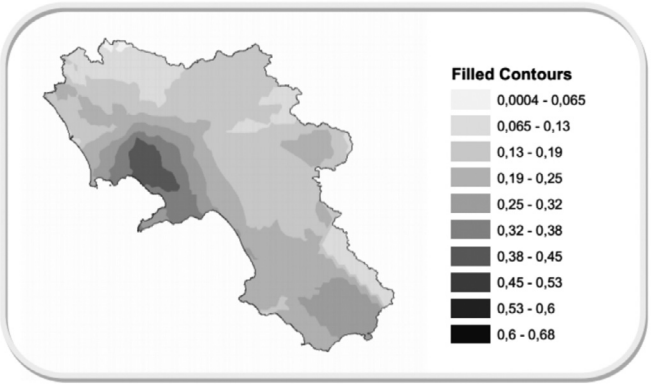


Figura 5 - Mappa predittiva delle concentrazioni di dl-PCB nel terreno nel 2009 utilizzando il Kriging Ordinario.

Sheep as bioindicator of environmental contamination by dioxins and polychlorinated biphenyls

Key words: dioxins, sheep, Geographical Information System GIS, bioindicator.

Bibliografia

WHO. Regional Office for Europe (2000). Air Quality Guidelines – Second Edition. Chapter 5.10 PCBs.

Costera A., Feidt C., Marchand P., Le Bizec B., Rychen G. (2005), Chemosphere; vol. 64 (4): 650-657.

Iannuzzi L, Perucatti A, Di Meo GP, Polimeno F, Ciotola F, Incarnato D, Peretti V, Caputi-Jambrenghi A, Pecoraro A, Manniti F, D'Alessandro, Vonghia. (2004), Mutagenesis; 19 (5): 355-359.

Perucatti A, Di Meo G.P., Albarella S, Ciotola F, Incarnato D, Caputi Jambrenghi A, Peretti V, Vonghia G, Iannuzzi L. (2006), Mutagenesis; 21: 67-75.

Wang P., Zhang Q., Wang Y., Wang T., Li X., Li Y., Ding L., Jiang G. (2009), Chemosphere; vol 76: 1498-1504.

Regolamento (UE) n. 1067/2013 della commissione del 30 ottobre 2013.

M Perugini, EGH Nuñez, L Baldi, M Esposito, FP Serpe, M Amorena. (2012) Predicting dioxin-like PCBs soil contamination levels using milk of grazing animalas indicator. Chemosphere 89 (8), 964-969.

Standard di qualità ambientale a garanzia della sicurezza e dell'accesso alla risorsa alimentare

G. BRAMBILLA

Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e connessa prevenzione primaria, Reparto di Chimica Tossicologica, Roma

Parole chiave: sostenibilità, accesso, sicurezza alimentare.

Le tematiche di sostenibilità ambientale richiedono che la valutazione e gestione del rischio sanitario legato alla salute, benessere degli animali e alla sicurezza dei loro prodotti sia condotta in modo integrato e interdisciplinare. In campo di prevenzione primaria, l'approccio di Valutazione di Impatto Sanitario fornisce lo schema logico da seguire, al fine di orientare le attività di valutazione e gestione dei rischi: Tendenza > Pressione > Stato > Impatto > Risposta (Fig. 1). La tendenza ad orientare le produzioni zootecniche in modo sostenibile, attraverso la promozione delle *family farms*, di allevamenti biologici, di catene corte di distribuzione, e/o l'utilizzo di materie prime/seconde provenienti da cicli di produzione non-food, i cambiamenti climatici, la competizione nell'utilizzo di risorse naturali per la produzione di energia, stanno esercitando delle pressioni sul modo di produrre l'alimento. richiedono un adattamento alle strategie di prevenzione e di controllo, che passano attraverso una qualifica dei mezzi di produzione naturali/ambientali. I sistemi di etichettatura "ambientale" e la percezione di qualità da parte del consumatore/acquirente (prodotto, biologico, equo solidale, a km 0, acquisto ai *farms market*, applicazione del *green public procurement nelle forniture delle mense scolastiche*) sono chiari segni di tale tendenza. In campo ambientale, gli standard di qualità in genere si riferiscono all'esposizione diretta dell'uomo ai contaminanti presenti nell'aria, nel suolo, nell'acqua. Non sempre l'esposizione indiretta a contaminanti tossici e persistenti attraverso l'alimento di origine animale, quale risultato della qualità del pascolo, dell'acqua di abbeverata, delle deposizioni sul foraggio, è adeguatamente codificata. In tale contesto, nell'ambito del progetto di Ricerca Corrente Ministero della Salute ENVIFOOD 2009, si stanno correlando i parametri tipicamente ambientali della qualità dell'aria, dell'acqua e dei suoli con l'esposizione a contaminanti tossico-persistenti (POPs) negli animali da reddito allevati in modo prevalentemente estensivo (greggi al pascolo, volatili allevati a terra), e la conseguente caratterizzazione del rischio di assunzione alimentare dei POPs in gruppi di persone che consumano prevalentemente derrate di origine animale prodotte in loco. In tale senso, la conoscenza dei dati ambientali può orientare il sistema verso l'adozione di pratiche di igiene zootecnica in grado di mitigare l'esposizione, e quindi di conciliare tra di loro la sicurezza e l'accesso alla risorsa alimentare.

Environmental quality standard to guarantee the food safety and the food security

Key words: sustainability, food security, food safety.

Bibliografia

Brambilla, G, & Testa C. (2014) Food safety/food security aspects related to the environmental release of pharmaceuticals. Chemosphere, accepted.

Doyle C, & Metcalfe O. (2003). Health Impact Assessment – a pratical guidance manual The Institute of Public Health in Ireland, available at: http://www.publichealth.ie/files/file/Health_Impact_Assessment_-_A_Practical_Guidance_Manual.pdf

Serpe F.P., Esposito M., Testa C., Cavallo S., Chiaravalle E., Manca M.C., & Brambilla G. (2013) Environmental quality criteria in animal food producing systems: a matter of food safety and food security. Environmental Engineering and Management Journal.12 (S11), 157-160.

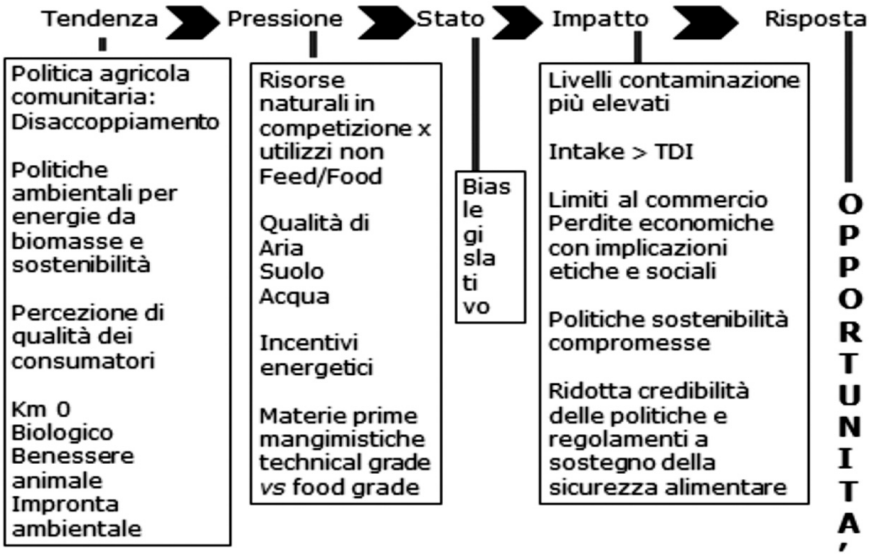


Figura 1 - Esemplificazione di uno schema di Valutazione di Impatto Sanitario applicato alla produzione di alimento di origine animale in un contesto Mediterraneo.

Impatto delle deposizioni atmosferiche totali di contaminanti organici persistenti in aree ad elevata densità industriale

V. ESPOSITO[1], A. MAFFEI[1], V. ROSITO[2], R. GIUA[2], M. BLONDA[3], G. ASSENNATO[3]

[1] ARPA PUGLIA Polo di Specializzazione Microinquinanti, Dipartimento di Taranto
[2] ARPA PUGLIA Centro Regionale Aria, Taranto
[3] ARPA PUGLIA Direzione Generale, Bari

Parole chiave: diossine, PCB, deposizioni atmosferiche, catena alimentare.

INTRODUZIONE - Nel territorio regionale pugliese, numerosi impianti industriali emettono in atmosfera grandi quantitativi di sostanze nocive. Il polo siderurgico di Taranto (ILVA Spa) contribuisce in maniera significativa alle emissioni nazionali di diossine, furani, e policlorobifenili: emette il 90% della diossina industriale italiana stimata e inventariata prodotta in Italia e il 6,9% di quella europea [Esposito et al., 2012, 2014].
In particolare, l'impianto di agglomerazione del minerale di ferro risulta essere la fonte prevalente di emissioni convogliate di diossine per gli impianti siderurgici a ciclo integrale, sia in termini di concentrazioni misurate nei fumi e sia in termini di flusso di massa annuale [Lahl, 1993; Aries et al., 2006].
Nel mese di Marzo 2008 il Dipartimento di Prevenzione della ASL Ta/1 e questa Agenzia disposero le analisi di n. 3 campioni di latte ovi-caprino prelevati presso Aziende Agricole nei comuni di Monteiasi (TA), Montemesola (TA), e Taranto. Il campione proveniente dall'Azienda Fornaro in Taranto risultò eccedente i tenori massimi di PCDD/F e PCB diossina-simili (PCB-dl) stabiliti dal Regolamento CE 1881/2006. Nei giorni immediatamente successivi furono analizzati ulteriori campioni di latte ovi-caprino ed un campione di formaggio ovi-caprino prelevati nelle immediate vicinanze dell'Area Industriale di Taranto e furono ripetute le analisi precedenti affidandole al Laboratorio Nazionale di Riferimento per le diossine dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo. Per due campioni di latte ed un campione di formaggio furono confermate concentrazioni eccedenti i tenori massimi in vigore [Diletti et al., 2007].
Alla luce di questi primi risultati è stato sviluppato un Piano Straordinario di Monitoraggio per le aziende agricole e le aree adibite a pascolo in agro della Provincia di Taranto con il coordinamento dell'Assessorato Regionale alle Politiche per la Salute cui partecipano ARPA PUGLIA, ASL TA Dipartimento di Prevenzione, con il supporto dell'Istituto Zooprofilattico di Abruzzo e Molise (Laboratorio Nazionale di Riferimento per le diossine negli alimenti) [Esposito et al., 2010].
Il Piano ha previsto l'analisi di campioni di alimenti (latte, prodotti caseari, uova, tessuti animali), mangimi e foraggi, suolo, acque sotterranee, e deposizioni atmosferiche.
Le modalità di immissione di PCDD/F e DL-PCB nell'ambiente sono molteplici, ma possono essere ridotte ad alcune vie principali, che si affiancano a quelle più ovvie come lo sversamento diretto. Le deposizioni atmosferiche secche ed umide rappresentano uno dei principali meccanismi di contaminazione della catena alimentare (e quindi dell'uomo) sia attraverso l'ingestione diretta di polveri depositate e sia attraverso la contaminazione delle produzioni alimentari (zootecniche o ittiche). Stime attendibili dimostrano che più del 90% dell'esposizione umana alle diossine e ai PCB diossina-simili deriva dagli alimenti; circa il 90% dell'assunzione per via alimentare è riconducibile ai prodotti di origine animale. Il materiale particellare sedimentabile è in grado di trasferire il suo carico di microinquinanti alla vegetazione, ai corpi idrici ed ai depositi idrici superficiali, agli edifici e a qualsiasi tipo di superficie per semplice deposizione secca, mentre le piogge sono in grado di depositare anche le particelle altrimenti sospese ed in parte gli inquinanti presenti in fase gassosa. Per questo motivo, il monitoraggio delle deposizioni atmosferiche di microinquinanti organici riveste particolare importanza nella valutazione dell'impatto sull'ambiente delle emissioni di diossine da parte di fonti fisse (ad. es. emissioni a camino) e diffuse (ad es. movimentazione e stoccaggio di rifiuti) e sono oggetto di attenzione da parte delle autorità Europee da molti anni [Esposito e Scortichini, 2014].
Uno studio completo della massa totale di sostanze inquinanti che ricadono al suolo tramite deposizioni atmosferiche richiede una copertura temporale almeno annuale. Le deposizioni totali, infatti, sono fortemente influenzate dalle condizioni meteo-climatiche e pertanto possono subire fluttuazioni stagionali.
Nonostante l'assenza di normative specifiche, esistono valori di riferimento sviluppati sulla base della valutazione del rischio per la popolazione esposta o sull'analisi statistica dei valori osservati. In Germania è in uso una linea guida che indica un valore massimo tollerabile per la deposizione atmosferica pari a 4 pg WHO-TEQ/m^2 die (somma PCDD/F + DL-PCB) specifica per i siti di pascolo.
In Francia è attiva dal 2006 una estesa rete di monitoraggio delle deposizioni atmosferiche che ha permesso di raccogliere un numero relativamente elevato di campioni (>1000) nell'ambito della sorveglianza degli impianti di incenerimento di rifiuti.
L'analisi statistica di questi dati ha portato le Autorità francesi alla definizione di una "soglia di fondo" pari a 5 pg WHO-TEQ/m^2 die ed una "soglia critica" pari a 16 pg WHO-TEQ/m^2 die. Recentemente, le Autorità belghe hanno avanzato una proposta alla Commissione Europea per l'adozione di livelli tollerabili di deposizioni totali di PCDD/F e DL-PCB pari a 8,2 pgWHO-TE/m^2 die su base annua. Una possibilità di integrazione fra i vari approcci adottati può essere definita tramite uno studio di modelli "a catena": un modello atmosferico per il calcolo delle deposizioni secche e umide, un modello per il calcolo delle concentrazioni nel suolo e sulla vegetazione, ed infine un modello che descriva il trasferimento degli inquinanti a latte e carne negli animali al pascolo (cow model).
MATERIALI E METODI - Campionamento: I campioni mensili di deposizione atmosferica sono stati prelevati secondo metodo ISTISAN 06/38 e UNI EN 15980:2011 utilizzando campionatori Depobulk in vetro Pyrex (Labservice Analytica, Anzola Emilia BO), per una durata di circa 30 giorni/campione.
Analisi: L'estrazione delle aliquote solide è stata effettuata tramite tecnica a Fluido Pressurizzato (PLE) secondo metodo EPA 3545a con strumentazione ASE (Dionex, Sunnyvale CA USA), mentre l'estrazione delle aliquote liquide è stata effettuata tramite estrazione liquido-liquido in imbuto separatore o tramite estrazione su fase solida (SPE). Per la purificazione degli estratti è stata impiegata una apparecchiatura PowerPrep (Fluid Management System, Waltham, Massachusetts). Le determinazioni analitiche tramite spettrometria di massa e diluizione-isotopica sono state eseguite secondo metodo EPA 1613 per PCDD/F, metodo EPA 1668 per PCB e 15549 per IPA

su strumentazione DFS High Resolution GC/MS (Thermo Fisher, Bremen, Germany). Le PCDD/Fs sono state separate tramite gascromatografia su colonna capillare DB-5 MS (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm, J&W Scientific, California) e quantificate tramite spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS), ad una risoluzione di 10000 e ionizzazione elettronica (EI) a 45 eV in modalità SIM. IPA e PCBs sono stati separati tramite GC su una colonna capillare DB-5 MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm, J&W Scientific, California) e quantificate tramite HRMS, nelle stesse condizioni operative delle PCDD/F. I valori di Tossicità Equivalente sono stati calcolati usando i NATO Toxic Equivalency Factors (I-TEFs) espressi come limite inferiore (lower-bound), e World Health Organization Toxic Equivalency Factors (WHO-TEFs 1998).

RISULTATI E DISCUSSIONE - A partire dal mese di Maggio 2008 sono installati in agro di Taranto n. 4 deposimetri del tipo adatto al campionamento dei microinquinanti organici. La localizzazione dei siti di campionamento risponde all'esigenza di monitorare le ricadute di microinquinanti organici sulle aziende agricole sottoposte a vincolo sanitario da parte della ASL TA e l'impatto delle emissioni industriali sul centro abitato a ridosso della zona industriale (Quartiere Tamburi).

È stato predisposto anche il sito di fondo urbano in territorio di Talsano. In questo contesto il termine "sito di fondo" non è da intendersi come sito esente da contaminazione, quanto piuttosto nel senso specificato dal D.Lgs. 152/07 all'All. III e cioè "Stazioni di misurazione di fondo: stazioni ubicate in posizione tale che il livello di inquinamento non è influenzato prevalentemente da emissioni da specifiche fonti (industrie, traffico, riscaldamento residenziale, ecc.) ma dal contributo integrato di tutte le fonti poste sopravento alla stazione rispetto alle direzioni predominanti dei venti nel sito." Il sito "Quartiere Borgo" è di più recente installazione (dicembre 2008) e rappresenta un sito urbano esente da traffico (per la notevole altitudine cui è collocato il deposimetro rispetto al piano stradale, circa 50 metri). La localizzazione delle stazioni di campionamento è presentata in Figura 1.

L'entità delle deposizioni di PCDD/F e PCB diossina-simili misurate per le postazioni prossime ad aree su cui insistono aziende agricole/zootecniche appare compatibile con le concentrazioni di diossine riscontrate in campioni di terreno, acqua e latte/carni in animali da allevamento. Sono risultate particolarmente elevate le deposizioni misurate per la stazione di campionamento "Quartiere Tamburi" e "Masseria del Carmine", entrambe eccedenti le soglie tollerabili proposte in sede CE [Desmet et al. 2008, LAI, 2004] pari ad 8,2 pgTE/mq die e 4 pgTE/mq die per la somma di PCDD/F e PCB diossina simili. Invece, i flussi di deposizione di PCDD/F presso le postazioni "Fondo urbano" e "Quartiere Borgo" risultano relativamente più basse, sebbene si collochino a ridosso delle soglie tollerabili.

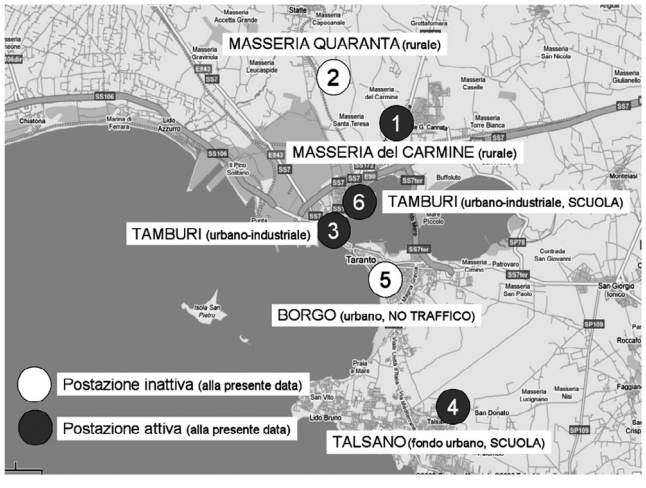


Figura 1 - Localizzazione delle stazioni di campionamento delle deposizioni atmosferiche totali.

Tabella 1 - Risultati (medie annuali) per campioni di deposizione atmosferica totale.

Anno	Mass. Carmine	Tamburi	Palazzo del Governo	Masseria Quaranta	Scuola Deledda	Talsano (fondo)
y	*pg TE/mq die (media annuale somma PCDD/F + dlPCB)*					
2008	13,92	24,09		7,17		6,89
2009	8,61	15,68	6,99			6,5
2010	9,1	13,33	3,7			6,98
2011	8,25	20,24	6,59			5,69
2012	8,32				10,31	

Le medie annuali di deposizioni atmosferiche di PCDD/F + PCB diossina-simili registrate per le postazioni Tamburi e Masseria del Carmine sono significativamente eccedenti le soglie tollerabili di 8,2 e 4 pg WHO-TE/mq die (Fig. 2).

La Tabella 1 riassume i dati raccolti nel corso del Piano Straordinario di Monitoraggio.

CONCLUSIONI - Nel luglio 2008 l'Arpa Puglia ha posto con forza, sulla base delle numerose evidenze sperimentali, la necessità di definire i limiti alle emissioni degli impianti industriali dell'area e in particolare di quelli contenenti sostanze cancerogene e bioaccumulabili e la necessità di portare le emissioni di diossine nei fumi dell'impianto di agglomerazione dello Stabilimento ILVA Spa ai livelli più bassi ottenibili riportati in letteratura (0,4 ng I-TEQ/mc). Dalle rilevazioni condotte nell'anno 2008 è infatti emerso che l'Ilva, pur nelle soglie consentite dalla legislazione nazionale, emetteva

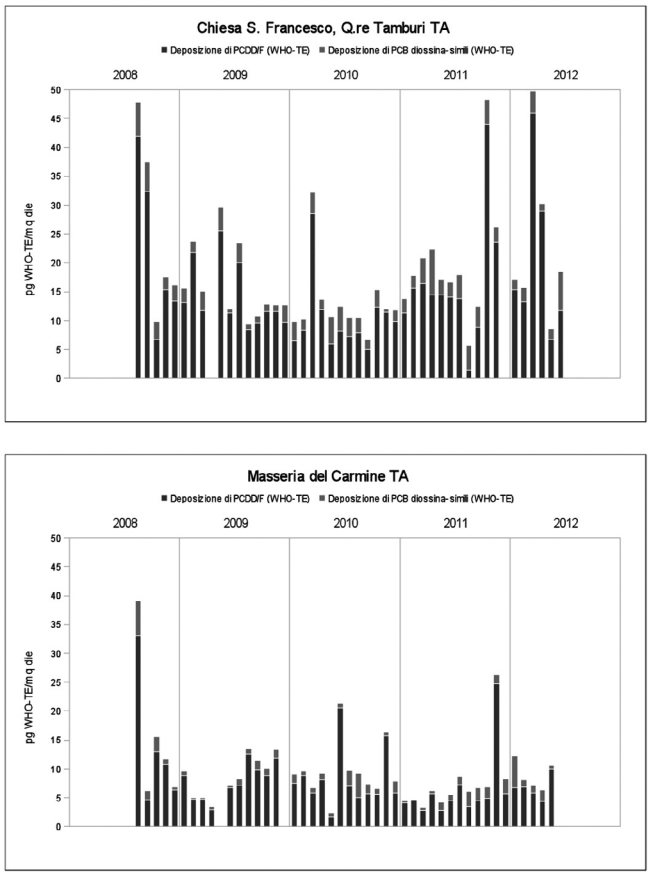


Figura 2 - Andamento temporale (campioni mensili) delle deposizioni atmosferiche totali per le stazioni "Tamburi" e Masseria del Carmine".

quantità rilevanti di diossina che potevano essere drasticamente ridotte con l'adozione di tecnologie innovative. I risultati dei prelievi di emissioni in atmosfera per la ricerca di diossina avevano infatti mostrato valori fino a 8.3 ng I-TE/mc, poi scesi recentemente anche al di sotto di 0,1 ng I-TE/mc.

Scaturisce quindi la necessità di sviluppare un modello integrato di sorveglianza nel settore ambientale e sanitario, che poggi sulla disponibilità di dati analitici affidabili, e disponibili in tempi rapidi, adeguati alle necessità del decisore.

Occorre produrre i dati analitici necessari alla valutazione della correlazione tra esposizioni ambientali attraverso tutte le matrici e gli effetti sulla salute umana, e potenziare le attività di controllo degli Enti coinvolti (ARPA, ASL, IZS). Questi diversi Enti hanno condiviso in passato, in alcuni casi con discreto successo, alcune esperienze nella gestione di emergenze, relativamente al proprio settore di competenza.

In conclusione, occorre affrontare il problema in maniera specifica se si intende proteggere efficacemente la salute umana. Per ridurre il pericolo di contaminazione nell'uomo è importante diminuire i livelli di queste sostanze nella catena alimentare e, il metodo più efficace, è diminuire la contaminazione ambientale. Per i motivi sopra esposti è auspicabile una sempre più stretta collaborazione tra gli Enti coinvolti per colmare le lacune ancora esistenti che riguardano, in particolare, le conoscenze e la legislazione.

Impact of Persistent Organic Pollutants (POPs) bulk atmospheric depositions in areas with high industrial density

Key words: dioxin, PCB, atmospheric deposition, food-chain.

Bibliografia

Aries E., Anderson D.R., Fisher R., Fray T.A.T. and Hemfrey D., 2006. PCDD/F and "Dioxin-like" PCB emissions from iron ore sintering plants in the UK. Chemosphere 65, 1470- 1480.

De Fré, R., Cornelis C., Mensink C., Nouwen J., Schoeters G., Roekens E., 2000. Proposed limit values for dioxin deposition in Flanders. Organohalogen Compounds 45, 324-327.

Desmedt M., Roekens E., De Fré., Cornelis C., Van Holderbeke M., 2008. Threshold values for atmospheric deposition of dioxins and PCBs. First results of deposition of DL-PCBs in Flanders (Belgium). Organohalogen Compounds 70, 1232-1235.

Diletti G., Ceci R., Scortichini, G., Migliorati G., 2009. Dioxin levels In livestock and grassland near a large industrial area in Taranto (ITALY). Organohalogen Compounds 38, 2359-2363.

Esposito V., Maffei A., Castellano G., Martinelli W., Conversano M., Assennato G., 2010. Dioxin levels in grazing land and groundwater in the surrounding of a large industrial area in Taranto (Italy). Organohalogen Compounds 72, 736-739.

Esposito V, Maffei A, Ficocelli S, Spartera M, Giua R, Assennato G, 2012. Dioxins from industrial emissions to the environment. The Taranto case study. Ital. J. Occup. Environ. Hyg., 3(1), 42-48.

Esposito V, Scortichini G, 2014. Come proteggere la catena alimentare. Ecoscienza, Numero 1-2014, 56-57.

Esposito V, Maffei A, Bruno D, Varvaglione B, Ficocelli S, Capoccia C, Spartera M, Giua R, Blonda M, Assennato G. 2014, POP emissions from a large sinter plant in Taranto (Italy) over a five-year period following enforcement of new legislation. Science of the Total Environment, in press.

Lahl, U., 1993. Sintering plants of steel industry – The most important thermical PCDD/F source in industrialized regions? Organohalogen Compounds 11, 311-314.

LAI - Bericht des Länderausschusses für Immissionsschutz (LAI). 2004. Bewertung von Schadstoffen, für die keine Immissionswerte festgelegt sind - Orientierungswerte für die Sonderfallprüfung und für die Anlagenüber-wachung sowie Zielwerte für die langfristige Luftreinhalteplanung unter besonderer Berücksichtigung der Beurteilung krebserzeugender Luftschadstoffe. Vom 21.

Livelli di contaminazione da diossine, policlorobifenili e metalli pesanti del latte ovino proveniente dal SIN di Porto Torres

G. CHESSA

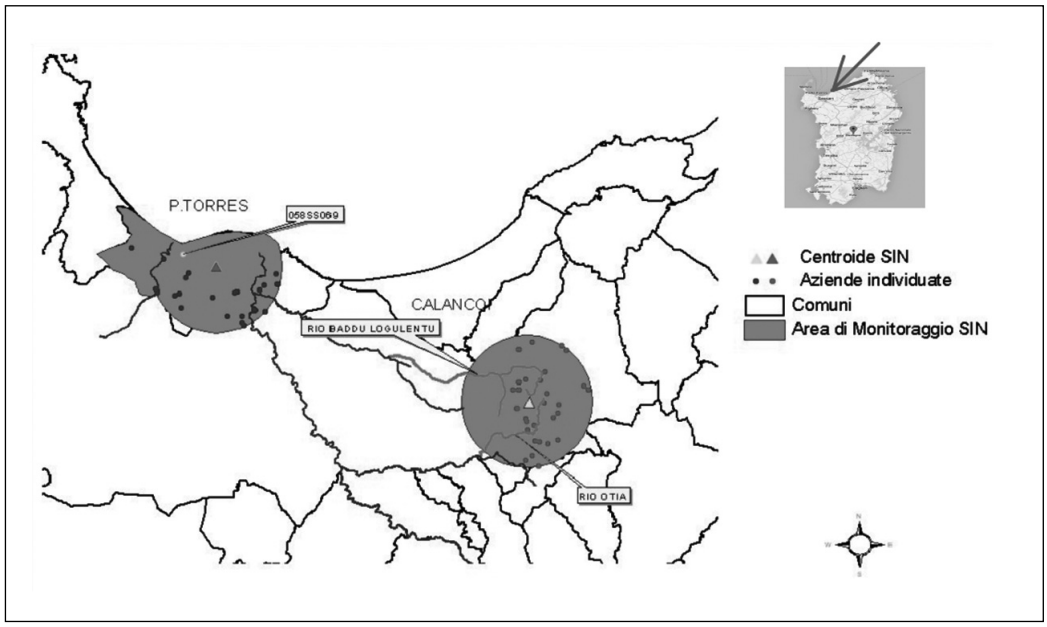
Istituto Zooprofilattico della Sardegna, S.C. Igiene degli Allevamenti e delle Produzioni Zootecniche, Laboratorio di Chimica Ambientale e Tossicologia, Sassari

Parole chiave: sicurezza alimentare, sin, diossine, pcbs, metalli pesanti, Porto Torres, latte ovino.

Le caratteristiche ambientali delle zone di produzione agro-zootecniche e gli indici di qualità, che ne definiscono l'impatto, condizionano fortemente la qualità e la sicurezza degli alimenti prodotti. Studi oramai consolidati mostrano infatti come esistano evidenti e misurabili interazioni tra alimento, territorio e salute. Nell'ottica di monitorare la sicurezza degli alimenti prodotti in tutto il territorio nazionale, il Ministero della Salute Direzione Generale per l'igiene, la sicurezza degli alimenti e la nutrizione, Ufficio III, ha richiesto già da diversi anni un'attività di controllo delle produzioni zootecniche prodotte nei Siti di Interesse Nazionale (SIN). I **SIN** sono aree critiche per le quali è ufficialmente riconosciuto lo status di area contaminata ad elevato impatto ambientale. In tali aree sono permesse attività agro-zootecniche e a tutt'oggi non risultano, se non per zone estremamente limitate, criteri di interdizione all'utilizzo agricolo. Le attività di monitoraggio sono state sviluppate attraverso l'attuazione di piani, la cui predisposizione e realizzazione è stata demandata alle singole regioni. Gli obiettivi principali erano quelli di realizzare il controllo degli alimenti prodotti nei SIN, su tutto il territorio nazionale e acquisire i dati necessari per una corretta definizione dei livelli di rischio per i principali contaminanti. Per fornire un'informazione diretta sul livello di contaminazione ambientale di specifiche sostanze trasferibili nella catena alimentare (metalli, POPs) sono stati individuati, quale indicatore d'elezione, l'allevamento ovi-caprino ed il latte prodotto quale alimento da controllare. Le specie animali da pascolo, quali gli ovini e i caprini, risultano particolarmente sensibili alla presenza di inquinanti ambientali. Il consumo di pascolo e l'ingestione di suolo (che potrebbe risultare contaminato da deposizioni aeree) si riflette infatti sulla qualità e sui livelli di contaminazione del latte prodotto. Un approfondimento analitico sulla migrazione delle sostanze inquinanti nella catena alimentare, oltre a fornire uno strumento per la valutazione del rischio sanitario e di garanzia per la protezione della salute, potrebbe fornire elementi di conoscenza utili anche alle autorità competenti in materia ambientale. I risultati dei controlli potrebbero infatti determinare la richiesta di interventi urgenti, di messa in sicurezza dei territori, dettati da un reale rischio per la salute pubblica. Infine, va sottolineato che il dato sanitario, derivante nel suo complesso anche da parametri di sicurezza alimentare, rappresenta l'elemento decisivo per l'attuazione o meno degli interventi di bonifica dei siti contaminati.

In Sardegna, con l'articolo 14 della legge 31 luglio 2002 n. 179, è stato istituito il sito di interesse nazionale **"Aree industriali di Porto Torres"** comune situato nella zona N-O dell'isola. In esso sono presenti uno stabilimento petrolchimico, attività industriali di supporto al petrolchimico, centrali elettriche e numerose aree di discarica. Il sito è stato ampliato nel 2005, con l'inserimento nel programma di bonifica nazionale, di una discarica localizzata nell'area di Calancoi, situata a Sud-Est del comune di Sassari, e che dista circa 23 km dal perimetro del SIN iniziale. In totale il sito ha un'estensione di circa 4500 ettari, di cui 1800 ettari di aree a terra e circa 2700 ettari di aree marine interdette. La caratterizzazione ambientale mostra contaminazione da idrocarburi sia leggeri che pesanti e da metalli.

Il piano per il controllo degli alimenti ha avuto inizio nel luglio 2013, con i prelievi provenienti da aziende localizzate nell'area industriale nei comuni di Porto Torres, Stintino e Sassari. Nel totale sono stati prelevati 60 campioni di latte ovi-caprino, 30 nel sito di Porto Torres e 30 nel sito di Calancoi. Le analisi per la determinazione dei metalli, PCDD/F e PCBs sono state effettuate presso il laboratorio accreditato dell'IZS della Sardegna. Le procedure analitiche adottate sono in accordo con i regolamenti di QA/QC previsti dalla legislazione EU in materia di controllo degli alimenti. Il lavoro illustra i risultati dei livelli di contaminazione ottenuti e fornisce un raffronto con quelli osservati su campioni di latte provenienti da tutto il territorio regionale.



Dioxins, Polychlorinated Biphenyls and Heavy Metals Levels an Sheep Milk from Contaminated Sites of Porto Torres

Key words: food safety, contaminated sites, dioxins, pcbs, heavy metals, Porto Torres, ovine milk.

Monitoraggio delle produzioni zootecniche in Campania: dai SIN alla Terra dei Fuochi

M. ESPOSITO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (Napoli)

In tema di contaminazione ambientale e possibili effetti sulla sicurezza degli alimenti, il monitoraggio delle produzioni zootecniche in regione Campania può rappresentare per certi versi un sistema pilota su cui costruire ulteriori progetti di controllo delle filiere produttive.

Difatti l'esperienza "emergenza diossina" vissuta nel 2008 e risolta nel giro di poche settimane costituisce un modello applicabile a situazioni analoghe ma soprattutto nella prevenzione. La collaborazione tra diversi enti, la cooperazione di vari laboratori analitici e l'uso dei sistemi di georeferenziazione hanno consentito di identificare in una vasta area di attività zootecniche quelle che erano contaminate e bloccarne le produzioni fino al recupero di situazioni di conformità.

L'obiettivo del piano è stato quello analizzare le materie prime in modo da individuare le partite eventualmente contaminate ancora prima che queste fossero lavorate e trasformate in prodotto finito. In tal modo si è cercato di evitare che materie prime contaminate potessero finire nel circuito produttivo, al fine di preservare in primo luogo la sicurezza alimentare dei cittadini, nonché l'economia locale.

In queste aree contaminate a distribuzione puntiforme, in assenza di fonti riconosciute di inquinamento (fabbriche, aree industriali, ecc.) e grazie allo studio dei profili dei congeneri di PCDD/F e PBB diossina simili, è stato possibile individuare come sorgente, i roghi di rifiuti contenenti materiali che nella combustione incompleta possono sprigionare diossine.

Da quella esperienza in poi, si sono succeduti numerosi piani di campionamento, sia nazionali che regionali, per la ricerca di contaminanti ambientali. (diossine, PCB, IPA e metalli pesanti) attraverso i quali sono stati effettuati più di 2000 campionamenti (Fig. 1).

Il primo piano regionale successivo all'emergenza UE è stato definito "Piano regionale di Sorveglianza" e ha interessato, come matrici, il foraggio e il latte di varie specie, in funzione delle realtà produttive regionali. I risultati di questo piano hanno permesso da un lato di concludere che la provincia di Salerno non avendo mai presentato non conformità per diossine e PCB, può considerarsi sicura dal punto di vista della contaminazione ambientale, dall'altro di identificare una ristretta area situata tra le province di Napoli e di Caserta sovrapponibile come rischio di inquinamento a quella già segnalata in precedenza.

Un ulteriore piano della durata di tre anni è il Piano Regionale di Monitoraggio della Contaminazione da Diossine e PCB (Fig. 2), sviluppato tra il 2011 e il primo semestre 2014, dopo aver individuato cinquanta aziende situate nella zona a rischio che sono state monitorate ogni sei mesi, attraverso il prelievo di latte e alimento per animali, per verificare i livelli di PCDD/F e PCB e il loro andamento nel tempo.

Partendo, da un campionamento allargato che ha interessato tutto il territorio regionale, si è giunti ad una progressiva focalizzazione dei controlli sulle aree a "maggior rischio" ambientale. In questo percorso si sono inseriti i Piani SIN (Siti di Interesse Nazionale) su quelle zone nelle quali, in seguito ad attività umane svolte o in corso, è stata accertata un'alterazione delle caratteristiche qualitative dei terreni, delle acque superficiali e sotterranee.

Per la Campania, i siti indagati sono stati dapprima il bacino del Fiume Sarno, poi il Litorale Domitio e Agro Aversano e, nel 2013, i restanti SIN (Pianura, Bagnoli, Napoli Orientale e Litorale Vesuviano).

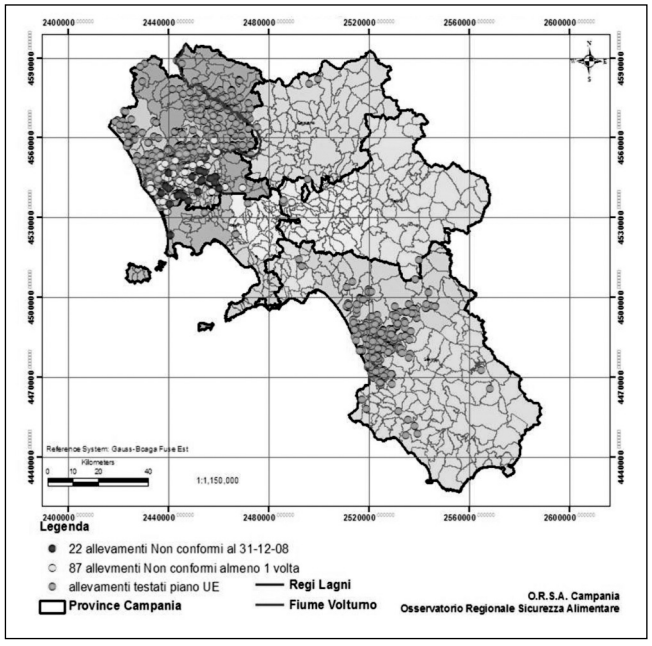


Figura 1 - Distribuzione esiti controlli piano UE.

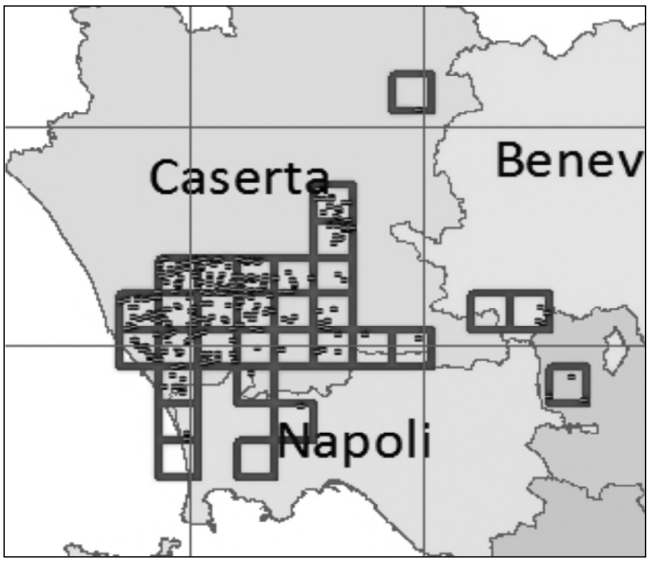


Figura 2 - Allevamenti piano di monitoraggio regionale 2011-2014.

Sempre nell'ottica di assicurare il monitoraggio del territorio attraverso il controllo delle produzioni alimentari di origine animale o destinate agli animali, il piano ha esteso i controlli anche su aree non strettamente localizzate all'interno dei SIN. Ne è un esempio il Piano sulla Molluschicoltura e sul Pescato che ha stabilito la ricerca di contaminanti nei mitili prodotti in Campania e nei pesci prelevati in corrispondenza dei principali porti commerciali della regione. Un ulteriore piano ha preso origine inoltre dal protocollo di gestione dei grandi roghi incontrollati di rifiuti. Questo piano prevede un monitoraggio da effettuare nelle aree dove si sono sviluppati degli incendi e dove quindi è stata identificata una fonte di inquinamento certa: esso è teso ad evidenziare particolari situazioni di rischio cui sono state esposte le matrici alimentari vegetali, gli alimenti per animali e le produzioni zootecniche a causa dei fenomeni di combustione.
Gli esiti analitici di tutti i controlli effettuati a tutt'oggi non hanno tuttavia restituito uno scenario preoccupante. Le percentuali di positività dei campioni sono prossime allo zero e laddove siano state individuate situazioni critiche (superamento dei livelli di azione) sono state immediatamente poste in essere misure preventive rigorosissime.
Sebbene fino ad oggi siano state messe in campo tutte le misure necessarie a prevenire effetti nocivi sulla salute umana, numerosi sono i fattori che influenzano la percezione del rischio da parte dell'opinione pubblica, che non sempre viene orientata correttamente alla comprensione dei veri pericoli e dei rischi ad essi associati. La proposizione del tema della salute pubblica da parte dei media è sicuramente uno degli elementi più importanti ma questa non sempre avviene nel modo migliore generando confusione e timori nei consumatori.
L'espressione "Terra dei fuochi" citata per la prima volta nel 2003 nel Rapporto Ecomafie curato da Legambiente ha finito per identificare una vasta area situata tra le province di Napoli e Caserta, caratterizzata dallo sversamento illegale da parte di organizzazioni criminali, nelle campagne o ai margini delle strade, di rifiuti anche tossici che poi sono dati alle fiamme. Negli ultimi mesi l'interesse mediatico sulla Terra dei Fuochi è cresciuto in maniera esponenziale, così come la preoccupazione che la diffusione degli inquinanti possa interessare non solo l'aria ma anche gli alimenti, siano essi di origine vegetale o animale.
Infatti, differentemente da quanto avviene per gli alimenti di origine animale, in cui l'inquinamento deriva o dall'assunzione da parte dell'animale di alimenti contaminati, quali ad esempio il foraggio, o da ragioni etologiche come il leccamento delle staccionate o l'ingerimento accidentale di terreno durante il pasto, i vegetali possono essere contaminati durante la coltivazione o attraverso l'uso di acque irrigue contaminate o per ricaduta di particolato originatosi durante i roghi tossici.
La pressione mediatica oltre alle richieste dell'opinione pubblica ha portato alla emanazione di un decreto ministeriale da cui è scaturito un piano di monitoraggio su varie matrici ambientali e alimentari, in particolare i vegetali, per la ricerca di contaminanti sia i normati che i non normati, per i quali è opportuno conoscere i tenori di fondo e confrontarli con valori di riferimento per stabilire il grado di rischio per la salute dell'uomo e dell'ambiente. Parallelamente, la Regione Campania ha emesso un ulteriore Piano di Monitoraggio su matrici alimentari di origine animale e vegetale da effettuarsi nell'area identificata come Terra dei Fuochi.
L'area da indagare ai fini di questo Piano è rappresentata dal quadrilatero compreso tra il Litorale Domitio-Flegreo, l'Agro Aversano-Atellano, l'Agro Acerrano-Nolano e Vesuviano e la città di Napoli, zona nota come "Terra dei Fuochi" (Fig. 3). Nella suddetta area sono stati compresi i 57 Comuni individuati dalla direttiva interministeriale prevista dal Decreto Legge 10 dicembre 2013 n.136 "Disposizioni urgenti dirette a fronteggiare emergenze ambientali e industriali ed a favorire lo sviluppo delle aree interessate", convertito con Legge n. 6 del 6 febbraio 2014, quindi i Comuni appartenenti all'ex-SIN Agro Aversano e Litorale Domitio Flegreo (in cui ricadono anche quei comuni selezionati per il loro precedente coinvolgimento nell'emergenza "diossine"), i Comuni appartenenti all'ex-SIN Litorale Vesuviano e infine, i Comuni integrati nell'elenco per continuità territoriale.
L'area descritta è stata suddivisa con il metodo della griglia a maglie quadrate di 5x5 km, ottenendo 127 celle all'interno delle quali saranno effettuati i campionamenti delle matrici alimentari previsti dal piano.
L'identificazione delle aziende agricole da sottoporre a campionamento è stata effettuata esclusivamente in quei comuni in cui il rapporto tra Superficie Agraria Utilizzata (SAU) e Superficie Agraria Totale (SAT) è maggiore del 10%.
In merito ai criteri per l'identificazione dei fondi agricoli da campionare, si è tenuto conto delle indicazioni derivanti dai documenti prodotti ai sensi della Direttiva Ministeriale del 28 febbraio 2014, nonché di quanto emerso nel corso della progettualità ECOREMED, condotta da UNINA, ARPAC e Regione Campania, in particolare per i campi in cui il campionamento di suolo ha evidenziato non conformità per alcuni contaminanti (As, Pb, Cd, PCDD/F), e concedendo priorità temporale ai terreni agricoli produttivi ricadenti nei siti classificati con livelli di rischio elevato.
A livello locale, le aziende agricole sono identificate dal personale ASL in relazione alle banche dati esistenti o in base alla conoscenza diretta del territorio. Il campionamento riguarda tutte le colture destinate all'uso alimentare umano presenti nel fondo agricolo al momento del campionamento, nei fondi localizzati quanto più vicino possibile ai punti sopra citati. Per quanto riguarda le aziende zootecniche ad orientamento produttivo da latte, i campionamenti sono effettuati nelle celle dove è risultato presente almeno un allevamento e sempre a partire dalla maggior vicinanza ai punti di cui sopra.
In definitiva, la regione Campania pur non avendo sul suo territorio degli insediamenti industriali che abbiano compromesso in maniera massiva l'ambiente, si trova investita da una problematica di contaminazione ambientale puntiforme, che richiede un monitoraggio più attento e soprattutto molto più diffuso allo scopo di ve-

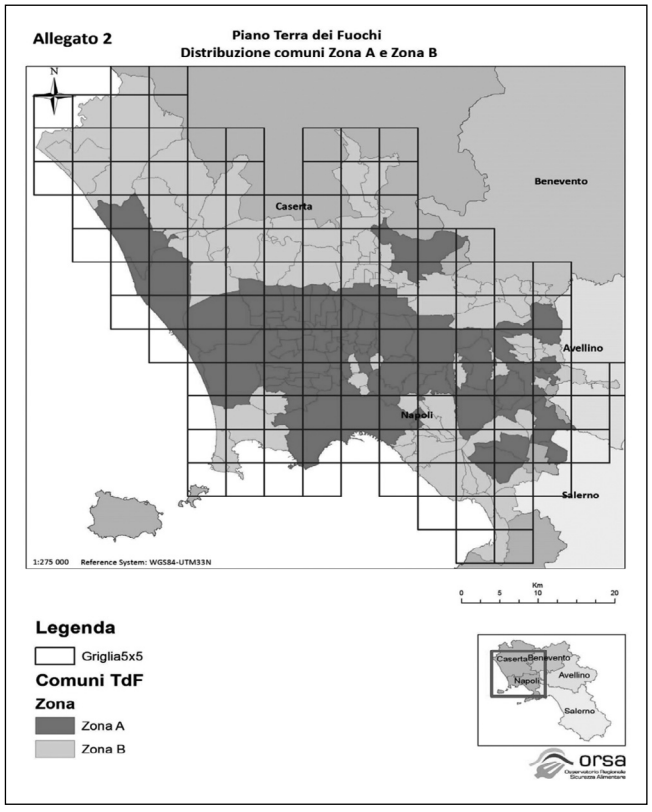


Figura 3 - Distribuzione Comuni Piano Terra dei Fuochi 2014.

rificare in primo luogo la sicurezza alimentare anche attraverso il controllo della contaminazione ambientale.
L'utilizzo di alcune specie animali e degli alimenti da essi derivati, in primo luogo la pecora che per le sue caratteristiche etologiche, assume un ruolo importante come indicatore dello stato dell'ambiente, senza trascurare le specie come la bufala che rappresentano uno dei cardini della zootecnia campana.

Monitoring of livestock production in Campania: from SIN to the "Land of fires"

Key words: diossine, PCB, latte, Campania / Dioxin, PCB, milk, Campania.

Bibliografia

Esposito M, Serpe FP, Cavallo S, Pellicanò R, Gallo P, D'Ambrosio R, Baldi L, Iovane G, Serpe L. (2010) A survey on polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls content in milk from sheep and goat from Campania (Italy). Food Additives and Contaminants 3 (1); 58-63.

Esposito M, Serpe FP, Neugebauer F, Cavallo S, Gallo P, Colarusso G, Baldi L, Iovane G, Serpe L (2010) Contamination levels and congener distribution of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in buffalo's milk from Caserta province (Italy) Chemosphere 79; 341-348.

Esposito M, Cavallo S, Colarusso G, Serpe P, Gallo P, D'Ambrosio R, Serpe L, Baldi L, Iovane G. (2009) Il piano UE in Campania: un modello operativo per fronteggiare l'emergenza Diossine. La Rivista di Scienza dell'Alimentazione, 3; 27-40.

Colarusso G. Cavallo S., Pellicanò R. Relazione sulla attuale contaminazione da diossine in Campania, triennio 2008/2010 http://www.orsacampania.it/wp-content/uploads/2011/07/Report-diox-triennio.pdf.

TAVOLA ROTONDA

Le nuove frontiere per lo studio delle patologie emergenti: tra genomica e proteomica

MALDI-TOF MS: the new frontier for the diagnosis and epidemiological surveys on bacterial agents

H. TOMASO[1], A. KARGER[2]

[1] Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Jena, Germany
[2] Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Riems, Germany

Key words: bacterial identification, mass spectrometry.

INTRODUCTION - The Centers for Disease Control in Atlanta, USA, have classified several zoonotic bacteria as high threat biological agents, because they have serious impact on human and animal health (Rotz *et al.*, 2002). Rapid identification of biological agents is crucial, because they can cause incapacitating or life threatening disease and some are intrinsically resistant to many antibiotics. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is known to be a rapid, accurate and inexpensive method for direct identification and differentiation of microorganisms.

The probably most infamous biological agent is *Bacillus anthracis*, which causes anthrax in ruminants and humans. The bacterium forms robust spores that persist for decades in the environment (e.g. soil). When these spores are aerosolized, they can cause pulmonary anthrax that is very often fatal.

Burkholderia pseudomallei and *Burkholderia mallei* are genetically closely related species. *B. pseudomallei* causes melioidosis in humans and animals in endemic areas such as Southeast Asia and northern Australia, whereas *Burkholderia mallei* is the causative agent of glanders in equines and rarely also in humans. These bacteria are intrinsically resistant to many antibiotics. *Brucella* species have a large impact on animal health, reproduction and milk production in many animals. The disease is re-emerging in southern Europe and highly prevalent in other countries around the Mediterranean Sea. The disease is transmitted to humans especially by consumption of raw milk products or meat. Infected humans have to be treated over many weeks to months with a combination of antibiotics. *Yersinia pestis* causes plague, which is still endemic in Asia, the Americas, and Africa. Epidemics of plague in the past killed millions of people and changed the course of history in many regions of Europe, Africa and Asia. The disease can be transmitted from animal reservoirs to humans by fleas, but especially pneumonic plague can also be spread from human to human. *Francisella tularensis* causes a plague-like disease and is endemic in many regions of the northern hemisphere. Human infections are usually caused by direct contact with infected hares or their carcasses, or stings of infected mosquitos (especially in Scandinavia).

Here, we provide results obtained using MALDI-TOF MS for the identification of biological agents based on our own previous studies, routine work, and from a ring trial. We discuss practical aspects and limitations of the method.

MATERIALS AND METHODS - A prospectively collected, consecutive series of *Brucella* spp. (n=67), *Francisella* spp. (n=78), *Burkholderia mallei* / *Burkholderia pseudomallei* complex (n=17), as well as *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* strains was tested in this study from January 2013 until May 2014. These isolates were used to evaluate our own collections of main spectra that were described previously [Karger *et al.*, 2012, Karger *et al.,* 2013, Müller *et al.*, 2013. We applied these procedures in the routine work of OIE and National Reference Laboratories for the respective pathogens. Additionally, we validated our MALDI-TOF MS in a ring trial organized by the Robert Koch Institute (European Commission Joint Action QUANDHIP –EQAE 2013, Contract number: 2010 21 02, Berlin, Germany).

Proteins were extracted using the ethanol/formic acid preparation procedure [Sauer *et al.* 2008]. Briefly, for each strain bacterial colonies were suspended in 300 µl of HPLC grade water. A total of 900 µl of HPLC grade ethanol (Roth, Karlsruhe, Germany) was added. This mixture was incubated for 90 min to inactivate the bacteria and the rest of the preparation procedure was carried out under BSL 2 conditions. The samples were centrifuged twice at 13,000 rpm for 2 min and in each case the supernatant was removed. The pellet was resuspended in 50 µl of 70% formic acid (Sigma, Germany) and subsequently mixed with the same volume of pure acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany). After centrifugation (13,000 rpm; 2 min), the supernatant was spotted (1 µl per spot) onto polished steel MALDI target plates. The air-dried protein extracts were overlaid with 1 µl of matrix solution (10 mg/ml α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid in 50% acetonitrile/2.5% trifluoroacetic acid), and finally dried again at ambient temperature.

Spectra were acquired with an Ultraflex I instrument in the linear positive mode in the mass range of 2,000 to 20,000 Da. The instrument was calibrated in the mass range between 3,637.8 and 16,952.3 Da using the Bacterial Test Standard (BTS) calibrant for *in vitro* diagnostic use (Bruker Daltonik, Bremen, Germany).

To generate the reference spectra (main spectra projections, MSP) required for the database, each sample was spotted onto six target spots of a polished steel MALDI target plate. MSP were generated using the MALDI Biotyper software version 2.0 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) following the guidelines of the manufacturer. Four single mass spectra with 500 shots each were acquired from each spot and a MSP spectrum was calculated from the 24 single spectra. The number of peaks was limited to 100 per reference spectrum and all peaks of a reference spectrum were normalized to the most intense peak with an intensity of 1.0. The minimum frequency of occurrence within the 24 single spectra was set to 50% for every mass. Hence, a list of the most significant and reproducible peaks typically found in the analyzed spectra of a specific bacterial strain was created. At least 20 out of the 24 spectra generated were selected to calculate a reference spectrum. The reference spectra contain averaged masses, averaged intensities, and relative abundances for the characteristic peaks. The peak threshold was set to a minimum of 1% of the most intense peak. The final output of an identification by the MALDI Biotyper is a score value between 0 (no similarity of probe and reference) and 3 (identity between reference and probe). According to the suggestions of the manufacturer, scores ≥ 2 indicate species identification, score values ≥ 1.7 and < 2 indicate genus identification, and scores < 1.7 indicate no reliable identification. Top hits in the ranking of possible identifications based on this score were regarded as valid diagnosis, unless visual inspection of the spectra suggested a different species.

RESULTS AND CONCLUSION - In a ring trial, identification of biological agents was reliable for *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella* spp. and *Yersinia pestis* in our laboratory. However, in our previous studies, misidentifications occurred between *B. abortus* and *B. melitensis*, *B.*

ceti was taken for *B. pinnipedialis*, and in another one for *B. suis*. *B. ovis* was misidentified as *B. canis*. *B. suis* was misidentified as *B. canis*, *B. abortus,* and *B. melitensis*. On the other hand, some biovars of *B. suis* (bv 1 and bv 2) could be reliably identified. Nevertheless, for routine purposes, we used MALDI-TOF MS only to confirm *Brucella* spp. on the genus level. Discrimination between *B. mallei* and *B. pseudomallei* required careful selection of appropriate reference spectra and is frequently difficult when applied in routine diagnostics for the OIE and National Reference Laboratory for Glanders. MALDI-TOF analysis was useful to rapidly identify *Francisella* to the subspecies level.

In the last decade, MALDI-TOF MS has emerged as a powerful tool for bacterial identification, because it is a rapid, precise, and cost-effective method when compared with conventional phenotyping techniques. MALDI-TOF MS identifies microorganisms from colonies grown on solid media within a few hours including sample preparation. The standard sample preparation protocol includes an inactivation step, which minimizes handling of the living organisms and thus reduces the risk of laboratory infections. Biological agents are relatively rare zoonotic pathogens in Europe, but intentional release could have a major impact on human and animal health. In this study, we summarize previous work and provide data on the experience we have made applying MALDI-TOF MS in routine work and a ring trial.

In our laboratory, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica,* which is the only subspecies prevalent in central Europe, was reliably identified and results for other subspecies were correct in a ring trial. This is in line with previous studies [Müller *et al*., 2013, Seibold *et al*., 2007]. *Brucella* spp. can be challenging for MALDI-TOF MS and we prefer to confirm only the genus level. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* are very closely related and it is safe to identify them as *Burkholderia mallei/ Burkholderia pseudomallei* complex.

Yersinia pestis can be misidentified as *Yersinia pseudotuberculosis*, because only a single, but prominent mass peak at 3065 Da is characteristic for *Yersinia pestis* [Lasch *et al.,* 2010]. Therefore, visual inspection of the spectra is crucial, when there is a clinical suspicion of plague.

Bacillus anthracis was tested only in a ring trial, because real-time PCR assays can be performed even under BSL-3 conditions and are a rapid alternative to the more tedious protocols for the preparation of spore forming bacteria required for MALDI-TOF MS analysis [Lasch *et al.,* 2008]. It was possible to diagnose all the above-mentioned bacterial biological agents to a level that allows making a decision on therapeutic measures.

However, cultivation time and conditions need to be controlled to achieve correct assignments and visual inspection of spectra can be useful. Sample preparation and handling can have a relevant influence on the quality of spectra, therefore continuity and good training of the personnel is essential.

Further differentiation of (sub-)species and biovars has shown to be feasible in some cases but generally will require molecularbiological tools such as real-time PCR assays, multi-locus sequence typing, or whole genome sequencing.

References

Karger A, Stock R, Ziller M, Elschner MC, Bettin B, Melzer F, Maier T, Kostrzewa M, Scholz HC, Neubauer H, Tomaso H (2012), Rapid identification of Burkholderia mallei and burkholderia pseudomallei by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric typing. BMC Microbiol 12:229.

Karger A, Melzer F, Timke M, Bettin B, Kostrzewa M, Nöckler K, Hohmann A, Tomaso H, Neubauer H, Al Dahouk S (2013), Interlaboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of Brucella spp. J Clin Microbiol 51(9):3123-6.

Lasch P, Nattermann H, Erhard M, Stammler M, Grunow R, Bannert N, Appel B, Naumann D (2008) MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. Anal Chem 80(6):2026-2034.

Lasch P, Drevinek M, Nattermann H, Grunow R, Stämmler M, Dieckmann R, Schwecke T, Naumann D (2010) Characterization of yersinia using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. Anal Chem 82(20):8464-75.

Müller W, Hotzel H, Otto P, Karger A, Bettin B, Bocklisch H, Braune S, Eskens U, Hörmansdorfer S, Konrad R, Nesseler A, Peters M, Runge M, Schmoock G, Schwarz BA, Sting R, Myrtennäs K, Karlsson E, Forsman M, Tomaso H (2013), German Francisella tularensis isolates from european brown hares (Lepus europaeus) reveal genetic and phenotypic diversity. BMC Microbiol 13:61.

Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM (2002), Public health assessment of potential biological terrorism agents. Emerg Infect Dis 8(2):225-30.

Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K (2008), Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoSONE 3(7):e2843.

MLST e MLVA-16 come strumenti di epidemiologia molecolare per la brucellosi in Italia

M. ANCORA, G. GAROFOLO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise - Centro di Referenza Nazionale e OIE per le Brucellosi

INTRODUZIONE - La brucellosi fu descritta per la prima nel 1884 nell'isola di Malta come l'agente eziologico della "febbre di Malta" (Nicoletti, 1980). Sebbene la malattia sia stata eradicata in molti paesi occidentali, la brucellosi è ancora endemica nel bacino del Mediterraneo ed in altre aree del mondo (Pappas *et al., 2006*) rappresentando una costante minaccia di reintroduzione anche in regioni riconosciute ufficialmente indenni da brucellosi, con il rischio di causare notevoli perdite economiche a causa di aborto e infertilità del bestiame. La brucellosi è una malattia negletta e oggi può essere considerata tale anche in Europa per le fasce di povertà (Hotez *et al., 2011*) determinate dal nuovo contesto socio economico. Queste aree potrebbero vedere una recrudescenza della malattia tale da far riconoscere la stessa come problema ri-emergente.

La malattia può essere trasmessa all'uomo per contatto diretto con animali infetti o indirettamente mediante il consumo di prodotti lattiero-caseari contaminati. L'agente eziologico della brucellosi è un batterio intracellulare Gram negativo, immobile, aerobio ed asporigeno appartenente al genere *Brucella* nel quale sono attualmente incluse dieci specie. La maggior parte di queste, predilige un ospite animale serbatoio indispensabile per la sua sopravvivenza in natura. La brucellosi bovina è in genere causata da *Brucella abortus*, mentre la brucellosi ovicaprina è causata da *Brucella melitensis*. Queste due specie sono altamente contagiose per gli esseri umani rendendosi responsabili della zoonosi più diffusa nel mondo (Pappas, 2010). Il controllo della brucellosi umana è subordinato al controllo della malattia negli animali e avere la possibilità di una corretta caratterizzazione di un ceppo isolato in un'area geografica rappresenta un importante strumento epidemiologico.

La caratterizzazione fenotipica degli isolati è scarsamente risolutiva per tali scopi e nel contempo la scarsa variabilità genetica (similitudine DNA > 90%) è stata a lungo un problema nello sviluppo di strumenti molecolari.

Negli ultimi anni il metodo di analisi Multi locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis di 16 loci (MLVA-16) (Le Flèche *et al*., 2006) si è imposto come utile strumento di discriminazione di ceppi *Brucella* grazie all'utilizzo di marcatori capaci di individuare mutazioni presenti nell'intero genoma e in grado di fornire informazioni utili ad approcci epidemiologici locali.

Lo sviluppo di un sistema di analisi MLVA-16 ad alta processività affiancato con un'analisi Multi Locus Sequence Typing (MLST) permette di avere dati qualitativamente superiori. Queste informazioni permettono di seguire l'andamento della malattia sul territorio e di valutarne l'origine dei singoli focolai, come anche le vie ed i tempi d'introduzione di ceppi esotici.

MATERIALI E METODI - Lo schema MLVA-16 è stato rimodulato per permettere la corsa dei frammenti con elettroforesi capillare a fluorescenza aumentandone notevolmente la processività di analisi (Garofolo *et al*., 2013). La progettazione di PCR multiplex ha reso necessario ridisegnare i primers per i markers bruce04, bruce16, bruce21 e bruce06 al fine di evitare qualsiasi sovrapposizione di frammenti VNTR amplificati. I nuovi frammenti tandem repeat (TR) sono stati controllati mediante il programma online Tandem Repeat Finder 4,04 (http://tandem.bu.edu/trf/trf.submit.options. Primers html) per valutare la congruenza con i vecchi frammenti TR di genoma di *Brucella melitensis* 16M. I primers sono stati disegnati nelle nuove flanking regions di DNA satellite mediante il software Primer3plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/ primer3plus/primer3plus.cgi/primer3manager.cgi).

Tutti i primers del pannello dei marcatori a 16 loci per la PCR-MLVA sono stati utilizzati in quattro reazioni PCR multiplex in un volume finale di 10 l. Per ridurre gli artefatti, sono state eseguite due multiplex con lo stesso profilo termico per 24 cicli di amplificazione. I prodotti amplificati sono analizzati con il marker LIZ 1200 su 3 corse in elettroforesi capillare mediante Abi Prism 3500 Genetic Analyzerand POP-7 (Applied Biosystems Inc.). Le dimensioni dei frammenti VNTR sono state calcolate mediante GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems Inc.). I profili allelici sono stati confermati mediante sequenza diretta di ogni allele.

Lo schema MLST è stato rimodulato modificando lo schema originario proposto da Whatmore *et al.* (Whatmore *et al*., 2007) L'assegnazione allelica è avvenuta in accordo con il database proposto tramite ricerca dell'identità nucleotidica tramite l'algoritmo Blast su GeneBank.

RISULTATI - L'analisi MLST ha permesso di individuare 8 sequence type (St) rappresentativi di 8 diversi genotipi e tra questi, il St1 e St2 per *Brucella abortus* e il St11 per *Brucella melitensis* sono riconducibili a cloni dominanti (Fig. 1).

L'esame MLVA-16 loci integrano i dati ottenuti dall'amplificazione del DNA minisatellite (ripetizione di unità da 12bp a 134bp) e DNA microsatellite dotati di un maggiore potere discriminante (< 8 bp).

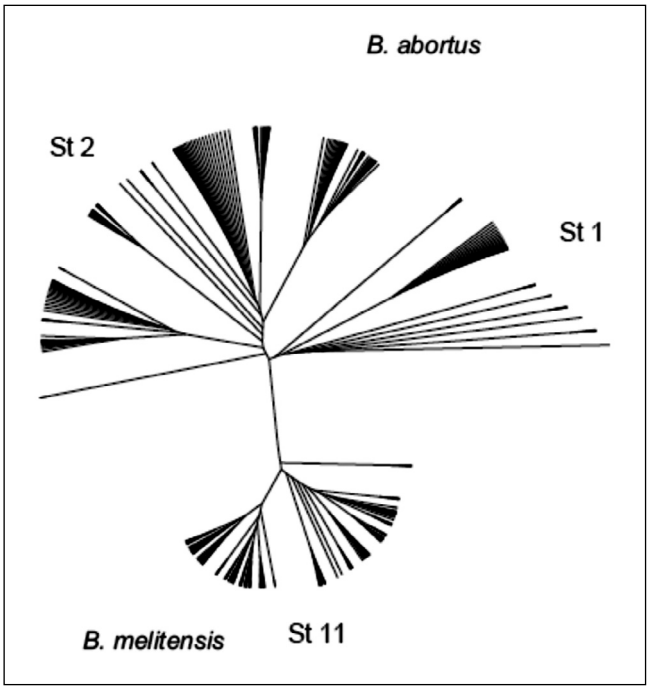


Figura 1 - Cladogramma MLVA16 per *B. abortus* e *B. melitensis*.

L'analisi è stata condotta con il metodo statistico NJ (Neighbor Joining) con bootstrap (n° repliche 1000) consentendo di raggruppare i ceppi in più di 100 differenti genotipi.

DISCUSSIONE - Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi lavori inerenti la caratterizzazione molecolare di *Brucella* mediante MLVA-16 loci e MLST. Le analisi dei profili di banda possono essere risolti con tre metodi comunemente utilizzati per il dimensionamento dei prodotti amplificati VNTR: elettroforesi su gel di agarosio, tecnologia microfluidica e il sequenziamento del DNA.

La maggior parte dei protocolli pubblicati utilizza PCR singleplex o multiplex limitate in quanto le sovrapposizione dei profili di banda derivanti da loci diversi possono rendere difficile l'interpretazione dei risultati.

Nel presente studio è stato utilizzato un nuovo protocollo che prevede l'amplificazione dell'intero pannello MLVA-16 in quattro multiplex affiancato, per l'analisi dei risultati, da un affidabile sistema multicolor capillary electrophoresis a tutto vantaggio di un sostanziale aumento della processività dei campioni.

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale" di Teramo in quanto centro di referenza nazionale e Laboratorio di riferimento OIE per le brucellosi deve far fronte, annualmente, a circa 1000 ceppi da tipizzare provenienti da tutta Italia. Questo è uno dei motivi cogenti che spingono a sviluppare nuovi processi di analisi molecolare ad alto rendimento che abbiano nel contempo la capacità di un elevato potere di risoluzione. Le informazioni derivate si integrano con le informazioni del vecchio pannello MLVA-16 contribuendo ad arricchire i dati presenti nel database on-line (http://mlva.u-psud.fr/brucella/) e promuovendo la condivisione con altri laboratori nel mondo.

L'analisi dei dati derivanti da diversi focolai registrati in Italia mediante MLST e MLVA-16 loci ha reso possibile individuare vari genotipi presenti in Italia. È da mettere in evidenza l'individuazione, per la maggior parte dei genotipi, di un unico complesso clonale identificato dal St2, in particolare, per *Brucella abortus* (89%) distribuito sull'intero territorio nazionale. Diversamente i genotipi di *Brucella melitensis* hanno evidenziato un maggior rapporto di cluster MLVA16 legati al territorio, in particolare in Sicilia. Queste informazioni risultano preziose per valutare correlazioni tra ceppi *Brucella* isolati in diverse zone e saranno utili per eseguire il traceback fino all'origine dell'infezione in corso di focolai.

In conclusione poiché la prevalenza di brucellosi in serbatoi animali è la chiave per il suo controllo negli esseri umani, la conoscenza dei genotipi *Brucella* spp. presenti in un territorio, rappresenterà un importante strumento epidemiologico per la formulazione di politiche e strategie per il controllo della brucellosi nelle popolazioni animali.

MLST and MLVA-16 as molecular epidemiological tools for brucellosis in Italy

Key words: MLST, MLVA-16, *Brucella abortus, Brucella melitensis.*

Bibliografia

Garofolo, G., Ancora, M., Di Giannatale, E., (2013). MLVA-16 loci panel on Brucella spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. J. Microbiol. Meth. 92, 103-107.

Hotez, P.J., Gurwith, M., (2011). Europe's neglected infections of poverty. Int. J. Infect. Dis. 15, e611-619.

Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., Nöckler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L.A., Vergnaud, G., (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. BMC Microbiol. 6, 9.

Nicoletti, P., (1980). The epidemiology of bovine brucellosis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 24, 69-98.

Pappas, G., (2010). The changing Brucella ecology: novel reservoirs, new threats. Int. J. Antimicrob. Ag. 36 (Suppl 1), S8-11.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V., (2006). The new global map of human brucellosis. Lancet Infect. Dis. 6, 91-99.

Whatmore, A.M., Perrett, L.L. & MacMillan, A.P. (2007). Characterisation of the genetic diversity of Brucella by multilocus sequencing. BMC Microbiol 7, 34.

Genomic and immunoproteomic approaches for the studies of vector-borne pathogens

D. SASSERA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Pavia

Key words: genomics, proteomics, disease vectors.

In the last ten years the advent of next-generation sequencing revolutionized many aspects of biological and medical research. Thanks to the development of various novel high-throughput sequencing technologies, starting from 454 pyrosequencing in 2005 (Margulies et al., 2005), the productivity of DNA sequencing has skyrocketed. Coupled with an equally important reduction of the sequencing costs, this has led to the production of huge amounts of novel data, primarily in the field of human genetics, but quickly followed by studies focused on other biological systems, from bacteria to animals. The most widely used next-generation technology at the moment is represented by the Illumina sequencing by synthesis (Bentley et al., 2008), which currently presents the best combination of cost, productivity, sequence quality, and versatility in terms of number of sequencing reads per sample. Other technologies currently on the market include ABI SOliD (Valouev et al., 2008) and Ion Torrent (Rothberg et al., 2011), which can both be useful for specific research needs. Novel, futuristic methods are being developed constantly, such as Pacific Bio Single-molecule real-time sequencing, capable of sequencing reads of unprecedented length, up to 30,000 nucleotides (Eid et al., 2009). The impact of such progress has yet to be fully elucidated, but it can be easily imagined if we consider that the most recent Illumina machines can only obtain reads up to 300 nucleotides long. The advances brought by next-generation sequencing technologies are not confined to the field of genomics, but they can be used in transcriptomic studies as well, allowing to sequence the entirety of the transcripts from multiple biological samples, for single or comparative studies. Another example of application of the power of next-generation sequencing is Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq) that allows to analyze DNA-protein interactions by preceding the sequencing by a step of enrichment of DNA sequences bound to specific proteins (Johnson et al., 2007).

In parallel to the development of genomic technologies, proteomic methods have been advancing as well. Two-dimensional difference gel electrophoresis (2D DIGE) for example has allowed to introduce a highly accurate quantitative dimension to the classical two-dimensional gel electrophoresis studies (Unlü et al., 1997). The principle at the basis of the 2D DIGE is the labeling of multiple samples loaded on the same gel with different fluorescent dyes that can be easily detected and distinguished.

Shotgun proteomics is another set of techniques that is providing an important advancement to the characterization of proteins. In this kind of approach, complex protein mixtures are subjected to proteolysis and then directly subjected to a liquid chromatography followed by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis for peptide sequencing, and thus for protein identification, through comparison with appropriate data-bases. Finally, immunoproteomic studies focus on detecting proteins with antigenic activity, usually using an integrated 2D – immunoblot approach, that allows for the separation of the proteins in a sample, followed by immunoblotting to find antigens, and subsequent identification of the antigenic spots by mass spectrometry.

It is important to note that the technological progress in the fields of genomics and proteomics can work in synergy to allow the researchers to obtain even more groundbreaking results. Data generated from next-generation sequencing for example can be used as novel and more detailed databases for protein identification, allowing better discrimination and recognition of the peptides sequenced by mass spectrometry. Proteomic and transcriptomic data can be analyzed in parallel and compared, to investigate specific biological systems from various angles.

Among the fields investigated with the most advanced genomic and proteomic techniques, an important role is played by the study of disease vectors and of the pathogens they carry. These diseases, transmitted by a number of different vectors, mostly arthropods, are in fact an issue of great medical and veterinary importance, as they cause million of human deaths every year and extremely important economic losses in animal breeding. The sequencing of the genomes of the pathogens and of their respective vectors allows to shed light on the biology of these organisms, possibly identifying targets for pharmacological and/or integrated control strategy. Transcriptomic and proteomic studies can detect variations in protein expression, with potentially great practical implications. An important example of this field of research is the study of the sialome (i.e. the set of proteins expressed in the salivary glands) that can allow to understand specific mechanisms of interactions between the host, the vector and the pathogen. Immunoproteomics can be a perfect tool to detect and identify proteins, from the vector and from the pathogen, that play a role in eliciting the immune response in the host (i.e. antigens).

The identification of antigenic proteins can have a number of important applications, such as the development of serological tools for the screening of humans and animals potentially exposed to the vectors, thus markers for the bite of the vector, as well as for the development of vaccines.

References

Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., et al. (2005), Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 15 (7057):376-380.

Bentley D.R., Balasubramanian S., Swerdlow H.P., Smith G.P., et al. (2008), Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 6 (7218):53-59.

Valouev A., Ichikawa J., Tonthat T., Stuart J., et al. (2008), A high-resolution, nucleosome position map of C. elegans reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. Genome Res 18 (7):1051-1063.

Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M., Schultz J., et al. (2011), An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 20 (7356):348-352.

Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., et al. (2009), Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. Science 323 (5910):133-138

Johnson D.S., Mortazavi A., Myers R.M., Wold B. (2007), Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. Science 316 (5830): 1497-1502

Unlü M., Morgan M.E., Minden J.S. (1997), Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis 18 (11):2071-2077.

TAVOLA ROTONDA

Malattie infettive e parassitarie e il paradigma della One Health

Paratubercolosi: un problema di sanità pubblica?

C. GARBARINO[1], G. CAMMI[1], M. RICCHI[1], R. SAVI[1], S. PONGOLINI[2], N. ARRIGONI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Centro di referenza Nazionale per la Paratubercolosi, Sezione di Piacenza
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Parma

Parole chiave: paratubercolosi, Sanità pubblica.

INTRODUZIONE - *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* è l'agente eziologico della paratubercolosi, una enterite cronica che colpisce tutti i ruminanti, in particolare bovini e ovicaprini. Il coinvolgimento di MAP nell'eziopatologia di alcune malattie dell'uomo è stato ipotizzato da molto tempo. La prima patologia umana associata a MAP è stata la malattia di Crohn, ma più recentemente ne è stato ipotizzato un ruolo nel diabete tipo I, nella sclerosi multipla e nella tiroidite di Hashimoto (Masala et al. 2014).

In campo zootecnico, numerose indagini su vasta scala condotte in vari Paesi europei indicano che la Paratubercolosi è oggi diffusa in tutto il mondo, con dati di prevalenza apparente di allevamenti infetti variabile fra il 7 e il 60% (Nielsen et al. 2009). In Italia i dati di prevalenza apparente di allevamenti bovini infetti variano dal 40 al 60%. Sebbene non ci siano indagini su vasta scala sulla diffusione della patologia negli ovi-caprini, è presumibile che, analogamente a quanto segnalato per il resto del territorio europeo dove la prevalenza di allevamenti infetti risulta superiore al 20% (Nielsen et al 2009), la diffusione dell'infezione nel nostro paese sia elevata, anche se spesso sottovalutata, perché difficilmente riconosciuta e diagnosticata dagli allevatori e dai veterinari aziendali.

Un particolare motivo di preoccupazione per la filiera lattiero casearia è rappresentato dal fatto che alcuni Paesi terzi (India, Cina, Russia) richiedono all'Italia garanzie sanitarie specifiche nei confronti di questa patologia, relativamente ai prodotti esportati. Tra i prodotti italiani più esportati figurano sia prodotti di origine bovina (Grana Padano, Parmigiano Reggiano, gorgonzola, mozzarella) e/o bufalina, ma anche formaggi a latte ovi-caprino, come il pecorino (fonte ISTAT).

Scopo del presente lavoro è fare il punto sulle conoscenze relative al potenziale ruolo zoonotico di MAP, sui dati relativi alla presenza di MAP nella catena alimentare e sull'efficacia dei diversi processi tecnologici per la sua inattivazione.

MAP E PATOLOGIA NELL'UOMO - Paratubercolosi e malattia di Crohn - La malattia di Crohn (CD, Crohn's Disease) è una malattia infiammatoria cronica sistemica dell'uomo, caratterizzata generalmente da lesioni intestinali di tipo granulomatoso; colpisce l'intestino a tratti ben delimitati, soprattutto a livello dell'ileo e del colon.

I sintomi caratteristici della CD sono malessere generale, dolori addominali, cronica perdita di peso, diarrea.

Una possibile associazione tra la CD e Paratubercolosi fu per la prima volta ipotizzata nel 1913. L'ipotesi di un coinvolgimento di MAP riprese poi forza a seguito dell'isolamento di MAP dall'intestino di malati di CD. Da allora si è molto dibattuto riguardo l'eziologia della CD, per giungere all'ipotesi oggi più condivisa di una possibile eziologia multifattoriale, con la compartecipazione dei seguenti fattori come responsabili di flogosi cronica della mucosa (1):

(i) *barriera mucosale alterata*, che permette l'assorbimento di macromolecole di origine batterica, alimentare e altre molecole immunogene;
(ii) *alterazioni della flora microbica intestinale*, con squilibrio tra batteri intestinali "protettivi" e "patogeni" (disbiosi);
(iii) *infezione persistente* da parte di un agente batterico non ancora identificato (MAP, *E.coli*, forme L);
(iv) *predisposizione genetica*. A riguardo, nel 2001, tre gruppi di ricerca giunsero contemporaneamente alla scoperta che una mutazione di un gene presente sul cromosoma 16, conosciuto come CARD15, è associata alla CD, ma non alla Colite Ulcerosa (UC), una patologia inclusa nelle Malattie Infiammatorie Intestinali (IBD, Inflammatory Bowel Disease) insieme alla CD, che si differenzia da quest'ultima per l'assenza di lesioni granulomatose. Tuttavia, la proporzione di casi di CD che può essere spiegata da questa predisposizione genetica è il 15-30%, numeri che lasciano spazio anche ad altre teorie ezio-patogenetiche, con l'ipotizzato coinvolgimento di fattori ambientali. In quest'ottica MAP potrebbe essere il fattore scatenante la patologia in una sottopopolazione geneticamente predisposta.

Mentre fino alla fine degli anni '90 gli studi pubblicati in cui si dimostrava una maggiore presenza di MAP in pazienti affetti da CD erano circa equivalenti a quelli in cui la relazione non era evidente, la maggior parte degli studi pubblicati dal 2000 in poi, grazie ad un sensibile avanzamento delle metodiche diagnostiche utilizzate (coltura su terreni liquidi, PCR, ibridazione in situ con sonde), hanno dimostrato, in generale, una maggior presenza di MAP nei pazienti affetti da CD rispetto ai controlli. Sottolineiamo come tale associazione non autorizzi a stabilire un nesso di causalità tra MAP e CD; infatti, dato che MAP è ampiamente diffuso nell'ambiente, l'aumento della probabilità di isolamento in pazienti affetti da CD potrebbe essere dovuto anche a colonizzazione opportunistica dell'intestino dei pazienti.

Paratubercolosi ed altre patologie umane - La teoria che agenti batterici possano in qualche modo fungere da fattori scatenanti lo sviluppo di malattie autoimmuni in soggetti con particolari polimorfismi genetici è stata chiamata in causa per il Diabete mellito tipo 1, la sclerosi multipla e la tiroidite di Hashimoto (Cossu et al. 2014)).

Gli studi in cui sono state proposte queste relazioni patogenetiche ipotizzano che, attraverso un meccanismo di "mimetismo molecolare" (similitudine tra antigeni di MAP e antigeni dell'uomo), MAP sia in grado di indurre una risposta auto-immunitaria nei confronti di specifici antigeni.

Gli autori di questi studi hanno formulato la loro ipotesi sulla base di:

- evidenze epidemiologiche (elevata prevalenza di tali patologie nella popolazione sarda, fortemente esposta a MAP);
- omologia tra proteine di MAP e antigeni delle cellule beta del pancreas, delle cellule nervose e della tiroide;
- presenza di specifici polimorfismi genetici particolarmente rappresentati nella popolazione sarda.

Tali studi necessitano tuttavia di ulteriori conferme.

MAP COME CONTAMINANTE DELLA CATENA ALIMENTARE - I ruminanti, soprattutto il bovino, ma anche gli ovi-caprini, rappresentano la causa della contaminazione della catena alimentare, direttamente dei prodotti di origine animale, come latte e carni, ed indirettamente, tramite la contaminazione fecale delle acque.

Latte e derivati - La presenza di MAP è stata dimostrata nel latte sia di animali con infezione subclinica che con malattia clinicamente manifesta (Gill et al 2011).
Tale contaminazione può avere sia origine endogena, attraverso l'escrezione con il latte di macrofagi infetti di derivazione ematica, che esogena, dovuta a contaminazione fecale durante le fasi di mungitura.
La contaminazione endogena è conseguente al fatto che la paratubercolosi, in particolare nelle fasi terminali, è una malattia sistemica, e di conseguenza la probabilità che l'animale infetto produca latte contaminato è maggiore se l'animale si trova in fase avanzata di infezione. Secondo uno studio di Weber et al. (Weber et al 2008), la contaminazione endogena del latte è generalmente molto limitata negli animali con infezione subclinica, anche se in fase avanzata (10^2 /litro), mentre può raggiungere livelli più elevati negli animali con forma clinica (10^4 /litro).
La contaminazione esogena avviene con maggiore probabilità se le condizioni igienico-sanitarie di allevamento e di mungitura sono scadenti ed, in presenza di una elevata biocontaminazione ambientale, può essere indipendente dallo stadio di infezione dell'animale. L'apporto alla contaminazione esogena del latte, sia degli animali con infezione clinica che con infezione subclinica avanzata ("High Shedder"), può essere significativo, dato che le loro feci contengono elevate quantità di MAP (rispettivamente 10^9 /g e 10^7 /g).
Relativamente alla contaminazione del latte alla stalla, una metanalisi della letteratura (Okura H., et al. 2012) riporta percentuali di campioni di latte di massa positivi variabili da 0% a 71%, in funzione delle metodiche utilizzate nei vari studi (coltura e PCR, differenti target PCR: F57 vs. IS900) e delle popolazioni campionate. Il dato medio di prevalenza apparente stimata è 10% (4-20%, IC95%).
La quasi totalità degli studi non riporta dati quantitativi di contaminazione; solamente tre studi riportano una stima di contaminazione del latte di massa, effettuata mediante qPCR, generalmente inferiore a 100 ufc/ml di latte.
Il risanamento del latte mediante pastorizzazione HTST (72 °C per 15 sec), alla combinazione tempo/temperatura standardizzata per risanare il latte da *M.bovis* e *Coxiella burnetii*, ha dimostrato non essere sempre efficace nei confronti di MAP.
A seguito di ciò, sono stati realizzati diversi studi per trovare una combinazione efficace per la completa inattivazione di MAP, variando sia i tempi che le temperature di pastorizzazione. Da tali studi è emerso che la pastorizzazione HTST è in grado di ridurre la concentrazione di MAP di 4-7 $\log_{10}$ (Gill et al. 2011).
Le differenze registrate nelle condizioni di inattivazione nei vari studi potrebbero essere legati a diverse caratteristiche di termoresistenza dei ceppi utilizzati o a differenti condizioni sperimentali.
Una spiegazione della notevole termoresistenza di MAP potrebbe risiedere nella sua tendenza a formare aggregati (*clumps*) all'interno della stessa Unità Formante Colonia, rappresentata da un aggregato che raggruppa fino a 10.000 cellule. Una percentuale di esse potrebbe rimanere vitale dopo il trattamento termico, dando origine ad una "coda" di cellule apparentemente termoresistenti.
A testimonianza dell'importanza del *clumping* nella resistenza alla pastorizzazione (Gill et al. 2011), è stato dimostrato che il trattamento di omogeneizzazione aumenta l'efficacia della pastorizzazione, purché sia applicato contestualmente ad essa. Già dopo 5 minuti dall'omogeneizzazione infatti, gli aggregati di MAP tendono a riformarsi.
Un'altra ipotesi per giustificare la termoresistenza di MAP è che quest'ultimo possa subire, a seguito del riscaldamento fino a temperature di 100 °C per 10 minuti, un fenomeno di "termoattivazione", in grado di renderlo rilevabile più precocemente in coltura oppure che esso sia in grado di generare forme di resistenza con caratteristiche simili a quelle delle spore.
Data l'efficacia del trattamento di pastorizzazione HTST nel ridurre la concentrazione di MAP di 4 - 7 $\log_{10}$ e dati i livelli medi di contaminazione del latte di massa, la sopravvivenza di MAP a seguito della pastorizzazione viene considerata poco probabile. Tuttavia, non si può escludere che, in condizioni di elevata contaminazione iniziale o di trattamenti termici inferiori alle condizioni previste, questo possa avvenire; la letteratura riporta casi di sopravvivenza di MAP nel latte pastorizzato del commercio, seppure in percentuali limitate di campioni (da 1,8% a 2,8%), come riportato da Gill et al., 2011 (Gill et al. 2011).
È stata testata su MAP l'efficacia di due tecnologie applicate di routine al latte per ridurre il numero dei clostridi e della carica batterica: la centrifugazione (bactofugazione) e la microfiltrazione (Gill et al. 2011).
Centrifugando il latte a 6000g, dopo averlo riscaldato a 60 °C, si ottiene una riduzione media di 3,05-3,56 Log_{10} ufc MAP (99,82-99,95%); lo stesso trattamento termico preceduto da declumping porta una riduzione media di 3,33-3,98 Log_{10} ufc MAP (99,92-99,98%). È stato ipotizzato che la maggiore efficacia del trattamento dopo declumping sia legata alla tendenza degli aggregati ad inglobare aria rispetto alle cellule singole che sedimenterebbero più efficacemente.
Applicando, in condizioni sperimentali, il trattamento della microfiltrazione, attraverso filtri con porosità di 1,2 mm, si è ottenuta una riduzione media pari a 1,3-3,4 Log_{10} ufc MAP (94,6-99,9%).
Data la sua capacità di sopravvivere alla pastorizzazione, MAP può essere rinvenuto in formaggi a base di latte pastorizzato ed, a maggior ragione, nei formaggi a base di latte crudo e termizzato.
Gli studi relativi alla presenza di MAP in formaggio Feta prodotto con latte ovi-caprino riportano il 50% di positività in PCR-IS900 ed il 5% in coltura.
Un'indagine condotta a Cipro ha riscontrato il 25% di positività in PCR, su campioni di formaggio a latte misto (bovino, pecora e capra), ma nessun isolamento. Altre indagini condotte su formaggi a latte bovino in Repubblica Ceca e in Svizzera riportano percentuali di positività in PCR rispettivamente del 12% e del 4%, in nessun caso seguiti da isolamento. Nel Regno Unito un'indagine su 28 campioni, comprendenti formaggi prodotti da latte pastorizzato e da latte crudo, vaccino e/o ovino, ha rilevato una positività in coltura del 25% (Gill et al. 2011).
Da studi effettuati in condizioni sperimentali sui formaggi, il valore di D (tempo di riduzione decimale) è risultato (Gill et al 2011):

- Cheddar: 90-107 giorni;
- Queso fresco: 36.5-59,9 giorni;
- Swiss Tilsiter: 45,5 giorni;
- Swiss Emmentaler: 27,8 giorni.

È importante rilevare che MAP non si moltiplica all'esterno dell'ospite per le sue particolari esigenze di crescita, ma declina lentamente nel corso della stagionatura.
Uno studio riporta che, durante la lavorazione del Cheddar Cheese, MAP si concentra 10 volte nella cagliata e rimane coltivabile per 27 settimane di stagionatura (Gill et al 2011)
Il sale non sembra essere rilevante nel condizionarne la vitalità, mentre il basso pH contribuisce alla sua inattivazione, in particolare nei prodotti caseari a base di latte pastorizzato. I dati presenti in letteratura suggeriscono che la pastorizzazione, associata a 60 giorni di stagionatura, possano ridurre la concentrazione di MAP a livelli trascurabili nei prodotti lattiero-caseari (Gill et al 2011).
Nello yogurt, il valore di pH (4-4,5), generalmente efficace verso i comuni batteri patogeni alimentari, non è sufficiente ad inattivare MAP, che rimane vivo e vitale senza calo apprezzabile di concentrazione dopo conservazione a 6 °C per 6 settimane. Al contrario, nei prodotti fermentati (Kefir), l'azione sinergica di valori particolarmente bassi di pH (inferiori a 4) e dei prodotti metabolici (acido lattico, perossido di idrogeno, acido acetico e batteriocine) della microflora caratteristica induce una riduzione significativa della concentrazione di MAP (da 1.2 a ≥3,8 $\log_{10}$ ufc di MAP) (Van Brandt et al 2011).
A seguito di tali risultati, altri studi hanno confermato il differente effetto inibitorio, associato a diversi valori di pH, delle varie colture probiotiche.

In una indagine condotta su 51 campioni di latte in polvere per la prima infanzia appartenenti a 10 differenti marche, provenienti da 7 paesi europei, 25/51 (49%) sono risultati positivi a IS900-PCR. Gli stessi autori sottolineano come non sia da sottovalutare, oltre al pericolo per la salute pubblica legato alla contaminazione da MAP vivo e vitale negli alimenti, anche quello della presenza di proteine come la HSP65, proteina altamente conservata nei micobatteri, che hanno tutte le caratteristiche per fungere da fattori scatenanti patologie autoimmuni, in particolare se l'assunzione avviene nella primissima infanzia (Gill et al 2011).

Carni - Le carni, in particolare quelle di animali con forma clinicamente manifesta, sono state indicate come potenziale veicolo di infezione. Infatti, nelle forma cliniche, MAP tende a diffondere attraverso il ciclo ematico ed i vasi linfatici nei linfonodi, nei muscoli, ed in altre sedi, quali fegato, milza ed altri organi (Gill et al 2011). È stato dimostrato che l'isolamento dai muscoli scheletrici e dal diaframma di capi con infezione subclinica è possibile, anche se meno frequente rispetto ai capi con malattia clinicamente manifesta (Gill et al 2011). Sono stati realizzati diversi studi su carcasse al macello, volti a determinare la prevalenza d'infezione e di contaminazione delle carni, sebbene le indagini siano rese difficoltose dalle basse concentrazioni di MAP, spesso non rilevabili con metodiche microbiologiche e molecolari (PCR). In un recente studio del 2011 condotto in Danimarca, su 501 capi testati, solo 20 (4%) hanno mostrato una concentrazione di MAP maggiore di 10 ufc per grammo di carne in PCR, mentre solo da due vacche è stato possibile isolare il batterio (Okura et al 2011).

Indubbiamente le carni di vacche da latte a fine carriera, che possono trovarsi, a causa dell'età avanzata, nello stato tardivo di infezione, rappresentano la principale fonte di MAP per l'uomo attraverso le carni; le vacche da carne, che vengono macellate in età più precoce, dimostrano invece livelli di contaminazione inferiore (Gill et al 2011). In un'indagine eseguita su tre impianti di macellazione negli USA, MAP è stato rilevato nell'intestino (feci e linfonodi ileocecali) del 34% delle vacche da latte a fine carriera rispetto al 3% di quelle da carne, nel fegato e negli altri linfonodi dell'11,1% delle vacche da latte rispetto allo 0,7% di quelle da carne.

La carne macinata, generalmente prodotta da vacche da latte a fine carriera, rappresenta un potenziale veicolo di infezione; la macinatura delle carni potrebbe inoltre causare la disseminazione di MAP, localizzato all'interno dei linfonodi, in tutta la partita di carne.

Contaminando sperimentalmente la carne con ceppi di MAP di tipo C (Cattle=bovino) ed S (Sheep=ovino), a concentrazioni di 10^5 ufc/ml, è stato dimostrato che il ceppo S è meno termotollerante rispetto al ceppo C.

Gli stessi autori dimostrano una completa inattivazione alle seguenti combinazioni di tempo-temperatura:

- 55°C per almeno 90 minuti per entrambi i ceppi C e S;
- 60°C per almeno 35 minuti per entrambi i ceppi C e S;
- 65°C per 4-5 minuti per il ceppo S e almeno 7 minuti per il ceppo C;
- 70°C per 10-15 secondi per il ceppo S e 15-20 secondi per il ceppo C;
- 75°C per 5 secondi per entrambi i ceppi (C e S).

L'accurata cottura delle carni ad almeno 75 °C è in grado di inattivare MAP, anche se presente a concentrazioni elevate, mentre la cottura a 61 °C non si è rivelata completamente efficace; pertanto l'accurata cottura a cuore delle carni è raccomandata.

Acqua - L'acqua rappresenta un possibile ulteriore veicolo di diffusione di MAP e di potenziale contagio per l'uomo, come tale, come costituente di altre bevande, o contaminando la catena alimentare durante la preparazione e la manipolazione dei prodotti alimentari. I ruminanti possono eliminare un numero enorme di micobatteri con le feci, che possono rimanere nell'ambiente per lunghi periodi di tempo, fino a 55 settimane nelle feci al riparo dalla luce solare, contaminando le aree circostanti l'allevamento ed i campi dove vengono sparsi i liquami o pascolano gli animali. Il dilavamento da parte delle piogge delle aree contaminate può portare ad una contaminazione delle acque superficiali, che in alcuni casi costituiscono una fonte per l'approvvigionamento dell'acqua potabile.

Studi sul possibile ruolo dell'acqua nella diffusione dell'infezione dimostrano come MAP, al riparo dalla luce solare diretta, possa sopravvivere fino a 48 settimane nella colonna d'acqua, mentre la sopravvivenza nel sedimento si prolunga di ulteriori 12-26 settimane (Gill et al 2011).

Relativamente all'efficacia dei trattamenti di decontaminazione delle acque nei confronti di MAP, si è osservato che la clorazione è solo parzialmente efficace su MAP, determinandone una riduzione della concentrazione nell'ordine di 2 $\log_{10}$. La sopravvivenza di MAP nelle acque potrebbe essere facilitata dalla sua attitudine a localizzarsi all'interno dei biofilm che si formano nelle condutture, nonché della dimostrata persistenza (fino a 4 anni) e moltiplicazione all'interno di amebe (*Acanthameba polyphaga*), considerate ubiquitarie nelle acque (Gill et al 2011), acquisendo una maggiore resistenza ai trattamenti di clorazione rispetto alle cellule libere. In un lavoro condotto in Irlanda del Nord sulle acque all'ingresso di nove impianti di trattamento delle acque, mediante IMS-PCR e coltura, MAP è stato ritrovato nell'8% dei 192 campioni di acqua testati, inoltre, in almeno un'occasione nel corso dei 12 mesi di durata dello studio, 8 impianti su 9 sono risultati positivi.

In un recente studio effettuato in Lombardia (Pistone et al 2012) è stata rilevata la presenza di DNA di MAP, mediante PCR, in 3/90 campioni di acqua potabile di rubinetto in una provincia Lombarda. Nonostante l'isolamento di MAP dai campioni positivi non abbia avuto successo, tale dato sottolinea come l'ampia diffusione del micobatterio nella popolazione zootecnica possa causare una significativa contaminazione delle acque provenienti da depositi sotterranei, oltre che delle acque superficiali.

Infine è stato anche ipotizzato che MAP possa venire in contatto con l'uomo per inalazione, a seguito della formazione di aerosol di acque superficiali, secondo il percorso dei venti dominanti (Gill et al 2011).

CONCLUSIONI - In conclusione, non si può che auspicare un rapido chiarimento del ruolo di MAP nell'eziologia delle patologie dell'uomo in cui è stato chiamato in causa. A tale scopo saranno necessarie ulteriori ricerche finalizzate ad approfondire le basi genetiche della predisposizione dell'uomo alle patologie sopra citate ed a definire le eventuali differenze patogenetiche tra i ceppi di origine umana ed animale, verificando l'eventuale presenza di sottotipi di MAP e la loro circolazione nelle due popolazioni.

Dai dati disponibili, è evidente che la paratubercolosi è molto diffusa nei bovini e nei piccoli ruminanti e, data la non completa efficacia dei trattamenti tecnologici, l'esposizione della popolazione umana a MAP attraverso varie fonti alimentari (latte e derivati, carni e acqua) è provata.

In considerazione anche dell'ipotesi che antigeni di MAP non vitale possano rappresentare un rischio per il consumatore, l'unico punto critico veramente efficace per ridurre la contaminazione della catena alimentare consiste nel ridurre la prevalenza d'infezione negli allevamenti di animali di specie sensibili.

Le Autorità Sanitarie, si sono infatti, espresse, a titolo precauzionale, in favore dell'adozione di opportuni provvedimenti per ridurre la contaminazione della catena alimentare attraverso una riduzione della prevalenza d'infezione nel patrimonio zootecnico. Le richieste da parte di alcuni Paesi terzi (India, Cina, Russia) relativamente a prodotti lattiero caseari esportati, hanno reso ancora più urgente l'elaborazione di una proposta operativa d'intervento, per sensibilizzare gli allevatori all'adozione di misure atte a ridurre la diffusione della paratubercolosi sul territorio italiano. Queste motivazioni hanno portato alla pubblicazione in Gazzetta Ufficiale del 19.11.2013 delle *"Linee Guida per l'adozione dei piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della Paratubercolosi bovina"*. Tali misure, attualmente limita-

te alla specie bovina, saranno estese in futuro anche al settore ovi-caprino.
Sarà inoltre fondamentale approfondire gli studi relativi all'efficacia dei vari processi di trasformazione nel garantire l'inattivazione di MAP. Gli studi condotti sinora, rivolti prevalentemente a prodotti di origine bovina, hanno dimostrato che la probabilità di contaminazione del prodotto finito è funzione sia del livello di contaminazione iniziale della materia prima che della tecnologia produttiva. Sarà necessario ampliare tali indagini ai prodotti ovi-caprini, data l'importanza che questi rivestono nel comparto alimentare, sia per il consumo interno che per l'esportazione.

Paratuberculosis: a public health problem?

Bibliografia

Di seguito sono riportate solo le voci principali. Le altre fonti bibliografiche sono reperibili presso gli autori.

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): 52-93.

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.

Gill C.O., Saucier L., Meadus W.J. (2011), Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy products, meat, and drinking water. J Food Prot.; 74: 480-99.

Masala S., Cossu D., Palermo M., Sechi L.A. (2014): Recognition of Zinc transporter 8 and MAP3865c homologous epitopes by Hashimoto's thyroiditis subjects from Sardinia. A common target with type I diabetes? PLOS One, 9, s97621

Nielsen S.S., Toft N. (2009), A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. Preventive veterinary Medicine, 88: 1-14.

Okura H., Toft N., Pozzato N., Tondo A., Nielsen S.S. (2011), Apparent Prevalence of Beef Carcasses Contaminated with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Sampled from Danish Slaughter Cattle. Vet Med Int: 152687.

Okura H., Toft N., Nielsen S.S. (2012), Occurrence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk at dairy cattle farms: a systematic review and meta-analysis. Vet Microbiol 157:253-263.

Pistone D., Marone P., Pajoro M., Fabbi M., Vicari N., Daffara S., Dalla Valle C., Gabba S., Sassera D., Verri A., Montagna M., Epis S., Monti C., Strada E.G., Grazioli V., Arrigoni N., Giacosa A., Bandi C. (2012). Mycobacterium avium paratuberculosis in Italy: commensal or emerging human pathogen? Dig Liver Dis. 44:461-5.

Van Brandt L., Coudijzer K., Herman L., Michiels C., Hendrickx M., Vlaemynck G. (2011). Survival of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in yoghurt and in commercial fermented milk products containing probiotic cultures. J Appl Microbiol. 110:1252-61.

Weber M.F., Nielen M., Velthuis A.G., van Roermund H.J (2008). Milk quality assurance for paratuberculosis: simulation of within-herd infection dynamics and economics. Vet Res 39, 12.

Il viroma degli ovi-caprini: aspetti zoonosici

V. MARTELLA, N. DECARO, C. BUONAVOGLIA

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università Aldo Moro di Bari

Parole chiave: enterite, virus, ovini, caprini.

INTRODUZIONE - La diarrea degli agnelli e capretti è una patologia complessa, sovente di natura multifattoriale. Interazioni tra diversi fattori quali la suscettibilità degli animali, lo stato nutrizionale, fattori ambientali, la gestione dell'allevamento e i diversi patogeni spesso influenzano in modo sinergico la comparsa e l'evoluzione della patologia enterica. Le più comuni cause infettive di diarrea negli ovi-caprini durante il primo mese di vita sono *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium* sp. e rotavirus di gruppo A. Il ruolo dei virus come enteropatogeni nei piccoli ruminanti è poco noto e probabilmente sottostimato. Recenti progressi diagnostici e studi di metagenomica hanno fornito indizi per comprendere la diversità del viroma enterico dei piccoli ruminanti. Sulla base della letteratura esistente, viene riportato un update sui virus enterici degli ovi-caprini, associati o meno a segni clinici di tipo enterico.

ADENOVIRUS - Nei piccoli ruminanti gli adenovirus (AdV) sono stati associati a sintomi enterici e respiratori di diversa gravità, in un quadro definito anche come pneumo-enterite (Belak, 1990). Gli AdV (famiglia *Adenoviridae*) sono virus privi di envelope con un capside icosaedrico di 90-100 nm, ed un genoma a DNA bicatenario di 26-45Kbp). Gli AdV sono geneticamente ed antigenicamente molto eterogenei e sono stati identificati in moltissime specie animali incluso l'uomo (Harrach *et al*., 2011). Sono attualmente noti cinque generi, *Mastadenovirus, Aviadenovirus, Atadenovirus, Siadenovirus* e *Ichtadenovirus* (Harrach *et al*., 2011).

Sono noti sette distinti sierotipi AdV negli ovini e due negli ovicaprini, inclusi nel genere *Mastadenovirus* e *Atadenovirus* (Tab. 1). I diversi tipi AdV differiscono per le loro caratteristiche antigeniche

Tabella 1 - Overview dei virus identificati nel tratto enterico di piccolo ruminanti e riassunto schematico delle loro caratteristiche. Abbreviazioni: ND, non determinato. [a]Non classificati ufficialmente.

Genoma	Famiglia	Genere	Specie	Sintomienterici	Ruolo patogeno enterico	Malattia sistemica	Rischio e/o ruolo zoonosico
DNA virus							
dsDNA	Adenoviridae	Mastadenovirus	Ovine adenovirus A	Si	Si	Si	No
			Ovine adenovirus B	Si	Si	Si	No
			Ovine adenovirus C[a]	Si	Si	Si	No
			Caprine adenovirus A[a]	Si	Si	Si	No
		Atadenovirus	Ovine adenovirus D	Si	Si	Si	No
dsDNA	Herpesviridae	Simplexvirus	Caprine herpesvirus-1	Si	No	Si	No
RNA virus							
ssRNA+	Astroviridae	Mamastrovirus	Mamastrovirus -13	Si	ND	No	ND
			Mamastrovirus[a]	ND	ND	ND	ND
ssRNA+	Caliciviridae	Norovirus		ND	ND	ND	ND
ssRNA+	Picornaviridae	Enterovirus		ND	ND	ND	ND
		Kobuvirus		ND	ND	ND	ND
		Hungarovirus[a]		ND	ND	ND	ND
segmenteddsRNA	Rotaviridae	Rotavirus	Rotavirus A	Si	Si	No	Si
			Rotavirus B	Si	ND	No	ND
			Rotavirus C	ND	ND	No	ND
ssRNA-	Coronaviridae	Betacoronavirus	Betacoronavirus-1	Si	ND	ND	No
segmentedssRNA-	Bunyaviridae	Nairovirus	Nairobi sheep disease virus	Si	Si	Si	Si
		Phlebovirus	Rift Valley fever virus	Si	Si	Si	Si
		Orthobunyavirus	Schmallenberg virus	Si	No	Si	ND
ssRNA-	Paramyxoviridae	Morbillivirus	Peste des petits ruminants virus	Si	Si	Si	No

e biologiche (emoagglutinazione, coltivazione *in vitro*, virulenza) (Belak, 1990). Sebbene gli AdVs siano specie-specifici, virus simili agli AdV bovinitipo-2 e tipo-7 sono stati segnalati negli agnelli.
Indagini virologiche e sierologiche hanno mostrato che gli AdV sono comuni nei piccoli ruminanti (Belak, 1990). La prevalenza di anticorpi per i diversi tipi di AdV degli ovini è alta. Sono descritte infezioni asintomatiche o prolungate dopo la fase acuta. Il virus è eliminato con secrezioni nasali, feci e urine.
Gli agnelli con immunità materna bassa o del tutto assente sono più a rischio. La morbilità nell'allevamento è alta mentre la mortalità è influenzata da età, tipo e/o ceppo di AdV ed eventuali co-infezioni con altri patogeni (Belak, 1990).
L'infezione da AdV di solito si osserva in agnelli di 2-12 settimane di vita. Una settimana dopo l'infezione, la malattia esordisce con sintomi enterici che persistono per 1 settimana. Sintomi respiratori (starnuti, scolo nasale, congiuntivite, alterata respirazione) compaiono 2-3 giorni dopo la comparsa dei sintomi enterici. Si può inoltre osservare rialzo febbrile. I sintomi respiratori tendono a persistere, evolvendo verso una forma cronica. A volte si osservano solo sintomi respiratori, mentre in altri casi sono predominanti i sintomi enterici (Belak, 1990). È inoltre descritta mortalità neonatale da infezioni iper-acute. La patologia osservata nei caprini è simile, con forme enteriche e respiratorie. In una capra adulta è stata descritta encefalite da AdV (Lehmkuhl *et al.,* 2001).
La prevenzione si basa sull'adozione di adeguate misure d'igiene e di un corretta gestione aziendale. Vaccini bivalenti inattivati si sono dimostrati sicuri ed efficaci (Belak, 1990), sebbene non siano disponibili sul mercato.

ASTROVIRUS - Gli astrovirus (AstV) sono piccolo virus tondi e nudi con un RNA di 6-7 kb a polarità positiva poli-adenilato all'estremità 3' (Mendez and Arias, 2007). Gli AstV sono perlopiù associati ad infezioni enteriche in diverse specie di mammiferi, incluso l'uomo, ed in diverse specie aviari, sebbene sia stata descritta una localizzazione extra-intestinalein alcuni mammiferi e negli uccelli (Mendez and Arias, 2007) (Blomström et al., 2010).
Gli AstV sono stati identificati negli ovini negli anni 70 in Scozia (Snodgrass and Gray, 1977). Mediante osservazione al microscopio elettronico, si osservarono dei piccoli virioni tondeggianti con la tipica forma a stella nelle feci di agnelli di 4-6 settimane di età affetti da diarrea acuta. Mediante infezione sperimentale fu possibile riprodurre la forma enterica in agnelli gnotobioticidi 2-3 giorni di età infettati con il filtrato di feci di agnelli infetti naturalmente o sperimentalmente (Snodgrass e Gray, 1977). L'infezione di agnelli gnotobiotici determina diarrea di moderata entità dopo un periodo di incubazione di 48 ore. Gli AstV infettano solo cellule epiteliali mature e macrofagi sub-epiteliali del piccolo intestino, causando atrofia parziale dei villi. Gli enterociti infetti sono sostituti con cellule cuboidali a partire dalle cripte, e le lesioni gradualmente si risolvono dopo 5 giorni dall'infezione (Snodgrass *et al.,* 1979).
L'analisi strutturale ed il sequenziamento del genoma del ceppo prototipo AstV ovino hanno confermato che il virus appartiene al genere *Mamastrovirus,* famiglia *Astroviridae.* Studi successivi hanno rivelato che il virus è geneticamente poco correlato agli AstV bovini e che AstV geneticamente diversi possono infettare gli ovini (Reuter et al., 2012a).

CALICIVIRUS - I calicivirus (famiglia *Caliciviridae*) sono importanti patogeni umani ed animali. I calicivirus sono piccoli virus tondeggianti privi di envelope di circa 35 nm di diametro, con un RNA a polarità positivadi 7.4-8.3 kb. I calicivirus sono compresi nei generi *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus*, *Nebovirus.* Calicivirus non classificati sono stati identificati recentemente (Clarke et al., 2012). Nei bovini sono stati identificati calicivirus appartenenti a tre diversi generi di calicivirus, *Norovirus, Vesivirus*e *Nebovirus*. I norovirus e nebovirus sono stati associati asegni clinici leggeri o moderati e l'infezione e la patologia enterica sono state riprodotte in vitelli gnotobiotici infettati sperimentalmente (Jung et al., 2014). Inoltre, vitelli gnotobiotici possono essere infettati sperimentalmente con un ceppo norovirus umano (Souza et al., 2008).
Negli ovini, sono riportati dati sierologici in merito alla presenza dei vesivirus, sebbene manchino riscontri diretti. All'opposto, l'infezione da norovirus è stata documentata in modo certo in uno studio in Nuova Zelanda (Wolf et al., 2009). L'RNA dei norovirus è stato identificato in RT-PCRin 8/33 soggetti (24%) di un allevamento. Tutti gli animali avevano meno di 2 anni di età ed erano asintomatici. Al microscopio elettronico si sono osservati virioni di dimensioni ed aspetto tipico dei norovirus. L'analisi del genoma ha permesso di caratterizzare i virus nel genogruppo GIII, assieme ai norovirus dei bovini. Tuttavia, il gene capsidico del virus Norsewood 30/2007/NZL è risultato essere di un genotipo diverso (GIII.3) da quelli descritti nei virus bovini, GIII.1 e GIII.2.
I norovirus sono la principale causa di gastro-enterite nell'uomo e sono trasmessi facilmente in modo diretto e indiretto, mediante contaminazione di fomiti ed alimenti. Diverse evidenze suggeriscono che si sia realizzato in passato il salto di specie con scambio genetico mediante ricombinazione tra virus umani ed animali. Il rischio zoonosico diretto sembra invece ridotto.

PICORNAVIRUS - I picornavirus (PV) (famiglia *Picornaviridae*) sono piccoli virus rotondi privi di envelope, con RNA monocatenario a polarità positiva di 7-9 kb, poli-adenilato all'estremità 3'. I PV infettano l'uomo ed una ampia varietà di specie di mammiferi e uccelli. Possono causare patologie respiratorie, cardiache, epatiche, neurologiche, muco-cutaneee sistemiche di diversa entità. I PV sono attualmente classificati in 12 generi (*Aphthovirus, Avihepatovirus, Cardiovirus, Enterovirus, Erbovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Parechovirus, Sapelovirus, Senecavirus, Teschovirus,* and *Tremovirus*) (Knowles et al., 2012), con diversi nuovi virus non ancora classificati scoperti negli ultimi anni.
I PV sono stati identificati ripetutamente nei piccoli ruminanti, sebbene manchi una caratterizzazione precisa a livello genomico dei virus isolati negli anni 70 e 80. Studi sierologici usando l'enterovirusbovino (BEV) LCR-4 (enterovirus E) (Kunin and Minuse, 1958) hanno rivelato anticorpi specifici nel 32.8% delle pecore e nel 27.6% delle capre (Gür et al., 2008). Inoltre, usando primer specifici per BEV o analisi metagenomica del viroma enterico, enterovirus bovino/ovino-simili sono stati identificati nelle feci di ovi-caprini (Omatsu et al., 2014).
Recenti progressi nella diagnostica e nelle tecnologie di sequenziamento hanno consentito di identificare almeno 3 distinti generi di PV (*Enterovirus*, *Kobuvirus* ed il genere candidato *Hungarovirus*) nei piccoli ruminanti. Tuttavia, non è noto se tali virus siano associati o meno a patologia enterica.
Il virus ovino OEV-1, genere *Enterovirus*, mostra caratteristiche genetiche intermedie tra BEV (enterovirus E) ed enterovirus suino tipo B (enterovirus G) suggerendo una origine ricombinante, con la porzione 5' UTR del genoma simile a BEV (Boros et al., 2012). Nello stesso studio, PV OEV-1-simili sono stati identificati nel 44% (7/16) delle feci degli agnelli.
Un PV (OHuV-1) appartenente ad un possibile nuovo genere (*Hungarovirus*) e specie è stato identificato nelle feci di ovini in Ungheria. Il virus OHuV-1 è stato identificato nel 25% (4/16) degli agnelli asintomatici testati (Reuter et al., 2012b). Negli ovi-caprini sono stati identificati PV geneticamente correlati ai kobuvirus bovini (Lee et al., 2012), suggerendo la possibile circolazione interspecie trai ruminanti. Inoltre, kobuvirus geneticamente non correlati ai kobuvirus dei bovini sono stati identificati nelle capre (Lee et al., 2012) e negli ovini (Barry et al., 2011). Questo indica che diverse specie e tipi di kobuvirus circolano nei piccoli ruminanti.

ROTAVIRUS - I rotaviruses (RV) (famiglia *Reoviridae*) sono importanti patogeni enterici nell'uomo e negli animali. Negli animali di interesse zootecnico i RV sono associati a forme gravi di enteritenei vitelli di pochi giorni di età, nei suinetti allo svezzamentoo post-svezzamento e nei puledri. Il virione ha diametro di 70-75 nm, con capside trilaminare a struttura icosaedricae privo di envelope. Il genoma è costituito di 11 segmenti di RNA a doppia catena, che codificano per 6 proteine strutturali e 5 o 6 proteine non-strutturali (Estes and Kapikian, 2007).

Sulla base delle loro caratteristiche genetiche edantigeniche, i RV possono essere ulteriormente classificati in 5 specie, A-D, ed altre 3 possibili specie candidate, F-H (Matthijnssens et al., 2012). RVA, RVB, RVC e RVH sono stati identificati nell'uomo e negli animali, mentre RVD, RVE, RVF ed RVG solo negli animali.

Le proteine del capside esterno VP7 e VP4 sono importanti antigeni neutralizzanti ed inducono immunità protettiva (Estes and Kapikian, 2007). Per gli RVA è usato un sistema di classificazione binario basato su VP7 (G tipo) e VP4 (P tipo). Sistemi analoghi sono in via di sviluppo per RVB ed RVC. Per quanto riguarda i RVA, sono stati descritti almeno 27 G e37 P tipi in mammiferi e specie aviari. La distribuzione di G e P tipi nelle varie specie mostra pattern peculiari, in virtù di meccanismi di restrizione di specie (Martella et al., 2010). Tuttavia, i RVA possono spesso attraversare le barriere di specie (da animali a uomo o tra animali) e sono state documentate in molte occasioni infezioni eterologhe (Martella et al., 2010).

Almeno 3 specie di RV (RVA, RVB ed RVC) sono state descritte nei piccoli ruminanti. Segnalazioni e report su RVA negli ovi-caprini sono state effettuate in diversi paesi del mondo, con prevalenza fino al 60% e tassi di mortalità del 10-30% (Papp et al., In press).Nei piccoli ruminanti sono stati identificati RVA con VP7 di tipo G3, G6, G8, G9e G10 e VP4 di tipo P[1], P[3], P[5], P[8], P[11], P[14] e P[15](Papp et al., In press). Alcuni tipi (G6, G8, G10 e P[1], P[5] e P[11]) sono comuni nei bovini, suggerendo una libera circolazione tra i ruminanti, mentre altri tipi (G3, P[3], P[14] e P[15]) sembrano essere peculiari dei piccoli ruminanti. Nel corso di focolai di diarrea neonataleda RVB, la prevalenza del virus nelle feci e la morbilità e mortalità possono essere molto alte. RVB è stato anche associato a diarrea in capretti. Sono scarse le informazioni disponibili per RVC (Muñoz et al., 1996).

L'inoculazione di un ceppo RVA ovino in agnelli gnotobiotici determina diarrea e anoressia. Il virus è eliminato con le feci per diversi giorni. Agnelli di 1 giorno di vita sono più sensibili di agnelli di 12 giorni. La risposta sierologica all'infezione da RVA è presente in tutti gli agnelli (Snodgrass et al., 1976). La somministrazione del colostro è fondamentale per proteggere gli agnelli dalla patologia rotavirus-associata. Il colostro e il latte di pecore vaccinate 2-3 settimane prima della fecondazione contiene alti titoli di anticorpi specifici per RVA (Wells et al., 1978). Sebbene non siano disponibili vaccini per la profilassi di RVA negli ovi-caprini, un ceppo ovino di RVA, Lp14 (G10P[15]), è stato usato per sviluppare un vaccino umano per uso orale, il Lanzhou Lamb Rotavirus vaccine, attualmente commercializzato in Cina.

Studi recentihanno messo in luce come i RVA ovi-caprini possano avere una rilevanza zoonotica. L'analisi del genoma suggerisce che RVA P[14] conVP7 di tipo G6 e G8 identificati nell'uomo abbiano probabilmente avuto origine mediante trasmissione interspecie da piccoli e grandi ruminanti, o da altre specie di Artiodactyla (Matthijnssens et al., 2009).

CORONAVIRUS - I coronavirus (CoV) sono grandi virus ad RNA che infettano i mammiferi e gli uccelli. Attualmente i CoV sono inclusi nell'ordine *Nidovirales*, famiglia *Coronaviridae*, sottofamiglia *Coronavirinae.* La sottofamiglia *Coronavirinae* include tre generi, *Alpha-*, *Beta-*, e *Gammacoronavirus* (Decaro and Buonavoglia, 2011). Recentementeè stato proposto il nuovo genere *Deltacoronavirus*.

I CoV che infettano le diverse specie di ruminanti sono strettamente correlati al CoV bovino (BCoV) (genere *Betacoronavirus,* specie *Betacoronavirus-1*) e sono di solito considerati come varianti di ospite del virus bovino (Decaro et al., 2008). Sebbene virus BCoV-simili circolino negli ovi-caprini, il loro ruolo entero-patogeno negli agnelli e capretti rimane poco chiaro. Anticorpi per BCoV sono stati identificati nel 19% di 218 sieri di pecore in Svezia, con la frequenza più elevata nei grandi allevamenti e in animali con più di 4 anni (Tråvén et al., 1999). In aggiunta, particelle virali CoV-simili sono state osservate al microscopio elettronico nelle feci di ovini. Tuttavia, indagini virologiche su campioni di feci di agnelli e capretti con diarrea hanno fornito risultati contrastanti. Uno studio nei piccoli ruminanti in Spagna non ha identificato CoV in animalineonati con diarrea (Muñoz et al., 1996). All'opposto, infezioni miste darotavirus e CoV sono state segnalate in agnelli in Arizona. Più recentemente, CoVè stato associato con diarrea e mortalità in capretti in Turchia (Ozmen et al., 2006).

Recentemente, la comparsa della Middle East Respiratory Syndrome (MERS) CoV nell'uomo e la sua identificazione nei cammelli ha suggerito il possibile ruolo dei camelidi o di qualche specie di ruminante nella epidemiologia di questo nuovo *Betacoronavirus*. Tuttavia, studi sierologici non hanno identificato anticorpi specifici per MERS-CoVnei sieri di pecore e capre nei paesi del Medio-Oriente (Hemida et al., 2013).

BUNYAVIRUS - I bunyavirus (BuVs) sono virus privi di envelope, sferici con un diametro di circa 80 to 120 nm. Il genoma è composto da 3 segmenti di RNA monocatenario a polarità negativa. La famiglia *Bunyaviridae*è composta da oltre 350 virus, perlopiù trasmessi da artropodi, e suddivisi in 5 generi: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*. Diversi BuV sono stati identificati negli ovi-caprini, ma solo alcuni sono stati associati adenterite (Hubálek et al., 2014).

La Nairobi sheepdisease (NSD) fu descritta per la prima volta in un ovino con enterite acutaa Nairobi, Kenya. Il virus (NSDV), prototipo del genere *Nairovirus*, è anche noto come Ganjam virus. NSDV è diffuso in Africa Orientale e India ed è trasmesso con zecche metastriate, quali *Rhipicephalusappendiculatus* (Africa), *Haemaphysalis wellingtoni* ed *Haemaphisalis intermedia* (India). Gli ospiti vertebrati sono gli ovi-caprini, sebbene il ratto *Arvicanthisa byssinicus* possa servire come reservoir per il virus. La malattia si può osservare in animali privi di immunità introdotti in aree con infezione endemica. La NSD è considerata come una delle infezioni più gravi degli ovi-caprini, con tassi di mortalità pari al 90% a seguito di febbre emorragica acuta. La malattia si osserva solo in ovini e caprini, con sintomi meno gravi negli ovini, mentre altri ruminanti sono generalmente refrattari all'infezione. I sintomi compaiono di solito 4-6 giorni dopo infezione trasmessa con il morso di zecca ed esordiscono con febbre, che raggiunge i 42°C e persiste per 1-7 giorni. La diarrea di solito si osserva 1-3 giorni dopo la comparsa delle febbre ed è caratterizzata da feci acquose e fetide che diventano emorragiche nei giorni successivi. Gli animali infetti possono inoltre mostrare depressione, difficoltà respiratorie con scolo nasale muco-purulento ededema polmonare, miocardite e nefrite tubulare. Gli animali in gestazione spesso abortiscono ed i feti possono mostrare difetti di sviluppo. NSD è una malattia soggetta a denuncia e casi sporadici di infezione sono descritti nell'uomo. Un vaccino attenuato è disponibile per il controllo della NSD (Davies et al., 1974).

Il Rift Valley Fever Virus (RVFV) (*Phlebovirus*), o Zinga virus, fu isolato per la prima volta da una forma epizootica di aborto in pecore gravide e di mortalità neonatale nella Valle del Rift, Kenya, nel 1930. I focolai di RVF sono rimasti circoscritti al continente Africano sino al 2000, quando gravi focolai di RVF furono descritti contemporaneamente in Yemen e Arabia Sauditae più tardi in Madagascar e Mayotte. L'accresciuto rangegeografico di RVF rappresenta un pericolo anche per i paesi Europei (Chevalier et al., 2010). RVF è trasmessa da zanzare del genere *Aedes*e *Culex* (Chevalier et al., 2010). Diverse specie di vertebrati sono sensibili all'infezione da RVFV, tra cui ruminanti domestici e selvatici e roditori. Mentre i ruminanti sviluppano sintomi clinici, i roditori, principalmente ratti dei generi *Arvicanthise Rattus*, fungono da reservoir. Gli equidi ed i suini si possono infettare in modo asintomatico. Infezioni fatali sono state segnalate in cani, gatti e primati. Recentemente il virus è stato identificato in pipistrelli. Nell'uomo di solito si osserva una sindrome simil-influenzale, seguita, a volte, da forme emorragiche, neurologiche ed oculari (Pepin et al., 2010). I giovani ruminanti, quali agnelli e capretti, tendono a sviluppare forme gravi, con tassi di mortalità del 70%, ma negli ovini adulti la mortalità è inferiore al 10%. Agnelli e capretti di età inferiore a 7 giorni mostrano una forma letale iperacuta con febbre (40-42°C), inappetenza e debolezza. Gli agnelli più grandi, e meno frequentemente gli animali

adulti, sviluppano una forma acuta, con febbre (40-41°C), vomito, diarrea emorragica, depressione, scolo nasale muco-purulento, difficoltà motorie ed epatite necrotica. Nei soggetti adulti, in particolare nelle capre, il decorso dell'infezione è subacuto o subclinico. Sono inoltre frequenti aborto e malformazioni (Gerdes, 2002). Per la profilassi di RFV nei ruminanti, sebbene siano disponibili sia vaccini vivi attenuati che spenti, si preferiscono i vaccini spenti perché quelli vivi attenuati possono causare aborto (Gerdes, 2002).

Nell'Ottobre 2011, un nuovo *Orthobunyavirus* è stato identificato in campioni clinici di bovini in Schmallenberg, Germania. Gli animali presentavano febbre, calo della lattazione, e occasionalmente diarrea e aborto. Il virus, nominato Schmallenberg virus (SBV), è risultato essere simile a virus del sierogruppo Simbu, quali i virus Akabane e Shamonda (Hoffmann et al., 2012). Questi BuV sono associati alla sindrome artrogrifosi-idroanencefalia (AHS) nei ruminanti ma non sono mai stati segnalati in Europa. Il nuovo BuV è stato in seguito identificato in altri paesi europei, nei bovini, ovini e caprini. Moscerini pungitori (genere *Culicoides*) sembrano giocare un ruolo nella trasmissione di SBV, che è caratterizzata da diffusione stagionale con più elevata prevalenza in estate e autunno. È descritta anche la trasmissione verticale e venerea. L'infezione da SBV causa febbre transitoria, diarrea, e ridotta produzione di latte, nonché mortalità perinatale e gravi malformazioni in agnelli e vitelli (Beer et al., 2013). La prima segnalazione clinica di SBV negli ovini descriveva malformazioni compatibili con la AHS in agnelli nati alla fine del 2011 (van denBrom et al., 2012). Sebbene la diarrea associata a SBV sia stata descritta solo nei bovini, l'infezione sperimentale di ovini ha determinato per lo più infezione subclinica, ed un unico animale ha sviluppato diarrea per diversi giorni (Wernike et al., 2013). SBV non è ritenuto un agente zoonotico ed un vaccino spento è stato recentemente messo in vendita per la profilassi nei bovini ed ovini.

CONCLUSIONI - Diversi virus sono stati associati ad enterite o sono stati identificati nel tratto enterico degli ovi-caprini. Assieme ad i virus menzionati in questa review, altre infezioni virali sistemiche sono in grado anche di causare sintomi enterici in questi animali, sebbene la forma enterica non sia la manifestazione clinica più peculiare o predominante. Grave enterite necrotizzante è stata osservata in capretti infetti con caprine herpesvirus type 1. Inoltre, sintomi enterici sono frequenti in giovani ovi-caprini colpiti dalla pest de petit sruminant (genere *Morbillivirus*). Sebbene ci siano stati notevoli miglioramenti nella gestione aziendale e nelle strategie di prevenzione e trattamento delle patologie infettive, la diarrea neonatale rimane una delle cause più comuni e di maggiore impatto economico negli ovi-caprini (Dohoo et al., 1985). Sono stati fatti diversi passi avanti nella comprensione del ruolo dei virus come causa di enteritenegli ovi-caprini, e diversi nuovi virus sono stati identificati recentemente. Tuttavia, è probabile che molti nuovi virus siano scoperti nei prossimi anni. Lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici efficaci e l'implementazione degli algoritmi diagnostici delle enteriti virali, permetterà di raccogliere importanti dati epidemiologici ed aiuterà a colmare i gap esistenti nella eziologia delle enteriti degli ovi-caprini.

Bibliografia

Barry AF, Ribeiro J, Alfieri AF, van der Poel WHM, Alfieri AA (2011) First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 11, 1811-1814.

Beer M, Conraths FJ, van der Poel WHM (2013). "Schmallenberg virus"—a novel orthobunyavirus emerging in Europe. Epidemiol. Infect. 141, 1-8.

Belak S (1990). Ovine adenoviruses, in: Morein B, Dinter Z (Eds.), Virus Infections of Ruminants. Elsevier Science Ltd, Amsterdam; New York: New York, NY, U.S.A, pp. 171-185.

Blomström A-L, Widén F, Hammer A-S, Belák S, Berg M (2010). Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. J. Clin. Microbiol. 48, 4392-4396.

Boros A, Pankovics P, Knowles NJ, Reuter G (2012). Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep. J. Gen. Virol. 93, 1941-1951.

Chevalier V, Pépin M, Plée L, Lancelot R (2010). Rift Valley fever—a threat for Europe? Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 15, 19506.

Clarke I, Estes M, Green K, Hansman G, Knowles N, Koopmans M, Matson D, Meyers G, Neill J, Radford A, Smith A, Studdert M, Thiel TH-J, Vinjé J (2012). Caliciviridae, in: King A, Adams M, Carstens E, Lefkowitz E (Eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, San Diego, pp. 977-986.

Davies FG, Mungai J, Shaw T (1974). A Nairobi sheep disease vaccine. Vet. Rec. 94, 128.

Decaro N, Buonavoglia C (2011). Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 41, 1121-1132.

Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Mari V, Desario C, Lucente MS, Lorusso A, Greco G, Corrente M, Tempesta M, Buonavoglia C (2008). Biological and genetic analysis of a bovine-like coronavirus isolated from water buffalo (Bubalusbubalis) calves. Virology 370, 213-222.

Dohoo IR, Curtis RA, Finley GG (1985). A survey of sheep diseases in Canada. Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Médecine Comparée 49, 239-247.

Estes M, Kapikian AZ (2007). Rotaviruses, in: Knipe, D., Howley, P. (Eds.), Fields Virology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1917-1974.

Gerdes GH (2002). Rift valley fever. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 18, 549-555.

Gür S, Yapkiç O, Yilmaz A (2008). Serological survey of bovine enterovirus type 1 in different mammalian species in Turkey. Zoonoses Public Health 55, 106-111.

Harrach B, Benkö M, Both GW, Brown M, Davison A, Echavarria M, Hess M, Jones M, Kajon A, Lehmkuhl H, Mautner V, Mittal S, Wadell G (2011). Family Adenoviridae, in: King A, Adams M, Carstens E, Lefkowitz E (Eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, pp. 125-141.

Hemida MG, Perera RA, Wang P, Alhammadi MA, Siu LY, Li M, Poon LL, Saif L, Alnaeem A, Peiris M (2013). Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus seroprevalence in domestic livestock in Saudi Arabia, 2010 to 2013. Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 18, 20659.

Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg, M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Beer M (2012). Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. Emerg. Infect. Dis. 18, 469-472.

Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N (2014). Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. Adv. Virus Res. 89, 201-275.

Jung K, Scheuer KA, Zhang Z, Wang Q, Saif LJ (2014). Pathogenesis of GIII. 2 bovine norovirus, CV186-OH/00/US strain in gnotobiotic calves. Vet. Microbiol. 168, 202-207.

Knowles N, Hovi T, Hyypiä T, King A, Lindberg A, Pallansch M, Palmenberg A, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell T (2012). Picornaviridae, in: King A, Adams M, Carstens E, Lefkowitz E (Eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, pp. 855-880.

Kunin CM, Minuse E (1958). The isolation in tissue culture, chick embryo and suckling mice of filtrable agents from healthy dairy cattle. J. Immunol. Baltim. Md 1950 80, 1-11.

Lee M-H, Jeoung H-Y, Lim J-A, Song J-Y, Song D-S, An D-J (2012). Kobuvirus in South Korean black goats. Virus Genes 45, 186-189.

Lehmkuhl HD, DeBey BM, Cutlip RC (2001). A new serotype adenovirus isolated from a goat in the United States. J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc 13, 195-200.

Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. Vet. Microbiol. 140, 246-255.

Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. Arch. Virol. 157, 1177-1182.

Matthijnssens J, Potgieter CA, Ciarlet M, Parreño V, Martella V, Bányai K, Garaicoechea L, Palombo EA, NovoL, Zeller M, Arista S, Gerna G, Rahman M, Van Ranst M, (2009). Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? J. Virol. 83, 2917-2929.

Mendez E, Arias CF (2007). Astroviruses, in: Fields Virology, Knipe DM, Howley PM, Editors. Lippincott Willliams & Wilkins, Philadelphia, pp. 981-1000.

Muñoz M, Alvarez M, Lanza I, Cármenes P (1996). Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. Epidemiol. Infect. 117, 203-211.

Omatsu T, Tsuchiaka S, Hirata T, Shiroma Y, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Furuya T, Nagai M, Ochiai H, Tamaki S, Mizutani T (2014). Detection of enterovirus genome sequence from diarrheal feces of goat. Virus Genes.

Ozmen O, Yukari BA, Haligur M, Sahinduran S (2006). Observations and immunohistochemical detection of Coronavirus, Cryptosporidium parvum and Giardia intestinalis in neonatal diarrhoea in lambs and kids. Schweiz. Arch. FürTierheilkd. 148, 357-364.

Papp H, Malik Y, Farkas S, Jakab F, Martella V, Banyai K (In press). Rotavirus strains in neglected animal species, including lambs, goats and camelids. Virus Dis. In press.

Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J (2010). Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. Vet. Res. 41, 61.

Reuter G, Pankovics P, Delwart E, Boros Á (2012a). Identification of a novel astrovirus in domestic sheep in Hungary. Arch. Virol. 157, 323-327.

Reuter G, Pankovics P, Knowles NJ, Boros Á (2012b). Two closely related novel picornaviruses in cattle and sheep in Hungary from 2008 to 2009, proposed as members of a new genus in the family Picornaviridae. J. Virol. 86, 13295-13302.

Snodgrass DR, Angus KW, Gray EW, Menzies JD, Paul G (1979). Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs. Arch. Virol. 60, 217-226.

Snodgrass DR, Gray E.W (1977). Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhoea. Arch. Virol. 55, 287-291.

Snodgrass DR, Herring JA, Gray EW (1976). Experimental rotavirus infection in lambs. J. Comp. Pathol. 86, 637-642.

Souza M, Azevedo MSP, Jung K, Cheetham S, Saif LJ (2008). Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II. 4-HS66 strain of human norovirus. J. Virol. 82, 1777-1786.

Tråvén M, Carlsson U, Lundén A, Larsson B (1999). Serum antibodies to bovine coronavirus in Swedish sheep. Acta Vet. Scand. 40, 69-74.

Van den Brom R, Luttikholt SJM, Lievaart-Peterson K, Peperkamp NHMT, Mars MH, van der Poel WHM, Vellema P (2012). Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. Tijdschr. Diergeneeskd. 137, 106-111.

Wells PW, Snodgrass DR, Herring JA, Dawson AM (1978). Antibody titres to lamb rotavirus in colostrum and milk of vaccinated ewes. Vet. Rec. 103, 46-48.

Wernike K, Hoffmann B, Bréard E, Bøtner A, Ponsart C, Zientara S, Lohse L, Pozzi N, Viarouge C, Sarradin P, Leroux-Barc C, Riou M, Laloy E, Breithaupt A, Beer M (2013). Schmallenberg virus experimental infection of sheep. Vet. Microbiol. 166, 461-466.

Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, Scholes P, Savill M, Greening GE (2009). Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. Vet. Microbiol. 133, 184-189.

Il corretto approccio diagnostico alle principali malattie a carattere zoonotico degli ovini e dei caprini

N. D'AVINO[1], A. BOSCO[2]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche
[2] Unità di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Regione Campania

Parole chiave: zoonosi, piccoli ruminanti, diagnosi.

INTRODUZIONE - Le zoonosi sono malattie che vengono naturalmente trasmesse dagli animali all'uomo. Molte di loro necessitano di uno stretto o prolungato contatto tra uomo e animale e vengono pertanto annoverate nelle cosiddette malattie professionali; gli allevatori, i veterinari e gli addetti al settore sono i soggetti più a rischio. In altri casi la principale via d'infezione per l'uomo è quella aerogena perciò la possibilità di una loro diffusione è legata alla presenza di insediamenti urbani in prossimità degli allevamenti. Alcune zoonosi possono inoltre essere trasmesse per via alimentare, quindi tramite cibi ed acque contaminati, altre attraverso l'azione di insetti vettori. Dal punto di vista eziologico si annoverano come potenziali agenti zoonotici virus, batteri, funghi e parassiti. Nel settore dei piccoli ruminanti,alcune malattie infettive di comune riscontro costituiscono delle zoonosimaè difficile allestire un quadro reale della loro complessiva diffusione, ad eccezione delle malattie regolate da piani di controllo ed eradicazione nazionali (Brucellosi, Blue Tongue, TSE- Scrapie). Malgrado l'Italia disponga sia di un consistente patrimonio zootecnico pari a 7.181.828 ovini e 975.858 caprini (dati Istat 2013), sia di una capillare ed efficiente rete di Enti ed Istituzioni deputate alla diagnosi, ad oggi non vi sono dati relativiad indagini epidemiologiche ad ampio spettro e i dati riportati in bibliografia riguardano quasi sempre situazioni locali.
Il patrimonio zootecnico ovino e caprino italiano si caratterizza inoltre per una ampia differenzazione dei sistemi di allevamento, che porta a sua volta ad una diversa gestione manageriale e sanitaria del gregge. I sistemi di allevamento a carattere estensivo o semiestensivo, che prevedono ancora,se pur limitatamente rispetto al passato, la monticazione estiva e la transumanza invernale, sono ben radicati sul territorio nazionale, soprattutto nelle zone insulari e centro-meridionali. D'altro canto sono sempre più diffusi i sistemi di allevamento intensivi e semi intensivi con l'introduzione anche di razze straniere, con il conseguente miglioramento della genetica nazionale, dello sviluppo dell'industriadel settore lattiero caseario e della gestione in stalla del gregge. In questo panoramasi collocano inoltre innumerevoli situazioni gestionali che presentano alcuni caratteri del tutto peculiari e tipici di alcune realtà locali, come ad esempio la scelta di non usufruire di strutture meccanizzate per la mungitura, che rendono estremamente complesso l'approccio e la gestione delle problematiche di natura sanitaria e non solo.

APPROCCIO DIAGNOSTICO ALLE PRINCIPALI MALATTIE INFETTIVE A CARATTERE ZOONOTICO - Nell'ottica di un corretto approccio diagnostico si possono individuare almeno tre momenti fondamentali: primo su tutti una corretta educazione, intesa come formazione ed informazione, sia del comparto allevatoriale, poiché l'allevatore rappresenta una sorta di sentinella nel cogliere e comunicare i segni di malattia del proprio gregge, sia del comparto sanitario, in quanto i medici veterinari che operano nel settore gestiscono in prima persona, in collaborazioneconegli enti deputati, le problematiche di natura sanitaria.Solo un buon livello di comunicazione e interazione tra le parti può produrre un corretto approccio diagnostico e gestionale delle problematiche sanitarie. La conoscenza epidemiologica del territorio in cui si opera è un altro fattore imprescindibile. Infatti, disporre di dati aggiornati ereali rispetto alla prevalenza delle malattie che insistono nell'allevamento ovino e caprino consente di agire in tempi rapidi, predisponendoadeguate strategie per la prevenzione e ilcontrollo di eventuali focolai di malattia con conseguente salvaguardiadella sicurezza pubblica. Va sottolineato infine come un corretto approccio diagnostico si basi inevitabilmente sull'applicazione di un corretto protocollo di campionamento. Le zoonosi di natura infettiva comunemente presenti nell'allevamento ovino e caprino interessano generalmente la sfera riproduttiva,sono accomunate da una sintomatologia inapparenteed hanno come unico segno clinicamente evidente l'aborto. È chiaro come questo comporti il più delle volte una oggettiva difficoltà nell'orientare la diagnosi senza ricorrere al supporto tecnico-laboratoristico. Il ruolo che svolge in questo contesto ilveterinario libero professionista diventa quindi un ruolo chiave: deve infattiraccogliere un attenta anamnesi, supportare l'allevatore nella corretta gestione degli animali malati con l'applicazione delle più comuni norme di biosicurezza, dall'isolamento degli animali stessi all'utilizzo di dispositivi di protezione individuale e alla raccolta di materiale organico da inviare al laboratorio, ed effettuare un corretto e puntuale campionamento.Compito del laboratorio d'altro canto è fornire un supporto diagnostico che si caratterizzi per efficienza ed efficacia. Nell'esempio specifico delle malattie della sfera riproduttiva il cui l'exitus è rappresentato dall'aborto, è quindi necessario disporre di un protocollo che permetta di indagare un panel fisso di malattie finalizzato al raggiungimentodi una diagnosi quantomeno presunta che a sua volta consenta di sviluppare adeguate strategie di interventoe di prevenzione, e parallelamentedi raccogliere dati di natura epidemiologica.

CONSIDERAZIONI - L'auspicio è indubbiamente quello di raggiungere una sinergia di intenti che veda tutti gli operatori del settore attivamente impegnati nel perseguire obbiettivi comuni e sviluppare un modus operandi univoco che consenta di delineare un chiaro quadro epidemiologico su suolo nazionale e non differenziato ed a sé stante per ogni realtà regionale al fine di poter mettere in atto tutte quelle misure necessarie a contenere un eventuale focolaio epidemico sia di natura zoonotica che non ed ottenere un miglioramento delle condizioni di gestione, benessere e sanità delle greggi con evidenti risvolti di sanità pubblica.

APPROCCIO DIAGNOSTICO ALLE PRINCIPALI PARASSITOSI A CARATTERE ZOONOTICO - Il vecchio concetto di "One-Health" sta riassumendo sempre più importanza in ambito sanitario interessando, naturalmente, anche le problematiche parassitologiche anche in considerazione della numerosità e della diffusione dei parassiti agenti di zoonosi ed in particolare i protozoi e gli elminti propri degli ovini e dei caprini (Ahmed e Shoji 2014). In questo contesto l'allevamento dei piccoli ruminanti sta assumendo un certo ruolo potendo rappresentare un importante moltiplicatore e diffusore per questi parassiti nell'ambiente, da cui il rischio di trasmissione all'uomo.
Per un corretto approccio al controllo delle infezioni parassitarie a carattere zoonotico, proprio nell'ottica di ridurre la diffusione di

questi agenti patogeni nell'ambiente, risulta di primaria importanza l'utilizzo di una opportuna strategia diagnostica. La diagnosi delle endoparassitosi, sia nell'uomo che negli animali è un processo articolato che prevede più tappe, anamnesi ambientale, individuale e/o di gruppo, esame clinico ed infine la diagnosi di laboratorio. Quest'ultima oltre a consentire la conferma di un generico sospetto clinico, spesso riferisce una precisa diagnosi eziologica. La diagnosi di laboratorio è, inoltre, di ausilio fondamentale per valutare le misure di controllo più idonee da mettere in atto per stimare l'efficacia degli interventi profilattici e terapeutici e, talvolta, per formulare la prognosi. Benché siano oggi disponibili nuove possibilità diagnostiche basate sulla sierologia, genetica, genomica, metagenomica, proteomica e bioinformatica (Roeber *et al*., 2013), la diagnosi degli elminti e dei protozoi dell'apparato digerente e delle ghiandole annesse e dell'apparato respiratorio, negli animali e nell'uomo, si basa principalmente sull'esame coprologico (Cringoli *et al*., 2010). La coprologia (dal greco: κ προς = feci e σκοπ α = esame), ossia l'analisi di campioni di feci per la ricerca di parassiti adulti o parte di essi e/o di elementi parassitari (uova, larve, cisti, oocisti), è a tutt'oggi la procedura diagnostica più largamente utilizzata in parassitologia medica e medico veterinaria (Rinaldi e Cringoli, 2014). Ora più che mai la parassitologia veterinaria e la salute pubblica stanno convergendo verso un approccio strategico comune per ottimizzare la diagnosi delle parassitosi negli animali e nell'uomo attraverso l'ottimizzazione delle tecniche di FaecalEggCount (FEC) (Rinaldi e Cringoli, 2014). Sebbene ampiamente utilizzate per la diagnosi di parassiti intestinali, è ben noto che le tecniche FEC siano soggette ad una serie di fattori da tenere in considerazione per una corretta interpretazione dei risultati (Utzinger *et al*., 2012). In primo luogo, vi è una chiara mancanza di standardizzazione delle procedure tecniche; di solito ogni laboratorio utilizza "il proprio metodo", basato sulla "tradizione laboratoristica" piuttosto che sulle procedure operative standard della tecnica stessa. A questo si aggiunge che, in linea generale, spesso non vengono presi in considerazione parametri comunemente utilizzati in altri ambiti di diagnostica di laboratorio come la sensibilità, la precisione, l'accuratezza, la specificità e la ripetitività di una data tecnica. Sono, invece, enfatizzati altri elementi, quali la economicità, la rapidità e la semplicità di una tecnica, trascurando importanti fattori che influenzano il risultato atteso. In questi ultimi anni è stato introdotto il FLOTAC, uno strumento che ha consentito la messa a punto di nuove tecniche copromicroscopiche multivalenti, altamente sensibili ed accurare per il campo medico e medico veterinario, le tecniche FLOTAC, oggi validate dalla comunità scientifica con numerosi lavori su riviste nazionali ed internazionali (Cringoli *et al*., 2010). Queste tecniche stanno progressivamente sostituendo le tecniche tradizionali (flottazione in provetta, sedimentazione, McMaster, Wisconsin e Baermann) e nei piccoli ruminanti permettono di effettuare, con un solo esame, la diagnosi contemporanea di 22 infezioni parassitarie, comprese parassitosi a carattere zoonotico. La sensibilità analitica di queste tecniche è elevata poiché consentono la conta diretta degli elementi parassitari (uova, larve, oocisti e cisti) anche in un grammo di feci, ovvero l'unità internazionale di misura della FEC. Inoltre, considerata la crisi economica internazionale e la conseguente riduzione dei fondi di ricerca, le tecniche diagnostiche devono essere convenienti e di facile utilizzo, ma al tempo stesso accurate e precise. Devono, inoltre, fornire un risultato in tempi rapidi in modo da intraprendere tempestivamente opportune misure di controllo. Pertanto nuove soluzioni sono necessarie per ridurre il costo della FEC, in termini di carico di lavoro, effettuando non più le analisi del singolo campione ma di pool di campioni, in tal modo è possibile ottimizzare anche le procedure per valutare l'efficacia antiparassitaria mediante il Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT) (Rinaldi *et al*., 2014). Oltre all'utilizzo dei pool, una nuova sfida della copromicroscopia è rappresentata dall'introduzione della diagnosi parassitologica direttamente in allevamento utilizzando nuovi strumenti diagnostici supportati dalla nuova generazione di microscopi da campo. Questo approccio è stato già utilizzato, con successo, in studi pilota in medicina umana. Ad esempio, Stothard *et al.* (2005) hanno riportato un'esperienza di campo dove è stato utilizzato un microscopio portatile per la diagnosi di schistosomiasi intestinale nei bambini delle scuole dell'Uganda. Questo microscopio portatile è stato proposto come un'alternativa pragmatica al microscopio convenzionale, giocando un ruolo importante nella raccolta di dati sulla prevalenza dell'efficacia antielmintica e nel potenziare la capacità diagnostica dei laboratori di analisi parassitologiche presenti nei centri diagnostici delle aree marginali (Stothard *et al*., 2005). Più recentemente, Bogoch *et al.* (2013) hanno effettuato una prova di campo dimostrando che un telefono cellulare può essere convertito in un microscopio per la diagnosi di endoparassiti intestinali in contesti dove le risorse sono limitate e non c'è la possibilità di utilizzo della corrente elettrica. Tali innovazioni diagnostiche hanno il vantaggio di essere portatili, economiche, facili da usare e non richiedono un'alimentazione elettrica costante. Inoltre, con l'utilizzo della tecnica Mini-FLOTAC (Cringoli *et al*., 2013) che si basa su dispositivi diagnostici chiusi (Mini-FLOTAC e Fill-FLOTAC), è possibile effettuare direttamente in campo una diagnosi copromicroscopica quali/quantitativa in poco tempo senza perdere di accuratezza e sensibilità. Questa tecnica non necessita della centrifuga, di altre apparecchiature da laboratorio e di particolari reagenti, e risulta quindi particolarmente indicata per la diagnosi delle infezioni da elminti e protozoi direttamente in allevamento. Il futuro della copromicroscopia nei piccoli ruminanti dipenderà dallo sviluppo, dalla standardizzazione e dalla verifica in campo dei nuovi test diagnostici, confrontando i risultati ottenuti con quelli delle tradizionali tecniche di laboratorio. In tal modo sarà possibile intraprendere tempestivamente una strategia di controllo adeguata, soprattutto verso quelle parassitosi dei piccoli ruminanti che possono essere un pericolo per la salute pubblica.

The correct diagnostic approach to the most important zoonotic diseases of sheep and goats

Key words: zoonosis, small ruminants, diagnosis.

Bibliografia

Ahmed IY, Shoji U. (2014) Review of Parasitic Zoonoses in Egypt. Trop Med Health 42(1): 3-14.

Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J. (2010), FLOTAC: new ultivalent technique for qualitative and quantitative copromicroscopicdiagnosis of parasites in animals and humans. NatProt 5: 503-515.

Farina R., Scatozza R. (1998) Trattato di malattie infettive degli animali, UTET, Torino, Italy.

Martin W.B. (1986) Malattie della Pecora, Società Editrice Esculapio, Bologna, Italy.

Rinaldi L, Levecke B, Bosco A, Ianniello D, Pepe P, Charlier J, Cringoli G, Vercruysse J. (2014) Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the assessment of gastro-intestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. Vet. Parasitol., in press.

Rinaldi L, Cringoli G. (2014) Exploring the interface between diagnostics and maps of neglected parasitic diseases. Parasitol 28: 1-8.

Rodolakis A. (2014) Zoonoses in goats: How to control them, Small Ruminant Research, article in press.

Roeber F, Jex, AJ, Gasser RB. (2013) Chapter Four - Next-Generation Molecular- Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants: A Turning Point? AdvParasitol. 83: 267-333.

Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L., (2010), Parassitologia e Malattie parassitarie degli Animali, EMSI, Roma, Italy.

Utzinger J, Becker SL, Knopp S, Blum J, Neumayr AL, Keiser J, Hatz CF. (2012) Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. Swiss Med Wkly 142: w13727.

WORKSHOP

Strongilosi gastro-intestinali degli ovini e caprini e le nuove minacce

Gli strongili gastro-intestinali delle pecore: cosa sono, cosa fanno e quanti ne abbiamo

A. SCALA

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari

Parole chiave: ovino, strongili gastro-intestinali, patogenesi, epidemiologia.

INTRODUZIONE - Con il termine Strongili Gastro-Intestinali (SGI) degli ovini vengono solitamente annoverati un gruppo nematodi appartenenti a differenti generi e specie, che vengono normalmente trattati in ambito parassitologico come un'unica entità nosologica a causa della loro comune localizzazione (abomaso e intestino) e di alcune analogie inerenti il ciclo biologico e la morfologia delle loro forme di propagazione, le uova, che nella maggior parte dei casi, risultano indistinguibili morfologicamente nei differenti generi.

Gli SGI causano delle parassitosi diffuse praticamente in ogni gruppo di animali che esercitino il pascolo e rappresentano ancora oggi uno dei più importanti fattori sanitari che limitano significativamente gli introiti derivanti da questo.

I danni da essi arrecati nell'ambito degli allevamenti possono risultare ingenti a causa delle lesioni e delle alterazioni funzionali arrecate ai soggetti colpiti. Questi di solito sono ben conosciuti tra gli addetti ai lavori che richiedono spesso adeguati interventi profilattico-terapeutici per contrastare gli effetti negativi. Ma mentre la sintomatologia, gli aspetti morfologici, profilattico-terapeutici e i danni causati dalle SGI nei piccoli ruminanti sono generalmente ben conosciuti, lo risultano molto meno quelli legati alla patogenicità dei singoli agenti parassitari che vengono annoverati nell'ambito di queste infestioni.

Il motivo di tale situazione è legato anche al fatto che generalmente negli ovini non si riscontrano in natura infestioni monospecifiche, ma il poliparassitismo costituisce la norma e quindi anche i fattori patogenetici di ogni specie elmintica vanno a sovrapporsi e/o influenzare vicendevolmente con quelli di altre specie contemporaneamente presenti, complicando per certi versi il quadro sintomatologico, nonché quello legato al decremento delle produzioni.

Inoltre tali parassitosi risultano spesso ancora più pericolose in quanto decorrendo spesso in modo subclinico non "attirano" in modo evidente l'attenzione dell'allevatore, ma determinano in modo costante delle riduzioni non sottovalutabili delle performances produttive delle greggi interessate.

Appare quindi evidente che tali parassitosi debbano essere costantemente monitorate e nei loro confronti attuate adeguate misure di profilassi ambientale e di chemioprofilassi. Purtroppo tuttavia tale controllo in pratica viene attuato, nell'allevamento estensivo e semi-intensivo dell'ovino, quasi esclusivamente attraverso la somministrazione di antielmintici, che però purtroppo non sempre sortisce gli effetti sperati. Questi infatti vengono talvolta effettuati in modo non razionale, in relazione ai tempi, alle modalità, alla molecola utilizzata, al suo dosaggio ecc..

Tutto questo può determinare tuttavia perdite economiche non trascurabili, in relazione al costo del farmaco, alla manodopera, nonché problemi di residui nei prodotti derivati (carne e latte) e possibile insorgenza di episodi di farmacoresistenza (AR). È evidente quindi che razionali piani di controllo nei confronti degli SGI possano derivare esclusivamente da conoscenze precise sull'eziologia, biologia, epidemiologia e sulle molecole antielmintiche registrate e sulle loro modalità di somministrazione e d'azione. Per cercare di apportare un contributo in tal senso in questa relazione verranno quindi riportati alcuni aspetti inerenti l'eziologia, la patogenicità e alcune note sull'epidemiologia in Italia delle infestioni da SGI.

COSA SONO GLI SGI - Tra gli SGI degli ovini, spesso vengono generalmente annoverati un gruppo di nematodi che della superfamiglia dei Trichostrongyloidae, a cui appartengono soprattutto i generi *Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, ai quali si "aggiungono" anche altri parassiti di altre superfamiglie come nel caso degli Strongyloidea (*Chabertia ovina*; *Oesophagostomum venulosum*; *Oe columbianum*; *Bunostomum trigonocephalum*), dei Rhabditoidea (*Strongyloides papillosus*), dei Trichuroidea (*Trichuris ovis*) e degli Oxyuroidea (*Skrjabinema ovis*). Tutti questi parassiti povrebbero quindi più semplicemente essere indicati, per una maggior correttezza tassonomica, anche come ne-

Tabella 1 - Nematodi abomasali.

Specie	Dimensioni (maschi/ femmine)	Tipo alimentazione	Potere patogeno
Teladorsagia circumcincta	8/14 mm	istofaga	medio-alto
T. trifurcata	8/10 mm	istofaga	medio-alto
Ostertagia ostertagi	8/7 mm	istofaga	medio-alto
Haemonchus contortus	15/30	ematofaga	alto
Trichostrongylus axei	4/8 mm	istofaga-ematofaga	medio-alto

Tabella 2 - Nematodi intestino tenue.

Specie	Dimensioni (maschi/ femmine)	Tipo alimentazione	Potere patogeno
Trichostrongylus colubriformis	4/7,5 mm	chimivora	medio
T. vitrinus	4/7 mm	istofaga	medio
T. capricola	4/7 mm	istofaga	medio
Nematodirus filicollis	10/24 mm	chimivora	medio
N. spathiger	10/24 mm	chimivora	medio
N. battus	11/25 mm	chimivora	medio-alto
Bunostomum trigonocephalum	10/30 mm	ematofaga	medio-alto
Cooperia curticei	4,5/8 mm	chimivora	medio-basso
*Strongyloides papillosus**	max 2 mm	chimivora	medio-basso

* Solo la femmina partenogenetica è parassita.

Tabella 3 - Nematodi intestino crasso.

Specie	Dimensioni (maschi/ femmine)	Tipo alimentazione	Potere patogeno
Chabertia ovina	10/20 mm	istogaga	medio-basso
Oesophagostomum spp.	8/20 mm	istofaga-chimivora	medio
Skrjabinema ovis	3/7 mm	chimivora	basso
Trichuris ovis	4/8 cm	chimivora-ematofaga	medio

matodi gastro-intestinali (NGI). Le dimensioni degli esemplari adulti degli SGI, insieme con la rispettiva gravità del potere patogeneo di ogni specie dei parassiti sopraelencati sono riportati per distretto anatomico parassitato nelle seguenti tabelle (Tabb. 1, 2 e 3).

COSA FANNO GLI SGI - I meccanismi di patogenicità attuati dagli SGI possono essere complessi e spesso anche tra loro interdipendenti. Risulta infatti ormai riduttivo e talvolta anche impreciso considerare esclusivamente il concetto di "spoliazione" parassitaria. È necessario, infatti, sfatare il concetto del parassita dotato di un appetito pantagruelico in grado di "affamare" l'ospite, in quanto nella maggior parte dei casi si instaurano ulteriori meccanismi patogenetici, quali la riduzione dell'ingestione degli alimenti (anoressia), difetti della loro digestione e assorbimento, nonché turbe metaboliche, il tutto attuato grazie a delle azioni traumatiche, chimiche ed immuno-mediate.

Inoltre dobbiamo considerare anche che gli SGI tendono ad interagire con l'ospite, il quale è dotato nei confronti del parassita di una "resistenza", cioè dell'attitudine ereditaria a sviluppare meccanismi che ne limitano lo sviluppo e quindi anche l'azione patogena. Tale resistenza, in quanto ereditaria, può essere peraltro inserita nei piani di selezione genetica dei piccoli ruminanti, ed esercitare la sua influenza a vari livelli del ciclo biologico di questi nematodi, limitando ad esempio il tasso di "installazione" delle larve L3, il tasso e la velocità di sviluppo degli stadi larvali in adulti, il tasso di sopravvivenza degli adulti e la prolificità delle femmine.

A livello abomasale risultano sostanzialmente due i generi parassitari in grado di determinare importanti ripercussioni sulla funzionalità dell'organo e, più in generale, dell'ospite parassitato attraverso meccanismi solo in parte sovrapponibili: *Haemonchus* e *Teladorsagia*.

In particolare il genere *Teladorsagia*, rappresentato soprattutto con la specie *T. circumcincta*, è in grado di determinare allo stadio larvale, importanti alterazioni alla mucosa in funzione dell'insorgenza di lesioni nodulari di 1-2 mm di diametro contenenti le larve (Jubb et al., 1993). Tali noduli tendono, soprattutto in caso di infestioni di una certa entità, a confluire e a determinare l'insorgenza a livello della mucosa del caratteristi aspetto a "cuoio marocchino", e nel caso di infestioni gravi anche necrosi della mucosa (Urquhart et al., 1998).

L'emergenza delle larve dalle ghiandole gastriche verso il lume abomasale (20-30 giorni dopo l'infestione), causa la lisi cellulare del bordo superiore delle ghiandole stesse, stimolando così una rapida divisione cellulare (iperplasia) con successivo ispessimento della mucosa, che si presenta edematosa, così come anche la sottomucosa, con reazioni infiammatorie soprattutto a livello della lamina propria (Cordero del Campillo et al., 1999). La presenza di tali larve determina inoltre una metaplasia mucosa e iperplasia del fondo delle ghiandole che si presentano in prossimità delle larve dilatate e con cellule mucose cuboidali (Jubb et al., 1993).

L'instaurarsi a livello abomasale di tali lesioni comporta importanti modificazioni del pH abomasale conseguente alla diminuita funzionalità delle cellule di rivestimento delle ghiandole che producono acido cloridrico. L'aumento di pH abomasale, che da valori fisiologici di 2 può passare anche a 6-7, determina una diminuzione delle produzione di pepsina ed un aumento del suo precursore il pepsinogeno (Ambrosi, 1995). Si rilevano inoltre anche dei cambiamenti di Differenza del Potenziale Transmurale (DPT), cioè delle alterazioni al potenziale elettrico della parete gastrica che comportano un aumento della concentrazione intraruminale degli ioni HCO_3 che contribuisce all'aumento del pH, già entro 30 minuti dall'infestione (Cordero Del Campillo, 1999).

Le alterazioni del pH abomasale prima descritte sembrerebbero ripercuotersi anche sui rapporti tra diverse specie parassitarie; risulta ormai infatti assodato come la presenza di *T. circumcincta* a livello abomasale possa influenzare il pH anche a livello intestinale, inibendo così lo stabilirsi di infestioni causate da *Trichostrongylus vitrinus* e da *H. contortus*.

Sempre in corso di infestioni da *T. circumcincta* e *T. vitrinus*, sono state inoltre rilevate in giovani ovini turbe alla mineralizzazione dello scheletro, con riduzione dei depositi di calcio e fosforo anche del 35% e fenomeni di osteoporosi (Ambrosi, 1995). Su questa categoria di soggetti infestati naturalmente con i tricostrongilidi menzionati si sviluppa una marcata osteopenia, con alterazioni significative dei livelli di fosfatasi alcalina, del volume osseo che tende a ridursi con alterazioni anche della densitometria (Thamsborg e Hauge, 2001).

Inoltre non bisogna sottovalutare anche la comparsa di una importante componente infiammatoria nel corso di teladorsagiosi nell'ambito della parete abomasale, data in prevalenza da eosinofili, neutrofili, i cui effetti (*burst* ossidativi) causano un notevole danno istologico con ripercussioni negative sulla funzionalità delle cellule epiteliali (Scott et al., 2000).

Sempre in ambito abomasale riscontriamo anche un altro tricostrongilide, *Haemonchus contortus*, dotato di importanti caratteristiche ematofagiche, essendo in grado di sottrarre anche 0,05 ml di sangue al giorno grazie anche alla particolare struttura della sua apertura buccale munita di un denticolo "tagliente" e canalicolato utile a guadagnare i capillari ematici (Jubb et al., 1993; Hoste et al., 1998).

È evidente quindi che ad esempio un ovino con 500 parassiti può subire una salasso giornaliero fino a 25 ml di sangue al giorno!

La femmina di *H. contortus* è molto prolifica, essendo in grado di eliminare anche 10.000 uova al giorno anche per molti mesi a partire dal 25-30 giorno dall'infestione; questo, unito al fatto che il passaggio da uovo-L3 infestante può avvenire in condizioni ideali in pochissimo tempo e determinare importanti inquinamenti ambientali con gravi episodi di malattie (Rodostits et al. 2000). L'attività patogenetica di questo trocostrongilide, oltreché dall'azione meccanica esercitata dal denticolo prima menzionato, avviene grazie anche all'intervento di diverse sostanze chimiche da esso prodotto (prodotti di E/S), alcune delle quali dotate di spiccata attività enzimatica che, attraverso la digestione dei tessuti circostanti al parassita, ne assicurano la sua "alimentazione" (Hoste et al., 1998)

Fra queste sostanze sono annoverate delle proteasi, alcune delle quali possono degradare l'emoglobina, il fibrinogeno e il plasminogeno, facilitando così l'accesso ai vasi sanguigni e interferendo con in processi di coagulazione del sangue (Hoste et al., 1998). Studi sperimentali hanno evidenziato come un fattore emolitico elaborato da *H. contortus*, sia in grado di determinare una volta a contatto con globuli rossi di ovino la loro emolisi nel 70% dei casi circa entro 60 minuti, determinando la comparsa nella loro superficie di microscopiche protrusioni che ne alterano la struttura e morfologia (Fetterer e Rhoads, 1998).

I piccoli ruminanti, andando incontro talvolta ad infestioni importanti nell'arco di poco tempo manifestano una sintomatologia acuta, in cui l'anemia diviene apparente dopo circa 2 settimane ed è caratterizzata da una progressiva e drammatica caduta dell'ematocrito (Urquhart et al., 1998).

A questo punto l'animale può soccombere oppure compensare le perdite ematiche attraverso un incremento notevole dell'attività eritropoietica che può anche triplicare rispetto alla norma, tanto è vero che in soggetti con haemoncosi acuta è possibile riscontrare a

livello delle ossa lunghe un'espansione del midollo osseo dalla sua sede normale verso la dialisi (Urquhart et al., 1998).
Inoltre si è evidenziato come 500-1000 esemplari di *H. contortus* possano nell'ovino causare danni ingenti alle produzioni, soprattutto in presenza di carenze alimentari, mentre con oltre 3000 e 9000 esemplari, rispettivamente in agnelli e in soggetti adulti, si possono registrare alti livelli di mortalità (Jubb et al., 1993).
Tuttavia in questi casi, le riserve di ferro tendono a scemare in quanto nel contempo anche l'introduzione di questo elemento tende a diminuire in virtù del decremento globale dell'introduzione degli alimenti che si verifica a causa degli stessi meccanismi descritti in precedenza per le infestioni da *Teladorsagia* spp..
In caso di haemoncosi, specie nella fase acuta, si viene a determinare inoltre un certo grado di ipoalbuminemia evidenziabile con la comparsa di ascite ed edemi sottocutanei e in particolare dello spazio intermandibolare; rilevabile inoltre una gelatinizzazione dei grassi di deposito (Jubb et al., 1993). A livello abomasale non è infrequente riscontrare dei gradi di iperemia e/o emoraggie a carico delle pliche, con il contenuto delle ingesta nel lume di colore rossastro a causa del materiale ematico presente (Jubb et al., 1993).
Sempre a livello abomasale è possibile riscontrare anche il tricostrongilide *Trichostrongylus axei,* la cui presenza determina solitamente l'insorgenza di lesioni e modificazioni a carico della mucosa gastrica simili a quelle indotte da *Teladorsagia* spp. (aumento pH e perdita di quote plasmatiche) (Urquhart et al., 1998); una differenza importante è comunque data dal fatto che *T. axei* penetra tra le ghiandole, mentre *Teladorsagia* spp. si localizza nel loro lume.
Solitamente è difficile riscontrare in natura delle infestioni monospecifiche e gravi da *T. axei*, in quanto normalmente questo tricostrongilide si riscontra in associazione con gli altri parassiti abomasali.
Tuttavia, qualora l'infestione fosse provocata da un numero elevato di esemplari, si possono notare aumenti delle produzioni di muco con lesioni nodulari che tendono a confluire in placche o in caratteristiche lesioni della mucosa circolare (Urquhart et al., 1998).
Tra gli SGI a localizzazione intestinale vengono annoverati vari generi trichostrongilidi tra i quali i più importanti risultano *Trichostrongylus*, *Nematodirus* e *Cooperia*.
Per ciò che concerne i primi, negli ovi-caprini si riscontrano soprattutto *T. colubriformis*, *T. vitrinus*, *T. capricola* e più raramente *T. lungispicularis*. Questi parassiti tendono a localizzarsi nella parte anteriore del piccolo intestino.
Le larve infestanti una volta ingerite si riscontrano all'interno di *tunnels* al di sopra della lamina basale tra gli enterociti, soprattutto alla base dei villi, dove possono permanere per circa 2 settimane prima di riemergere come parassiti adulti.
Le lesioni sono date perlopiù da un'atrofia dei villi, che si manifesta solitamente dopo una prima fase di iperplasia delle cripte epiteliali che persiste anche in seguito ed infiltrazioni da parte di cellule infiammatorie in prossimità soprattutto della lamina propria. Tali lesioni si rendono macroscopicamente evidenti sotto forma di erosioni della superficie della mucosa quando molti parassiti si concentrano in tali aree. La presenza di queste alterazioni si accompagnano con una significativa diminuzione del corredo enzimatico cellulare del tratto intestinale coinvolto, quali soprattutto la fosfatasi alcalina, pepsosidasi e maltasi.
Questo quadro, oltre a determinare un malassorbimento di varie componenti, comporta una fuga di proteine, elettroliti, che se non compensata da un ulteriore assorbimento nei distretti intestinali a valle si può tradurre in gravi fatti diarroici. A questo bisogna inoltre aggiungere anche ulteriori turbe causate da alterazioni ormonali, quali la iperproduzione di colecistichinina che determina, così come la gastrina, una riduzione dell'introduzione degli alimenti, così come alterazioni al metabolismo del fosforo che possono indurre fenomeni di osteoporosi.
Gli animali quindi che hanno delle importanti infestioni da *Trichostrongylus* spp. a livello intestinale (da 15.000 a 80.000 circa esemplari) vanno incontro a delle forme cliniche importanti, si presentano cachettici e disidratati, con una marcata atrofia dei muscoli scheletrici e diarrea di colore scuro.
I tricostrongilidi del genere *Nematodirus* occupano in generale il primo tratto dell'intestino tenue, e tra questi si annoverano le seguenti principali specie: *N. spathiger*, *N. filicollis*, *N. abnormalis* e N. *battus*. Questi parassiti risultano particolarmente temuti tra i giovani animali, le larve L3 infestanti ingerite si sviluppano tra i villi, preferibilmente a livello della cripte, per svilupparsi poi ad adulti nel lume, in cui i parassiti adulti possono formare delle "colonie" che hanno un aspetto macroscopico simile ai batuffoli di cotone. *Nematodirus* spp. tende a provocare un'atrofia dei villi, anche se solitamente meno grave di quelle provocate da *Trichostrongylus* spp. e da *Strongyloides* spp.. Quando sono presenti inoltre un numero di parassiti superiore a 10.000 si instaura anche una sintomatologia clinica caratterizzata soprattutto da una marcata diarrea. Tale manifestazione si rende particolarmente evidente negli agnelli in relazione anche al fatto che le uova di *Nematodirus* spp., unico caso tra i trichostrogilidi, danno origine al loro interno alla larva L3 infestante e che quindi, anche in condizioni di bassa t°, possono garantire la sopravvivenza delle L3 che possono liberarsi tutte insieme alla fine della stagione invernale, determinando così importanti contaminazioni ambientali. Questo può avvenire anche perché al loro interno contengono una sorta di anticoagulante, il Treh-close che ne garantisce una maggior sopravvivenza proprio nei periodi freddi.
Anche trichostrongilidi del genere *Cooperia* possono parassitare il primo terzo dell'intestino tenue degli ovini in particolare con le specie *C. curticei*, che ha un ciclo di sviluppo e di vita simile a quello di *Nematodirus* spp., così come anche lesioni e patogenesi, per cui anche la sintomatologia è pressoché simile.
Cooperia spp., induce stati patologici in virtù anche di particolari formazioni cuticolari longitudinali che tendono a danneggiare per sfregamento gli enterociti.
Il genere *Cooperia* è definito scarsamente patogeno soprattutto nelle aree temperate, tuttavia in caso di infestioni massive (più di 70.000 esemplari in localizzazione) si possono manifestare fenomeni di inappetenza, perdita di peso e diarrea.
Sempre al livello del tenue, e più precisamente a livello del digiuno e dell'ileo, nell'ovino è possibile riscontrare anche nematodi Strongyloidea della specie *Bunostomum trigonocephalum*. Le larve infestanti di questa specie parassitaria possono penetrare per cutem o per via orale e dopo una lunga prepatenza, almeno 30 giorni, compaiono le prime uova nelle feci, peraltro anche queste indistinguibili morfologicamente da quelle degli altri SGI, ad eccezione di *Nematodirus* spp.. Le larve di *Bunostomum* spp. che si liberano dal guscio, al contrario di quelle di altri bursati, non hanno necessità di alimentarsi all'esterno neanche nei primi stadi di sviluppo, in quanto hanno già immagazzinato le necessarie riserve già nell'uovo, tuttavia hanno la caratteristica di non sopravvivere all'inverno (Boch e Supperer, 1980). Solitamente si tratta di infestioni causate da un numero non elevato di esemplari, tuttavia il potere patogeno di questi parassiti è molto elevato in considerazione della loro marcata azione patogena delle larve L4 di tipo traumatica sulla mucosa enterica con conseguente azione sottrattiva a cui va sommata quella ematofaga esercitata dai parassiti adulti (Casarosa, 1985).
Infine l'ultimo tratto dell'intestino può "albergare" altri due generi di nematodi Strongyloidea: *Chabertia ovina* e *Oesophagostomum* spp.. Sono questi parassiti che presentano un ciclo biologico esogeno molto simile a quello dei nematodi trattati in precedenza, ma che si caratterizzano, una volta guadagnato l'ospite, dal possedere una fase istotropica allo stato larvale più breve per *C. ovis* e normalmente più duratura per *Oesphagostomum* spp., soprattutto in animali già precedentemente venuti a contatto con il parassita. Solitamente tale fase avviene a livello del tenue e successivamente i parassiti adulti si localizzano nel grosso intestino. Le larve incistate possono soprattutto nel caso di *Oesophagostomum* spp. nutrirsi anche di sangue. Le larve di quest'ultimo genere, soprattutto di *Oe. columbianum,* possono vivere dentro il nodulo anche per un 1 anno,

ma di solito sono in questo caso distrutte dalla reazione dell'ospite (*Oe. venulosum* non produce normalmente noduli). Si possono quindi formare dei noduli che possono andare incontro a caseificazione e calcificazione interferendo così con la motilità intestinale, determinando peritoniti localizzate e adesioni o stenosi. Nelle pecore i noduli possono causare anche dolorabilità con atteggiamento di schiena inarcata e andatura impacciata. L'esofagostomosi è la causa primaria di intussuscezione nei giovani ovini. I parassiti adulti invece dilacerano la parete intestinale con le loro corone radiate più o meno sclerificate e inglobano nella capsula buccale brandelli di mucosa per nutrirsi.

È segnalata una persistente e severa diarrea soprattutto nei giovani animali in cui le larve, in particolar modo quelle di *Oe. colombianum*, fuoriescono dal nodulo causando anche di coliti ulcerative; negli adulti le feci possono riscontrarsi semi-solide, soffici con muco e occasionalmente tracciate di sangue. 200 femmine di *Oe. columbianum* sono segno di una grave infestione. Per *C. ovis*, il danno più rilevante è invece causato dalle larve L5 e dai parassiti adulti istofagi, che possono determinare un grave danneggiamento della superficie della mucosa, che si presenta edematosa ed ispessita, sino a comportare non sottovalutabili perdite ematiche e plasmatiche. Infine è necessario ricordare sempre a livello dell'intestino crasso la presenza ulteriori di due nematodi, *Trichuris ovis* e *Skrjabinema ovis*; mentre al primo viene attribuito un certo grado di patogenicità esclusivamente nel caso di gravi infestioni, il secondo viene definito perlopiù apatogeno.

QUANTI NE ABBIAMO? - Parlare di diffusione delle parassitosi sostenute dagli SGI negli ovini nel senso generale del termine potrebbe sembrare quasi inutile, in quanto esse accompagnano costantemente gli animali di questa specie se il pascolo costituisce un fattore presente in allevamento. Ambrosi (1995) riporta infatti un coinvolgimento della totalità o quasi degli allevamenti con almeno il 70-80% dei capi positivi! Tuttavia a seconda delle caratteristiche climatico-ambientali e manageriali (tipo di allevamento e di alimentazione), possono implicare situazioni diverse in grado di favorire o meno l'intensità dell'infestione, la sua composizione in termini di specie parassitarie presenti e in ultima analisi la portata zootecnica-economica del problema in azienda.

Paradossalmente, nonostante quindi la onnipresenza di questa parassitosi negli allevamenti estensivi e semi-intensivi, in Italia dati precisi inerenti la sua epidemiologia risultano purtroppo incompleti e scarsamente aggiornati! I dati rilevati a livello nazionale sull'epidemiologia degli SGI negli ovini ottenuti con un campionamento e una metodologia standardizzata che ha consentito di ricavarne un quadro più o meno indicativo si può desumere dall'esame degli "Atti del Simposio Giasone" presentato in occasione del XIV Congresso SIPAOC del 2000, in cui vengono riportati i risultati di diverse unità operative ottenuti su 245 allevamenti ovini monitorati per un anno. Questa esperienza ha consentito di rilevare una positività del 56% per SGI, del 15% per *S. papillosus*, del 14% per *Nematodirus* spp. e del 2% per *Trichuris* spp., con differenze significative per gli SGI nell'ambito degli allevamenti delle diverse regioni, variando da un minimo del 32% nelle Marche al 94% della Campania. I tassi di prevalenza nei vari prelievi attuati nell'arco dell'anno non si discostavano dalla media di tutti i prelievi, ma se questi tassi venivano stratificati per le dimensione dell'allevamento si rilevava come questi fossero più elevati nelle piccole aziende rispetto alle grosse. Si evidenziarono invece delle variazioni significative del grado di emissione delle uova (upg) tra le regioni, ovviamente in relazione alle evidenti variazioni climatiche, a conferma quindi che delineare quadri validi per grandi aree territoriali è praticamente impossibile. Si può quindi affermare che la varietà dei parametri che possano influire sull'epidemiologia degli SGI negli ovini, imponga per certi versi un'acquisizione mirata di questi quasi per ogni singola realtà/allevamento, attraverso un monitoraggio parassitologico costante, operazione questa purtroppo scarsamente diffusa nei nostri allevamenti.

CONSIDERAZIONI - È evidente quindi come le azioni delle numerose specie che si annoverano genericamente tra gli SGI dei piccoli ruminanti siano quanto mai complesse e variegate e in grado di determinare importanti ripercussioni negative sulla salute e quindi sui livelli produttivi degli animali colpiti. Questo, insieme alla loro elevata diffusione soprattutto negli animali al pascolo, rende questi parassiti particolarmente temibili, imponendone un controllo profilattico-terapeutico praticamente continuo. In questo caso la conoscenza degli eventi fisiopatologici degli SGI rappresenta un fattore indispensabile per comprendere i rapporti ospite-parassita utili per la messa a punto di nuove tecniche diagnostiche e vaccinali, nonché approcci più razionali di tipo terapeutico. Tali conoscenze possono essere inoltre adeguatamente "sfruttate" anche in un'ottica di educazione sanitaria più incisiva da indirizzare agli allevatori come strumento di ulteriore "convinzione" per favorire l'applicazione sul campo delle routinarie misure di profilassi/terapia ottimali, anche per prevenire i temuti e sempre più diffusi fenomeni di AR in questo importante comparto zootecnico nazionale.

Gastro-intestinal strongyles (nematodes) of sheep: who they are, and what they cause

Key words: sheep, gastro-intestinal strongyles, pathogenesis, epidemiology.

Bibliografia

Ambrosi M. (1995), Parassitologia Zootecnica. Edagricole, Bologna.

Boch J., Supperer R. (1980), Parassitologia Clinica Veterinaria, Editrice ESSEGIVI, Piacenza.

Casarosa L. (1985), Parassitologia degli animali domestici. Casa Editrice Ambrosiana. Milano.

Cordero Del Campillo M., Rojo Vasquez F.A., Martinez Fernandez A.R., Sanchez Acedo M.C., Hernandez Rodriguez S., Navarrete Lopez-Cozar I., Diez Banos P., Quiroz Romero H., Carvalho Varela M. (1999), Parasitologia Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana de Espana.

Hoste H., Huby F., Mallet S. (1998), Strongili gastro-intestinali: conseguenze fisiopatologiche e meccanismi patogenetici. Summa: 131-139.

Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (1993), Pathology of domestic animals. Fourth Edition. Vol. 2. Academic Press, Inc. San Diego.

Rodostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff W.W. (2000), Veterinary Medicine, Ninth Edition WB Saunders Company Ltd, London.

Scott I., Khalaf S., Simcock D.C., Knight C.G., Reynolds G.W., Pomroy W.E., Simpson H.V. (2000), A sequential study of the pathology associated with the infection of sheep with adult and larval Ostertagia circumcincta. Vet Parasitol 89(1-2): 79-94.

Thasborg S.M., Hauge E.M. (2001), Osteopenia and reduced serum alkaline phosphatase activity in grazing lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes. Journal Comparative Pathology 125: 192-203.

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. (1998), Parassitologia Veterinaria, UTET, Torino.

Anthelmintic resistance: facing the threat

G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA

Institute for Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universitaet Berlin, Berlin, Germany

Key words: parasitic nematodes, selection, refugium, targeted selective treatment.

Infections with helminth parasites cause the most prevalent, clinically most serious and economically most important of all contagious diseases in small ruminants. Particularly parasitic nematodes like the trichostrongyle species *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* or different *Cooperia* and *Trichostrongylus* species occur ubiquitously worldwide in sheep and goats which have access to pasture. However, in many regions also trematode species like the liverfluke *Fasciola hepatica* and cestodes residing in the gastro-intestinal tract like *Monezia* spp. are highly prevalent. The live cycle of all the above mentioned worms includes the oral uptake of a larval stage of the respective worm species with the grass on pasture, either in the form of free living larval stages (e.g. in trichostrongyles) or within intermediate hosts (e.g. *Monezia* spp.). Accordingly, animals which are housed all year like dairy sheep are usually not affected by clinical disease through worm infections. In all other animals, to maintain animal health and productivity, effective worm control is necessary. This is particularly the case wherever numerous animals are kept together and the intensity of worm infection may increase quickly at the beginning of the grazing season resulting in sometimes fatal infection intensities, namely in young flock which are fully susceptible due to the lack of established resistance to infection. In principle worm control should be based on procedures minimizing the infection intensity (e.g. pasture hygiene and management), parasite monitoring and metaphylactic anthelmintic treatments, that is treatments at time points where the animals have already become infected but have not been negatively affected yet. However, on many if not most farms worm control is exclusively based on anthelmintic treatments. The currently available anthelmintics belong to the following drug classes: macrocyclic lactones (ML), benzimidazoles (BZ), tetrahydropyrimidines, imidazothiazoles and amino-acetonitrile-derivates. The compounds of the drug classes are essentially all active against a broad range of nematode species and the macrocylic lactones furthermore against many arthropod parasites, while the benzimidazoles also affect some flatworm species.

During the past years the effective worm control has been increasingly threatened and in some regions, mostly concerning countries of the Southern hemisphere, even considerably affected by the event of anthelmintic resistance. This is most of all true for trichostrongyle parasites but also *F. hepatica* has developed anthelmintic resistance in several countries. In parasitic nematodes it is well established that the development of AR is a selectional process during which by repeated use of anthemintics genetically resistant individuals survive treatment and through their offspring contribute to an increase in resistant alleles in the respective worm population (Wolstenholme et al. 2004). Concerning the above mentioned drug classes the benzimidazoles are by far most often affected by AR with a prevalence of over 90% of the tested worm populations in some countries (Papadopoulos et al. 2012; Taylor et al. 2009). The imidazothiazoles and tetrahydropyrimidines, which both act on the same drug target (i.e. the nicotinic acetyl-choline receptor), are apparently still effective on most farms, however, again in a UK study 40% of the examined farms were found to have resistant worm populations (Taylor et al. 2009). A very recent study provided data on the situation of AR in France, Greece and Italy on 10 sheep farms per country (Geurden et al. 2014). In this study a faecal egg count reduction (FECR) post treatment (compared with the pre treatment arithmetic mean faecal egg count) of less than 95% was regarded as indicative of resistance, if also the lower limit of the 95% confidence interval was below 90%, while if only one of the two conditions apply AR was suspected. Resistance or suspected resistance was recorded on all 18 farms where the BZ fenbendazole (FBZ) has been tested. Noteworthy on the two Italian farms tested the FECR was always 90% or higher, which was only the case for one other (Greek) farm. Also for the imidazothiazole levamisole (LEV) on all nine tested farms resistance or suspected resistance was encountered. However, the effect of this drug was remarkably higher compared to FBZ since on seven (including all Italian farms) out of the nine farms the FECR was at least 90%. Finally, for both MLs tested, i.e. ivermectin and moxidectin, in all but one (Greek) of the 15 tested farms were highly effective with efficacies ranging between 98-100%. Accordingly, it can be concluded that AR is an immediate threat for European small ruminant farming. Nevertheless, it is also important to point out, that there are considerable difference with respect to the level of AR in different geographical regions and thus farmers and veterinarians should evaluate the current efficacy of the anthelmintics on the individual farm. Only then the use of uneffective drug can be avoided while those drugs still active should be used in an alternating pattern to reduce the process of AR development which is mainly based on highly frequent use of the same drug class.

The diagnosis of AR can be achieved either by in vivo testing, namely by conducting a FECRT, as outlined above. This can be employed for all drug classes and be performed by each veterinarian alone or in collaboration with a laboratory which provides faecal egg counting services. Since this procedure is somewhat labor and time consuming in vitro tests have been developed for some of the parasite species and drug classes. However, these tests are currently only offered by a few parasitological laboratories. Nevertheless, particularly in countries where BZ efficacy is still comparatively high (like in Italy) this diagnostic opportunity can give a meaningful and reliable assessment of the efficacy of BZ drugs in trichostrongyle parasites. Similarly, a molecular test has been developed which is also highly recommendable since it allows an even more precise analysis of BZ-resistance in the same parasites using parasite eggs isolated from pooled faecal samples (Samson-Himmelstjerna et al. 2009).

The event of monepantel as the first marketed member of the amino-acetonitril-derivatives and the first new mode of action drug since the commercialization of the ML in the 1980s provides veterinarians and farmers with an urgently needed additional option for effective worm control in times of increasing spread of resistance against the established drug classes. However, as recent findings from New Zealand demonstrate, AR can develop rather quickly also against this drug class (Scott et al. 2014). Accordingly, approaches for a sustainable worm control are required and have been studied upon during the past years. A key factor in this context is the so called ***refugium***, which describes that part of the worm population

which is not under selectional pressure and can for example be represented by the free living larval stages of trichostrongyles on pasture. A large refugium is considered to reduce the AR selection process, since the offspring of resistant treatment survivors are effectively diluted by large numbers of unselected/susceptible larvae on pasture. Accordingly, refugium will be small in times of draught when most larvae on pasture die and this correlates with high prevalences of AR in regions with sever draught like in parts of Australia. Refugium is maintained also when not all animals in a flock receive anthelmintic treatment or if treatment frequencies are reduced and thus targeted (and/or) selective treatment approaches (TST) are recommended (Cringoli et al. 2009; Kenyon et al. 2013).

References

Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Mezzino L., Vercruysse J., Jackson F. (2009), Evaluation of targeted selective treatments in sheep in Italy: effects on faecal worm egg count and milk production in four case studies. Veterinary Parasitology 164:36-43.

Geurden T., Hoste H., Jacquiet P., Traversa D., Sotiraki S, Frangipane di Regalbono A., Tzanidakis N., Kostopoulou D., Gaillac C., Privat S., Giangaspero A., Zanardello C., Noé L., Vanimisetti B., Bartram D. (2014), Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. Veterinary Parasitology 201:59-66.

Kenyon F., McBean D., Greer A.W., Burgess C.G., Morrison A.A., Bartley D.J., Bartley Y., Devin L., Nath M., Jackson F. (2013), A comparative study of the effects of four treatment regimes on ivermectin efficacy, body weight and pasture contamination in lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes in Scotland. International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance 3:77-84.

Papadopoulos E., Gallidis E., Ptochos S. (2012), Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. Veterinary Parasitology 189:85-8.

Samson-Himmelstjerna G. von, Walsh T.K., Donnan A.A., Carrière S., Jackson F., Skuce P.J., Rohn K., Wolstenholme A.J. (2009), Molecular detection of benzimidazole resistance in Haemonchus contortus using real-time PCR and pyrosequencing. Parasitology 136,349-58.

Taylor M.A., Learmount J., Lunn E., Morgan C., Craig B.H. (2009), Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. Small Ruminant Research 86:67–70.

Scott I., Pomroy W.E., Kenyon P.R., Smith G., Adlington B., Moss A. (2013), Lack of efficacy of monepantel against Teladorsagia circumcincta and Trichostrongylus colubriformis. Veterinary Parasitology 198:166-71.

Wolstenholme A.J., Fairweather I., Prichard R., Samson-Himmelstjerna G. von, Sangster N.C. (2004), Drug resistance in veterinary helminths. Trends in Parasitology 20:469-76.

La farmaco-resistenza in Italia: quale realtà?

D. TRAVERSA

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo

Parole chiave: ovini, strongili, farmacoresistenza, Italia.

Gli strongili gastrointestinali (SGI) (Nematoda, Strongylida) sono attualmente considerati i più importanti parassiti degli ovini sia per la loro diffusione cosmopolita sia per il loro impatto sanitario ed economico (Fleming *et al.*, 2006). La salute ed il benessere degli animali risentono notevolmente delle infestazioni da SGI, i quali causano notevoli perdite economiche per gli allevatori. Negli allevamenti coinvolti si possono osservare casi di mortalità, ma soprattutto riduzione delle *performance* produttive, quali un minore incremento ponderale nei soggetti in accrescimento, una ridotta produzione lattea, una perdita quali-quantitativa della lana ed una riduzione di fertilità dei riproduttori. Il controllo degli SGI si basa sull'utilizzo di molecole antielmintiche appartenenti soprattutto a tre classi: (pro)-benzimidazolici, imidazoli-tetraidropirimidine e avermectine-milbemicine. L'utilizzo eccessivo ed improprio degli antiparassitari ha causato, a partire dagli anni '90, la comparsa del fenomeno dell'antielmintico-resistenza (AR) in questi nematodi. Attualmente, la resistenza ai farmaci antielmintici è diffusa a livello mondiale e sta assumendo importanza sempre crescente anche alla luce della possibilità che l'elmintofauna presente negli allevamenti di pecore possa sviluppare una resistenza multipla alle molecole antiparassitarie (MDR, "*multidrug resistance*"). Ad esempio, in Europa, il fenomeno dell'AR ai benzomidazolici (BZs) è stato ampiamente descritto nel Regno Unito, in Grecia, in Norvegia, in Francia e in Spagna (Chartier *et al.*, 1998; Papadopoulos *et al.*, 2012; Domke *et al.*, 2012; McMahon *et al.*, 2013: Martinez-Valladares *et al.*, 2013). Sono stati segnalati casi di resistenza anche al levamisolo (LEV) e all'ivermectina (IVM) in Norvegia, in Grecia, in Spagna e nel Regno Unito (Domke *et al.*, 2012; Papadopoulos *et al.*, 2012; Martinez-Valladares *et al.*, 2013, McMahon *et al.*, 2013) e, recentemente, alla moxidectina (MOX) nel Regno Unito (Sargison *et al.*, 2010).

Sebbene sia chiara l'importanza del fenomeno dell'AR nel controllo degli SGI dei ruminanti, esistono numerose problematiche ancora poco chiare, come ad esempio quali specie di strongili siano maggiormente coinvolte, e quale sia l'entità della MDR nelle zone europee in cui l'allevamento ovino è particolarmente sviluppato ed importante, come l'Italia. Infatti, le strongilosi gastrointestinali sono causate solitamente dalla contemporanea presenza di parassiti appartenenti a più generi e specie. Differenti studi effettuati in Europa hanno dimostrato come *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Haemonchus* spp. siano gli strongili maggiormente resistenti ai trattamenti antiparassitari (Sargison *et al.*, 2010; Chartier *et al.*, 1998; Papadopoulos *et al.*, 2012).

In Italia gli studi effettuati per valutare la diffusione del fenomeno dell'AR sono pochi. Una ricerca condotta nel 2007 nella regione Lazio ha avuto lo scopo di valutare l'efficacia di febantel (FB), LEV, IVM e MOX nel controllo degli SGI ovini. L'indagine ha riguardato 150 pecore distribuite in 3 diversi allevamenti i cui animali presentavano un'emissione di uova per grammo di feci (UPG) pari o superiore a 150, valutata mediante l'esecuzione di un esame copromicroscopico quantitativo mediante tecnica di McMaster. In questo studio gli animali sono stati allocati in 5 gruppi (4 di trattamento con le molecole precedentemente citate ed uno di controllo) e trattati in base al gruppo di appartenenza. Per tutti i soggetti l'esame copromicroscopico delle feci è stato ripetuto 14 giorni dopo il trattamento al fine di valutarne l'efficacia mediante il "*Fecal Egg Count Reduction Test*" (FECRT) espressa in termini percentuali, mentre le medie di UPG degli animali di ciascun gruppo di trattamento sono state comparate con quelle del gruppo di controllo in tutte le aziende (Coles *et al.*, 1992, 2006). La presenza di una percentuale di riduzione (R) <95% è stata considerata indice di resistenza. I risultati dello studio hanno evidenziato resistenza al LEV (R=89%) in tutti gli allevamenti esaminati e all'IVM (R=93%) in due aziende, mentre per FB (R=96%) e MOX (R=100%) è stata dimostrata efficacia. Tutti i campioni risultati positivi dopo il trattamento sono stati inoltre utilizzati per allestire delle coprocolture e per identificare i nematodi presenti dopo il trattamento antiparassitario. Gli animali trattati con LEV ed IVM sono risultati positivi per larve di *Teladorsagia* (*Ostertagia*) *circumcincta* e *Trichostrongylus* spp. in tutte e tre le aziende, mentre le colture allestite a partire dai campioni fecali di ovini trattati con febantel sono risultate positive per *T.* (*O.*) *circumcincta* in un singolo allevamento. I risultati di questo studio hanno pertanto permesso di evidenziare per la prima volta la presenza di riduzione dell'efficacia di alcuni antielmintici nei confronti di popolazioni di *T.* (*O.*) *circumcincta* e *Trichostrongylus* spp. presenti in Italia (Traversa *et al.*, 2007). Poiché il *management* delle aziende investigate appariva corretto, è stato ipotizzato che la resistenza riscontrata in queste aziende sia stata acquisita attraverso la movimentazione degli animali tra le diverse aziende oggetto di studio, situate in un'area geografica ristretta, nonché attraverso l'introduzione di nuovi soggetti provenienti da altre aziende della stessa regione.

In uno studio più recente, condotto nel 2011, è stata valuta l'efficacia di 4 formulazioni orali comunemente utilizzate in allevamenti ovini italiani potenzialmente esposti al rischio di sviluppare fenomeni di AR (Geurden *et al.*, 2014). Dieci aziende agricole sono state selezionate nei comuni di Cosenza, Catanzaro, Padova, Isernia e Foggia, al fine di valutare la situazione epidemiologica del Nord, del Centro e del Sud della penisola. L'escrezione delle uova negli animali presenti in azienda è stata valutata con una tecnica di McMaster modificata con sensibilità di 50 UPG. L'identificazione delle larve è stata eseguita, come descritto in precedenza, prima e dopo il trattamento antiparassitario. Prima della raccolta dei campioni individuali di feci dagli animali allocati nello studio e dell'esecuzione del FECRT, *pool* fecali sono stati esaminati a cadenza bisettimanale per conoscere lo *status* parassitario degli animali nelle singole aziende oggetto di studio. Ciascun *pool* era costituito da tre singole defecazioni provenienti da altrettanti animali. Il gregge è stato arruolato nello studio se il valore della FEC del *pool* era >200 UPG. In particolare, per avere 50 animali positivi sui quali eseguire il trattamento, da ogni azienda agricola sono stati selezionati almeno 100 animali sani, di età superiore ai tre mesi, che utilizzassero lo stesso pascolo. Successivamente sono stati raccolti ed analizzati campioni di feci individuali da ciascun animale appartenente al gregge. In caso di aziende con un numero maggiore di soggetti positivi, sono stati arruolati i 50 soggetti con i valori di UPG più elevati. Oltre ad un gruppo di animali controllo (non trattato), nello studio sono stati inclusi 4 gruppi di trattamento con altrettante molecole antielmintiche disponibili in commercio: MOX (Cydectin® 0.1% solu-

zione orale, Zoetis, 0.2 mg/kg), IVM (Oramec®, Merial, 0.2 mg/kg), LEV (Toloxan®, A.T.I. Azienda Terapeutica Veterinaria S.r.l.) e un benzimidazolico BZ), il fenbendazolo (FBZ) (Panacur®, MSD Animal Health, 5 mg/kg).

Il primo dato raccolto è stato quello relativo al calcolo della media aritmetica della percentuale di riduzione della FEC per uova di strongili nel gruppo di controllo, sulla base dei dati di FEC ottenuti al giorno +14. La presenza di fenomeni di AR nei gruppi di trattamento è stata valutata secondo i criteri descritti da Coles *et al.* (1992, 2006). In particolare la presenza di AR è stata confermata quando 1) la percentuale di riduzione della conta fecale era < 95% e 2) l'intervallo di confidenza (CI) del 95% era inferiore al 90%. La presenza di AR è stata considerata sospetta (SAR) quando solo uno dei due fattori citati è stato riscontrato. La media aritmetica della FEC nel gruppo di controllo al giorno +14 post-trattamento è risultata essere compresa tra 95 e 1380 UPG nelle 10 aziende incluse nello studio, e solo due delle aziende considerate presentavano valori medi di UPG < 200 (95 e 170 UPG). Gli strongili maggiormente presenti nelle coprocolture ottenute dai *pool* di feci degli animali prima del trattamento e nel gruppo di controllo al giorno +14, sono risultati *Teladorsagia* spp*e* e *Oesophagostomum/Chabertia* spp., seguiti da *Haemonchus* spp. e, in un numero limitato di aziende, da *Cooperia* spp. e *Bunostomum* spp.

Per quanto riguarda l'efficacia delle molecole utilizzate nello studio, il LEV si è dimostrato efficace in 6 aziende, con valori di efficacia del 97-100%. Per quanto riguarda le restanti 4 aziende l'efficacia è risultata essere superiore al 90% circa, con un CI del 95% inferiore al 90%. In queste aziende, *Teladorsagia* spp. è risultato essere lo strongilo maggiormente diffuso, con valori di infestazione del 90-100% rispetto alle larve identificate nei gruppi di controllo e nei gruppi pre-trattamento. *Oesophagostomum/Chabertia* spp. non è stata riscontrata in nessun caso dopo il trattamento.

L'efficacia del FBZ è risultata del 98-100% in 8 delle 10 aziende. In un'azienda è stata riscontrata un'efficacia > 95% per valori di CI del 95% inferiori al 90%, pertanto indicativi di SAR. Inoltre, in una delle aziende l'efficacia è risultata del < 95% per valori di CI del 95% inferiori al 90% dimostrando, di fatto, la presenza di AR. A seguito del trattamento con FBZ, nell'azienda IT06 la coprocoltura non ha originato alcuna larva, mentre solo il genere *Teladorsagia* spp. è stato riscontrato nell'azienda IT10. A seguito dello stesso trattamento, non sono state riscontrate larve di *Oesophagostomum/Chabertia* spp. e di *Haemonchus* spp. in nessuna delle coprocolture allestite, nonostante questi strongili fossero presenti in numero elevato prima del trattamento antielmintico. MOX e IVM si sono dimostrate pienamente efficaci.

I risultati evidenziano fenomeni di AR e/o SAR nei confronti di LEV e FBZ in 4 e 2 aziende ripsettivamente. È interessante notare che due aziende hanno presentato MDR verso BZs e LEV, sebbene in una di queste (IT10) si sia trattato di una combinazione di SAR (BZ) e di AR (LEV). Il presente lavoro ha dimostrato che fenomeni di AR nei confronti dei BZs e del LEV sono presenti nelle pecore in Italia e che l'efficacia della MOX e dell'IVM è ancora conservata nelle aziende selezionate per lo studio. Data la diffusione dell'AR in molti Paesi, soprattutto nei confronti di (pro-)BZs e LEV, è necessario un uso più consapevole delle classi di antielmintici disponibili nelle pecore. L'utilizzo dei soli trattamenti farmacologici per il controllo delle parassitosi negli ovini, negli ultimi decenni, ha contribuito in modo significativo allo sviluppo di fenomeni di AR. Poiché l'AR è un problema ormai riconosciuto a livello mondiale dalla comunità scientifica, e dato che un'inversione di tendenza di questo fenomeno non sembra al momento possibile, dovrebbero essere studiate e messe in atto strategie alternative per limitarne la diffusione.

Anthelmintic resistance: what is reality?

Key words: sheep, strongyles, anthelmintic resistance, Italy.

Bibliografia

Chartier C., Pors I., Hubert J., Rocheteau D., Benoit C., Bernard N. (1998), Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. Small Ruminant Research 29:33-41.

Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992), World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology 44:35-44.

Domke A.V., Chartier C., Gjerde B., Höglund J., Leine N., Vatn S., Stuen S. (2012), Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. Parasitology Research 111:185-93.

Fleming S.A., Craig T., Kaplan R.M., Miller J.E., Navarre C., Rings M. (2006), Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. Journal of Veterinary Internal Medicine 20:435-444.

Geurden T., Hoste H, Jacquiet P., Traversa D., Sotiraki S., Frangipane di Regalbono A., Tzanidakis N., Kostopoulou D., Gaillac C., Privat S., Giangaspero A., Zanardello C., Noé L., Vanimisetti B., Bartram D. (2014), Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. Veterinary Parasitology 201:59-66.

Martínez-Valladares M., Martínez-Pérez J.M., Robles-Pérez D., Cordero-Pérez C., Famularo M.R., Fernández-Pato N., Castañón-Ordóñez L., Rojo-Vázquez F.A. (2013), The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. Veterinary Parasitology 191:177-81.

McMahon C., Bartley D.J., Edgar H.W.J., Ellison S.E., Barley J.P., Malone F.E., Hanna R.E.B., Brennan G.P., Fairweather I. (2013), Anthelmintic resistance in Northern Ireland (I): Prevalence of resistance in ovine gastrointestinal nematodes, as determined through faecal egg count reduction testing. Veterinary Parasitology 195:122-30.

Papadopoulos E., Gallidis E., Ptochos S. (2012), Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. Veterinary Parasitology 189:85-8.

Sargison N.D., Scott P.R., Wilson D.J., Macrae A.I., Penny C.D. (2010), Teladorsagia circumcincta resistance to moxidectin and multiple anthelmintic groups in ewes following use of the persistent drug before lambing. Veterinary Record 167:523-27.

Traversa D., Paoletti B., Otranto D., Miller J. (2007), First report of multiple drug resistance in trichostrongyles affecting sheep under field conditions in Italy. Parasitology Research 101:1713-16.

Strongilosi gastrointestinali degli ovini: impatto economico e strategie di controllo

G. CRINGOLI, A. BOSCO, L. RINALDI

[1] Unità di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Regione Campania
[2] Centro Interdipartimentale di Ricerca in Parassitologia - CIRPAR

Parole chiave: strongili gastrointestinali, ovini, strategie di controllo.

INTRODUZIONE - Il gruppo degli "strongili gastrointestinali (SGI)" comprende diversi generi di elminti, ampiamente diffusi nei piccoli ruminanti al pascolo e responsabili di notevoli perdite produttive ed economiche (Cringoli *et al.* 2007, Rinaldi *et al.* 2007). In Italia, il controllo delle infezioni da SGI negli allevamenti ovini si basa quasi esclusivamente sulla somministrazione di farmaci antielmintici che, tradizionalmente, vengono somministrati in vari periodi dell'anno a tutti gli animali in un gregge.
Diverse prove controllate di campo condotte nel sud Italia hanno dimostrato che una strategia basata su due trattamenti all'anno (*Targeted Treatments* - TT) nel periodo del peri-parto e durante la lattazione ha migliorato la produzione di latte (dal 4% al 44%) in ovini naturalmente parassitati da SGI (Cringoli *et al*., 2007, 2008).
In vista di una possibile insorgenza di antelmintico resistenza, fenomeno molto diffuso nei ruminanti al pascolo di diversi Paesi del mondo, un potenziale problema associato al trattamento dell'intero gregge (TT) è dato dal fatto di non preservare una popolazione di elminti *in refugia*.
Per questo motivo sono stati introdotti i *Targeted Selective Treatments* (TST) dove solo i soggetti che necessitano del trattamento (individuati in base ad indicatori parassitologici/patofisiologici/produttivi) vengono trattati (Cringoli *et al.* 2009; Kenyon *et al.,* 2009).
Di seguito si riportano i risultati sulla l'efficacia produttiva di una recente prova su protocolli di trattamento antielmintico basati su strategie TT e TST.
MATERIALI E METODI - Nel periodo novembre 2011-agosto 2013, sono state condotte 3 prove controllate di campo in altrettanti allevamenti ovini della regione Campania (all. 1, 2, 3), naturalmente parassitati da SGI.
Nell'allevamento 1, la prova è stata finalizzata a valutare il beneficio dei TT sulla produzione di latte e sull'incremento ponderale degli agnelli. Lo schema TT si è basato su due trattamenti effettuati in relazione al parto; il primo è stato effettuato nel periodo del peri-parto, il secondo durante la lattazione. Per la prova sono stati selezionati 60 ovini suddivisi in tre gruppi omogenei (20 animali ciascuno): gruppo MOX (moxidectina al primo trattamento e albendazolo al secondo), gruppo NET (netobimin al primo trattamento e albendazolo al secondo) e gruppo controllo non trattato. I 60 animali sono stati controllati mensilmente coprologicamente ed è stata registrata la produzione di latte ogni 2 settimane per l'intero periodo della lattazione; inoltre, è stato valutato il peso degli agnelli, nati dalle pecore dei tre gruppi, una volta a settimana fino allo svezzamento.
Negli allevamenti 2 e 3 sono stati applicati schemi di TST, anche qui con un primo trattamento nel periodo del peri-parto ed un secondo durante la lattazione, utilizzando i seguenti indicatori:
Allevamento 2: carica parassitaria (*faecal egg count* FEC) (confrontando gli schemi TST e TT;
Allevamento 3: FEC e produzione di latte.
Nell'allevamento 2, sono stati selezionati 60 ovini suddivisi in 3 gruppi omogenei di 20 animali ciascuno, assegnati *at random* ai seguenti gruppi: gruppo TST-FEC (trattando solo 1/3 degli animali, con uova per grammo di feci (UPG) sopra la media del gruppo), gruppo TT (tutti gli animali del gruppo sono stati trattati) e il gruppo controllo (non trattato).
Nell'allevamento 3, sono stati selezionati 60 ovini suddivisi in 3 gruppi omogenei di 20 animali ciascuno, assegnati *at random* ai seguenti gruppi: gruppo TST-FEC (solo 1/3 degli animali con UPG sopra la media del gruppo sono stati trattati), gruppo TST-LATTE (solo 1/3 degli animali con produzione di latte superiore alla media del gruppo sono stati trattati) e gruppo controllo.
In tutti gli allevamenti, per ciascun animale sperimentale è stata effettuata la FEC mediante FLOTAC (Cringoli *et al.,* 2010) mensilmente e la produzione di latte è stata valutata ogni 2 settimane.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Da segnalare che nei 3 allevamenti oggetto, oltre agli SGI, sono state riscontrate anche alte cariche di *Dicrocoelium dendriticum*.
Nel primo allevamento i risultati hanno mostrato un significativo aumento della produzione di latte nel gruppo MOX (+40%) e nel gruppo NET (+38%) rispetto al gruppo controllo e un aumento dell'incremento ponderale degli agnelli partoriti dalle pecore appartenenti ai gruppi MOX (+ 25%) e NET (18%) rispetto a quelli del gruppo controllo. Inoltre, le cariche parassitarie degli SGI, nei due gruppi trattati, sono state basse durante il corso della prova rispetto al gruppo controllo.
Nel secondo allevamento, le medie UPG nei gruppi TT e TST sono risultate più basse rispetto al gruppo controllo. Inoltre, si è registrato un aumento significativo della produzione di latte nel gruppo TT (+42,3%) rispetto al gruppo controllo, mentre nel gruppo TST l'aumento della produzione di latte (+16,1%) non è risultato significativo.
Nel terzo allevamento, non sono state riscontrate differenze significative tra le medie delle UPG degli SGI dei due gruppi TST e il gruppo controllo durante il corso dello studio. Inoltre, la differenza della produzione di latte fra i gruppi TST ed il gruppo controllo non è risultata statisticamente significativa, anche se c'è stato un lieve aumento di produzione di latte come di seguito: gruppo TST-FEC (+11,3%), gruppo TST-LATTE (+6,8%).
L'aumento della produzione di latte, dell'incremento ponderale degli agnelli e la riduzione della carica degli SGI degli animali trattati forniscono una chiara evidenza che lo schema TT migliora le *performance* produttive degli animali e riduce la contaminazione degli SGI sui pascoli.

Evaluation of selective treatments (tt/tst) in sheep naturally infected with gastrointestinal strongyles

Key words: TT/TST, sheep, gastrointestinal strongyles.

Bibliografia

Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J. (2010), FLOTAC: new multivalent technique for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. Nat Prot 5: 503-515.

Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Mezzino L, Vercruysse J, Jackson F. (2009), Evaluation of targeted selective treatments in sheep in Italy: effects on faecal worm egg count and milk production in four case studies. Vet Parasitol. 164 (1): 36-43.

Cringoli G, Veneziano V, Jackson F, Vercruysse J, Greer AW, Fedele V, Mezzino L, Rinaldi L. (2008), Effects of strategic anthelmintic treatments on the milk production of dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. Veterinary Parasitology 156 (3-4): 340-45.

Cringoli G, Veneziano V, Pennacchio S, Mezzino L, Santaniello M, Schioppi M, Fedele V, Rinaldi L. (2007), Economic efficacy of anthelmintic treatments in dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. Parassitologia 49: 201-207.

Kenyon F, Greer AW, Coles GC, Cringoli G, Papadopoulos E, Cabaret J, Berrag B, Varady M, Van Wyk JA, Thomas E, Vercruysse J, Jackson F. (2009), The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. Vet Parasitol 164 (1): 3-11.

Rinaldi L, Veneziano V, Cringoli G. 2007, Dairy goat production and the importance of gastrointestinal strongyle parasitism.Transaction of the Royal Society of Tropical Medical Hygiene 101: 745-746.

Approccio integrato Zoetis al controllo delle parassitosi ovine, per un impiego razionale del farmaco

V. SALAMINA, L. MIOTTO, F. TONI

Zoetis Italia

Parole chiave: ovini, parassiti, diagnosi, trattamento antiparassitario.

INTRODUZIONE - Nella pratica aziendale dell'allevamento ovino, e, in particolare, nella gestione sanitaria ed economica della pecora da latte, i trattamenti antiparassitari rivestono un ruolo di primaria importanza.
La pluralità dei principi attivi e delle formulazioni presenti sul mercato richiede un'attenta selezione che consenta di ottenere il miglior risultato possibile per l'economia dell'allevamento e la salute degli animali.
In quest'ottica, Zoetis si impegna a promuovere un impiego razionale del farmaco antiparassitario fornendo assistenza nella gestione delle parassitosi nell'allevamento ovino.
DIAGNOSI - L'approccio integrato alle parassitosi si basa innanzitutto su una corretta diagnosi.
Nella pratica sono davvero rari i casi in cui è effettuata una diagnosi copromicroscopica prima di predisporre uno schema di trattamento. Spesso, infatti, per compensare le mancanze di carattere diagnostico, la scelta di un antiparassitario si indirizza verso molecole con ampio spettro d'azione.
Il campione di feci, eseguito attraverso tecniche diagnostiche sempre più sensibili - ne è un esempio, la tecnica FLOTAC (Cringoli et al., 2009) - consente di ottenere informazioni di carattere qualiquantitativo di notevole importanza per la scelta del farmaco più idoneo da impiegare per il trattamento.
Un altro aspetto da prendere in considerazione è la verifica dell'efficacia del trattamento antiparassitario. È sufficiente campionare nuovamente il gregge a distanza di 14-20 giorni per valutare la correttezza ed efficacia dell'intervento effettuato.
Il referto dell'esame copromicroscopico costituisce, pertanto, un importante e imprescindibile documento, e la base di partenza per gli interventi antiparassitari, i quali, tuttavia, si giustificano soltanto se inseriti all'interno di un programma integrato di controllo delle parassitosi.
TRATTAMENTI - In allevamento, la frequente contemporanea presenza di animali a diverso stadio produttivo (le rimonte, le pecore in asciutta e le pecore in lattazione), impone una gestione più accurata dei trattamenti.
Questa condizione consente, per esempio, l'impiego di molecole con meccanismi di azione diversi, permettendo così anche un *turnover* di gruppi antiparassitari, applicando la cosiddetta 'rotazione delle molecole'.
Nel gregge, la presenza di soggetti a stadi fisiologici diversi, permette inoltre di sfruttare al meglio le potenzialità delle molecole antiparassitarie. Un esempio in questo senso, è fornito dalla moxidectina (Moxidectin® in formulazione orale), lattone macrociclico da impiegare in prossimità del parto, in quanto in grado di controllare il fenomeno del *peri-parturient rise* (Taylor et al., 1997), e, pertanto, incidere positivamente sulla produzione di latte (Cringoli et al., 2009.), l'incremento ponderale degli agnelli e, in generale, un miglioramento delle *performance* degli animali.
Questa situazione di "gregge nel gregge" ci permette di programmare i trattamenti antiparassitari anche temporalmente, ad esempio nei mesi più freddi quando si registra una maggiore produzione di uova da parte di *Dicrocoelium dendriticum,* oppure nei mesi estivi per il controllo di *Oestrus ovis.*
CONCLUSIONI - Il controllo delle parassitosi nell'allevamento della pecora da latte richiede una strategia solo apparentemente semplice. Le buone pratiche per la corretta gestione delle parassitosi possono sintetizzarsi nel seguente decalogo, semplici "regole", ma assolutamente propedeutiche per il successo terapeutico:

1) Eseguire un corretto esame copro-microscopico;
2) Scegliere il farmaco di elezione sulla base delle specie di parassiti identificati;
3) Far digiunare gli animali per un breve periodo, prima del trattamento;
4) Assicurarsi che il farmaco non sia scaduto, alterato nel colore e nella composizione;
5) Stimare correttamente il peso degli animali, in modo da somministrare la dose adeguata, scegliendo, come riferimento, l'animale più pesante;
6) Agitare con una certa frequenza le confezioni dei farmaci in sospensione;
7) Tarare accuratamente i dosatori per le somministrazioni orali;
8) Somministrare con cura il farmaco;
9) Rispettare i tempi di sospensione del farmaco;
10) Effettuare un controllo coprologico 14-20 giorni dopo il trattamento.

Integrated zoetis approach to the control of ovine parasites

Key words: ovine, parasites, diagnosis, antiparasitic treatment.

Bibliografia

Cringoli G., Veneziano V., Mezzino L., Morgoglione M., Pennacchio S., Rinaldi L., and Salamina V. (2009), The effect of moxidectin 0,1% vs ivermectin 0,08% on milk production in sheep naturally infected by gastrointestinal nematodes. BMC Vet Res. 5: 41.

Taylor J., Kenny B.A., Fimls H.W., Edgar HND, Ferguson E. (1997), Efficacy of moxidectin, ivermectin and albendazole oral drenches for suppression of periparturient rise in ewe worm egg output and reduction of anthelmintic treatment for lambs. Vet. Rec. 141:357-360.

WORKSHOP

Monitoraggio del benessere nelle aziende ovine e caprine

EU strategy on animal welfare: the role of EFSA

O. RIBÓ

Feed Unit, Scientific Evaluation of Regulated Products (REPRO) Department, European Food Safety Authority, Parma, Italy

Key words: EFSA, animal welfare, food safety, risk assessment.

Introduction and mission of EFSA - The main mission of the European Food Safety Authority (EFSA) is to provide scientific and technical advice for the future community legislation and policies in all fields which have a direct or indirect impact on food and feed safety, including animal health and welfare, plant health and nutrition in general (EC, 2002). Regulation 178/2002 also establishes that EFSA should provide comprehensive independent scientific view of the safety and other aspects of the whole food and feed supply chains. EFSA provides objective and independent science-based advice on all matters within its remit and shall also provide independent information on all matters and communicate on risks.

EFSA can be requested by the different European Commission services, but also by the European Parliament, EU Members States or by EFSA itself as a self-mandate to provide a scientific assessment following, whenever possible, a risk assessment (RA) approach. This is in line with the sanitary and phytosanitary (SPS) agreement of the World Trade Organisation (WTO, 1995), which establishes that SPS measures should be based on a RA approach taking into account all available scientific evidence.

When EFSA receives a request to provide scientific advice a working group is set up. The working group is composed by experts on the specific issue and a risk assessor in charge of defining the risk pathways and the RA methodology. Through different meetings, the working group collects all available scientific data and information on the issue, performs the RA when pertinent and possible, and draft conclusions and recommendations. The process results in a draft scientific opinion, which is finally discussed, reviewed and adopted by a permanent Panel of experts. In agreement with EFSA's policy on transparency, all scientific documents are published in the EFSA's web site (www.efsa.europa.eu).

EFSA's Animal Health and Animal Welfare (AHAW) Panel provides specific advice on risk factors related to animal diseases and welfare, mainly of food producing animals, including fish. Possible interactions and implications for animal health and food safety are considered when relevant, in the animal welfare scientific opinions, involving other areas of expertise such as biohazards, contaminants or plant health. Animal welfare aspects are also considered in the scientific opinions on animal health (e.g. AI, FMD). The final aim of the scientific assessments on animal welfare is to support animal welfare EU legislation based on available scientific evidence. Many examples illustrate how EFSA's scientific opinions are considered when legislative measures are proposed by the European Commission.

The objective of this paper is to review the work done by the Animal Health and Animal Welfare Panel of EFSA on the provision of scientific advice on the welfare aspects of food producing animals, the interaction between animal welfare, animal disease and food safety and the impact of these scientific assessments on the EU regulatory framework.

EU animal welfare framework - The EU strategy for protection and welfare of animals 2012-2015 (EC, 2012), proposes action lines and initiatives for the next four years considering the scientific advances and the lessons learned through the previous Action Plan 2006-2010 (EC, 2006). The new strategy is based on two complementary approaches: a proposal for a comprehensive animal welfare law and the reinforcement of current actions.

1. Simplified legal framework for animal welfare. It would consider:

a) The use of scientific outcome-based animal welfare indicators as a mean to simplify the legal framework (introduced in Directive 2007/43 on the protection of chickens kept for meat production and Regulation 1099/2009 on the protection of animals at the time of killing). The criteria developed by the Welfare Quality® project and the EFSA opinions on animal-based welfare indicators shall be taken into account.
b) To increase transparency and adequacy of information on animal welfare to consumers for their purchase choice,
c) Establishment of a European network of reference centres, to ensure coherent and uniform technical information on the implementation of the EU legislation. Its role should complement and not duplicate the role of EFSA and the activity of the Joint Research Centre of the EU. The network shall support with technical expertise, training courses, dissemination of research findings and technical innovations and coordination of research.
b) Creation of common requirements for competence of personnel handling animals to ensure their ability to identify, prevent or limit animals' pain, suffering and distress.

2. Reinforcement of Commission current actions:

a) Develop tools to strengthen Member States' compliance: FVO inspections, education strategy, training of veterinary inspectors, advising competent authorities and development of guidelines for the implementation of EU legislation.
b) Support international cooperation: include animal welfare in bilateral trade agreements, collaboration with FAO and OIE, organization of international events to promote animal welfare, etc.
c) Provide consumers and public with appropriate information to raise awareness.
d) Optimise synergies with the Common Agriculture Policy in particular through cross-compliance, rural development, promotional measures, quality policy, organic farming, etc.
e) Investigate the welfare of farmed fish as no specific welfare rules for the transport and the killing of fish exist yet.

EFSA scientific activities on animal welfare - *1. Development of Scientific Opinions* - Within the 10 Scientific Panels of EFSA, the Animal Health and Welfare (AHAW) Panel provides specific scientific advice on risk factors related to animal diseases and welfare, primarily of food producing animals, including fish. In the case of animal welfare, it is important to stress that, in agreement with Regulation 178/2002 (EC, 2002), ethical, socio-economic, cultural and religious aspects are outside the scope of the EFSA's remit. Only risk managers (European Commission) deal with legitimate and legal factors, including social, economic, traditional, ethical and environmental factors. EFSA's animal welfare scientific opinions shall focus on helping risk managers to identify methods to reduce unnecessary pain, distress and suffering of animals and to increase welfare, where possible.

Scientific opinions have been focused, among others, on pig welfare (n=5), fish welfare (n=5) including stunning and killing of fish species (n=7), dairy cows (n=5), stunning and killing of other animal species (n=4), animal transport (n=2), beef cattle and calves' welfare, sheep and goats, rabbits, laying hens, genetic selection of broilers, etc. In addition to the welfare of food producing animals, animal welfare aspects were requested to be considered on issues, such as, animal diseases (i.e. avian influenza and its vaccines), stunning and killing of seals, welfare of laboratory animals, harvesting feathers from live geese and import of wild birds into the EU. It is important to point out that the European Commission when committing an animal welfare mandate, requests to take into account where relevant, animal disease and food safety aspects (Ribó et al., 2009).

Each scientific opinion has been addressed by a working group of on average 7-8 *ad hoc* experts, chaired by one member of the AHAW Panel and administratively and scientifically supported by EFSA AHAW staff. During the preparation of the scientific opinions, collaboration with other European Agencies has been established, such as the European Medicines Agency - EMA (e.g. fish welfare), or the European Centre for Disease control - ECDC (e.g. avian influenza). Furthermore, observers from the World organisation for animal health (OIE), and the World Organisation for Food and Agriculture (FAO) have been accepted. This will facilitate an adequate exchange of information and promote networking between EFSA and these organizations in order to avoid duplication of efforts and improve efficiency and validity of the data for risk assessment purposes (Serratosa and Ribó, 2009).

The AHAW Panel is composed by 21 independent scientific experts from which, approximately one third are experts on animal welfare issues, one third on animal diseases and one third in animal health and welfare horizontal issues related to risk assessment methodologies, epidemiology and modelling. The panel is responsible for all adopted scientific opinion and receives the full support of the staff of the AHAW Unit.

The AHAW Panel has delivered during the period 2003-2013, 109 scientific opinions on a variety of animal diseases (n=60) and welfare (n=49) issues (Fig. 1). Other EFSA panels and units have also been involved in the delivery of opinions related to animal health and welfare (i.e. biological hazards, feed additives, contaminants, zoonosis).

2. Guidance on risk assessment for animal welfare - The main role of EFSA on animal welfare is to provide assessments and address animal welfare issues from a scientific point of view. Risk assessment (RA) methodology has been commonly used to describe and quantify the risks of introduction of infections, toxi-infections or residues of veterinary medicines or risks resulting from the import of live animals and their products in the animal food chain, for which international guidelines (WHO, OIE) have been followed (Müller-Graf et al., 2008).

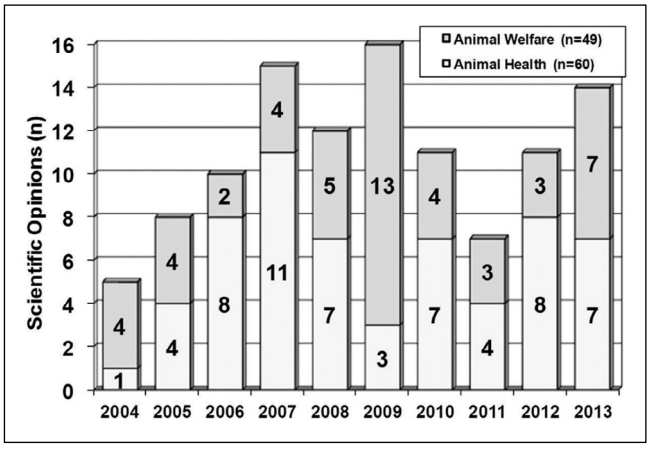


Figure 1 - Scientific opinions on animal health and animal welfare (2004-2013).

The EFSA RA approach in animal welfare has significantly evolved. In the first scientific opinions the RA was limited to the listing of hazards which may compromise animal welfare and the definition of risk pathways. Further developments included the estimation of the magnitude of the adverse effects (depending on their severity and duration) associated with the presence of the hazard and the probability of its occurrence in a specific animal population, which allowed the calculation of a risk estimate. Due to the limited amount of quantitative data on the adverse effects of hazards on animal welfare, a qualitative or semi-quantitative risk assessment has been developed mainly based on expert opinion. In the five scientific opinions on dairy cow welfare, conclusions and recommendations were based on the data presented in the scientific report and the outcomes of the semi-quantitative RA approach (Ribó and Serratosa, 2009).

The used animal welfare RA approach does not give a precise numerical estimate of the risk attributed to certain hazards but it helps to identify major risks affecting each animal category. In addition, risk factors may be ranked within a certain animal population, which allows identifying priority areas of intervention (risk management) and issues that need to be further clarified through future research (recommendations for future research) (Müller-Graf, et al., 2008).

One of the main conclusions of the EFSA Scientific Colloquium on the principles of risk assessment of food producing animals (December 2005) was that although different approaches exist for risk assessment related to food microbiological and animal health issues, "*no specific standardized methodology exists in the field of the Animal Welfare Risk Assessment*". The colloquium recommended that EFSA should consider developing guidelines in this area and that it would be worthwhile to set up a working group to further investigate methodologies for risk assessment of animal welfare.

Considering the recommendations from the EFSA Scientific Colloquium, the different RA approaches followed by the experts involved in animal welfare and that no specific international guidelines on risk assessment for animal welfare had been developed, EFSA launched in 2007 a self-mandate for the development of an EFSA Guidance on risk assessment for animal welfare. The aim of the guidance was to provide a comprehensive harmonised methodology to evaluate risks in animal welfare, taking into consideration the various procedures, management and housing systems and the different animal welfare issues, with reference to the methodologies followed in the previous EFSA Scientific Opinions. The EFSA Guidance for the risk assessment of animal welfare, published in January 2012, gives to scientists, veterinarians and all those with an interest in animal welfare a practical, harmonised methodology to assess risks associated with the welfare of animals.

3. Measurable animal-based indicators to assess animal welfare - The use of animal-based measures to assess animal welfare is relatively new. Measurable animal welfare indicators shall reinforce the scientific basis of EU regulation in this field. In 2006, EFSA was requested by the European Commission to include measurable welfare indicators, whenever possible, in the conclusions and recommendations of the future scientific opinions on animal welfare. In 2011, EFSA was also requested to identify how animal based measures could be used to ensure the fulfilment of the recommendations of the EFSA scientific opinions on animal welfare and how the assessment protocols suggested by the Welfare Quality® project cover the main hazards identified in EFSA scientific opinions and vice-versa. Additionally, possible relevant animal welfare issues which cannot be assessed using animal based measures and the main factors in the various husbandry systems which have been scientifically proven to have negative effects on the welfare of the animals should be identified and listed (Ribó and Blokhuis, 2012).

As a result, in 2012 three scientific opinions on the use of animal based measures to assess the welfare of pigs, cows and broilers were

published. The work continued to cover all farm species. A statement on the use of animal-based measures to assess animal welfare, establishing a common framework for future scientific opinions was also published in 2012.
The outcomes of the risk assessment methodology together with the identification of welfare indicators will allow the establishment and implementation of welfare control and monitoring plans at farm level and detection of poor welfare situations. Future legislative provisions based on appropriate scientific evidence should include animal-based welfare indicators or assessment systems, which will support decision-making on the acceptable conditions for farmed animals and will be used to underpin control and monitoring of animal welfare at farm level.

Correlation between animal welfare, animal disease and food safety - The concept of animal health covers not only the diseases of animals, but also the critical relationship between animal welfare and animal disease, as well as its relevance to public health. Diseases usually decrease the welfare of animals; for example, stress may increase susceptibility to infections, which in turn may lead to illness on animals or increased shedding of pathogens and contaminants into the food chain. Disease may also have an impact on trade (e.g. Bluetongue) or include a zoonotic aspect, being relevant to public health. Several examples illustrate how animal welfare measures may increases the risk of disease, i.e. outdoor farming systems improve animal welfare but they may also increase the exposure of animals to certain biological hazards (Husu-Kallio, 2008; Ribó et al., 2009). Table 1 shows some examples of the interactions between animal welfare, animal disease and food safety.
For example, when considering the welfare aspects of various systems of keeping laying hens, it was concluded that non-cage systems will improve their welfare. However, the risk of egg contamination with *Salmonella* spp. might be increased because greater exposure of layers and their eggs to environmental contamination.
possible role of the migratory birds in the spread of highly pathogenic avian influenza (HPAI) was assessed during the AI crisis in 2006. The main biosecurity measure was to confine all birds indoors and thus, welfare was probably impaired. However, the risk of exposure to avian influenza or any other contagious diseases was dramatically decreased and mortality drastically reduced.
Several examples of interactions between animal welfare and risk of disease are found in the scientific opinions on the welfare of pigs. Floor types leading to bad urine drainage and to insufficient faeces removal increase the risk of infections, especially those leading to enteric disorders in pigs. Frequently added straw as bedding material might act as vehicle of diseases such as Foot and Mouth Disease (FMD) or Aujeszky's disease. As in poultry, keeping the pigs outdoors with possible contact with the wild fauna, mainly wild boars, is believed to be a source of Brucellosis in domestic pigs.
The "penetrating captive bolt" stunning system in ruminants has been recognised as one of the most appropriate systems in terms on animal welfare, when properly applied. However, the potential dissemination of central nervous system emboli into edible tissues with consequent exposure of humans to BSE can not be excluded, which may impair food safety.
Considering the role of EFSA on assessing animal welfare and the interactions between animal health, animal welfare and food safety, it can be stated that when assessing animal welfare, it is important to consider factors with possible incidence on animal diseases and food safety. The consideration of this interaction shall help the development of right animal welfare control and monitoring plans at farm level (Ribó et al., 2009).

Impact of the animal welfare scientific assessments on the EU policy - Science based conclusions and recommendations are used to justify management measures and therefore, EFSA scientific opinions have an impact on the legislative tasks of the European Commission. Some examples illustrate how EFSA's scientific opin-

Tabella 1 - Example of interaction among animal welfare, animal health and food safety from EFSA Scientific opinions (Serratosa and Ribó, 2009).

Specie	Animal Welfare Issue	Impact on Animal Disease	Impact on Food Safety
Cattle	Related stress in transport	Shipping fever (*Pasteurella* spp, BRSV, IBR, *E. Coli* and *Salmonella* spp)	Meat contamination with *Salmonella*
All species	Mixing animals from different sources at staging points	Spread of infectious diseases (e.g. *E. Coli*, *Salmonella*)	Meat contamination with *E. Coli* and *Salmonella* spp.
Ruminants	Stunning method: Penetrative Captive bolt for stunning	Not applicable	Dissemination of contaminated nervous tissue into edible parts Risk of BSE/CJD
Laying hens	Non-cage systems	Risk of egg contamination with *S. Enteritidis*	Egg contamination with *Salmonella*
Poultry	Outdoor systems	Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI)	HPAI in humans
Calves	Stress, large groups, space allowance, mixing from different sources, restocking	Increased susceptibility, cross-contamination, pathogens spread	Risk of foodborne pathogen contamination (i.e. *Salmonella*)
Pig	Bedding materials (e.g. straw). Floor types (e.g. floors causing abrasion to feet or snout)	Vehicle of FMD or Aujesky disease. Spread of FMD, Vesicular Stomatitis.	
Pig	Outdoor systems	Wildlife pathogens (i.e. *Toxoplasma, Salmonella, Brucella*)	Foodborne pathogens Risk of Toxoplasmosis, Salmonellosis and Brucellosis
Dairy cow	Extensive systems – pasture (reduced lameness, fertility and metabolic problems, etc.)	Exposure to weather elements, flies and access to toxic plants. High disease impact (i.e. anthrax, bluetongue, leptospirosis, echinococcosis, FMD, Q-fever, anaplasmosis, babesiosis and liver fluke)	Foodborne pathogens Microbial contamination of milk products.

ions have been taken into consideration when legislative measures are proposed.

The EFSA opinion on the animal health and welfare risks associated with the import of wild birds other than poultry into the European Union was adopted in October 2006. Following the recommendations of the scientific opinion, the European Commission adopted in November 2006 a Commission Decision which, in summary, permanently bans the import of "pet birds" and wild caught birds and allows the import of captive-bred birds only from authorised countries.

The AHAW Panel adopted in 2004 and 2006 two scientific opinions on the welfare aspects of the main systems of stunning and killing. The opinions addressed the stunning and killing of most species kept for farming purposes and focused on the welfare at the point of application. Killing of animals without stunning and stunning and killing methods for disease control were also considered. Regulation (EC) No 1099/2009 on the protection of animals at the time of killing mentions the scientific advice given by EFSA and states that fish species are not included in the Regulation, as further scientific assessments on farmed fish are needed.

Answering a Commission mandate on the welfare aspects of the stunning and killing of farmed fish, seven scientific opinions considering different fish species (Atlantic salmon, rainbow, seabass/sea-bream, carp, eels, turbot and tuna) were adopted by the AHAW Panel in 2009.

Following a request from the European Commission, the AHAW Panel adopted in December 2007 the scientific opinion on the animal welfare aspects of the killing and skinning of seals. Consequently, Regulation (EC) No 1007/2009 on the trade of seal products allows placing seal products on the market only when they come from traditional hunts conducted by Inuit people, when the trade is of occasional nature and not for commercial reasons and when it is from the sustainable management of marine resources in a non-profit basis.

References

EC. (2002), Regulation (EC) No. 178/2002 of 28 January 2002, laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. OJ L31, 1/2/2002: 1-24.

EC. (2005), Community Action Plan on the Protection and Welfare of Animals (2006-2010). http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/ actionplan/actionplan_en.htm.

EC. (2012), Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee on the European Union Strategy for the Protection and Welfare of Animals 2012-2015, COM(2012) 6 final/2, 15.2.2012. http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/actionplan/actionplan_en.htm.

Husu-Kallio. (2008), Animal health and animal welfare, is it the same thing? Acta Veterinaria Scandinavica, 50 (Suppl. 1): S2.

Müller-Graf C., Candiani C., Barbieri S., Ribó O., Afonso A., Aiassa E., Have P., Correia S., De Massis F., Grudnik T., Serratosa J. (2008), Risk assessment in animal welfare – EFSA approach. AATEX 14, Special Issue, March 31: 789-794.

Ribó, O., and Serratosa, J. (2009), History and procedural aspects of the animal welfare risk assessment at EFSA. In: Smulders, F.J.M and Algers, B. (Eds.). Food safety assurance and veterinary public health, Vol. 5, Welfare of production animals: assessment and management of risks. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands: 307-337.

Ribó O. and Blokhuis H. (2012), Risk assessment methodology and identification of animal-based indicators to assess animal welfare at farm level. In: C. Jakobsson (Ed.). Ecosystem health and sustainable agriculture 1. Sustainable Agriculture. Baltic University Press, Uppsala University, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden: 362-368.

Ribó O., Candiani D., Serratosa J. (2009), Role of the European Food Safety Authority (EFSA) in providing scientific advice on the welfare of food producing animals. Ital. J. Anim. Sci. vol. 8 (Suppl. 1): 9-17, 2009.

Serratosa J., Ribó O. (2009), International context and impact of EFSA activities in animal welfare in the European Union. In: Smulders, F.J.M and Algers, B. (Eds.). Food safety assurance and veterinary public health, Vol. 5, Welfare of production animals: assessment and management of risks. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands: 227-305.

WTO. (1995), Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures http://www.wto.org/english/tratop_e/sps_e/spsund_e.htm.

Sheep welfare assessment: from compliance with pre-defined standards to welfare management tools

F. NAPOLITANO

Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali - Università della Basilicata

Key words: sheep, welfare monitoring, risk assessment, benchmarking.

INTRODUCTION - Different factors can affect sheep welfare including physical environment, resources available to the animal (space allowance, housing conditions, floor type, etc.) and the management practices used on farm (weaning age, whether or not animals are routinely subjected to mutilations, feeding strategies, etc.). These factors can also interact with each other, thus changing the way they affect sheep welfare (Dwyer, 2008). As shown in Fig. 1, the animals can respond to them either negatively (adverse effects) or positively (benefits). However, the approach followed in the development of a monitoring scheme of animal welfare at farm level is opposite to the logical sequence of events described above. The first step, in fact, is the identification of a number of different variables, which should be indicative of the effects or consequences of farming (environmental/resource and management factors) on the animals. For this reason such variables are often called indicators. The indicators to be included in a scheme of on-farm assessment of animal welfare should be valid (meaningful with respect to animal welfare), reliable (reflecting the tendency to give the same results on repeated measurements) and feasible in terms of time and financial requirements (Keeling, 2009).

An approach closer to the logical sequence of events is generally used in risk assessment studies where the factors potentially causing poor welfare (called hazards) are identified first then the corresponding welfare consequences on animals are estimated (EFSA Panel on Animal Health and Welfare, 2012a). Appropriate resource and management measures can be used to characterise risk factors, whereas animal-based measures can be used to assess the consequences on the animals.

Whatever approach is used, animal welfare assessment is needed to pursue one or more of the following aims: as advisory tool by farmers, as tool to verify compliance with legislation or regulatory standards and as a component of quality assurance schemes for consumers (Fraser, 2008). However, the primary purpose of any assessments should be the continuous improvement of the welfare state of the animals.

Therefore, in the present study the main welfare assessment approaches are briefly examined and critically reviewed in relation with their potential for sheep welfare improvement.

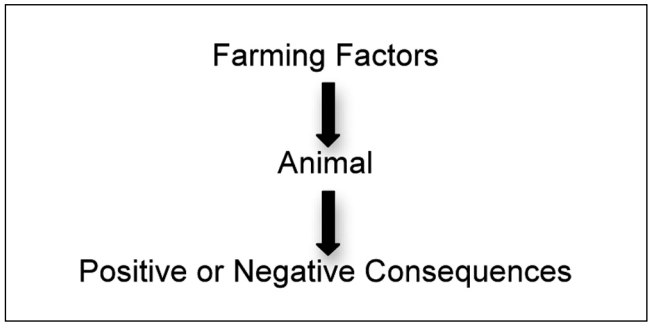


Figure 1 - Logical sequence of events affecting animal welfare.

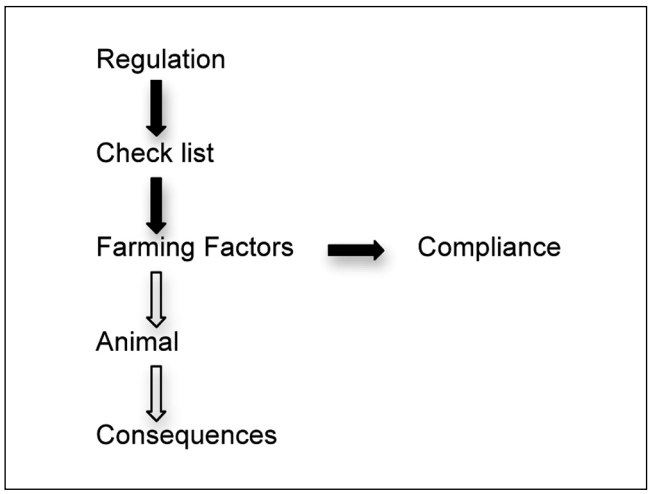


Figure 2 - Role and possible effects of legal requirements (empty arrows indicate unverified relationships).

REGULATIONS - Based on documented scientific opinions a number of different European Regulations has been issued concerning animal welfare. Although no specific roles have been produced for sheep, the Commission Decision 2006/778/EC (Commission of the European Communities, 2006) reports that inspections of animals kept for farming purposes should not only cover requirements laid down in specific acts but also general welfare requirements as laid down in Directive 98/58/EC and covering all farmed species (Council of the European Union, 1998). The collection of information during inspections is carried out by the competent authority and performed using a checklist as defined by the Annexes to the Directive. The main aspects under control are: Staffing, Inspection, Record keeping, Freedom of movement, Buildings and Shelter, Feed and Water, Mutilations, Breeding procedures. The aim of this kind of assessment is the registration of compliances and non-compliances and the reporting of such information to the Commission. An improvement of the welfare state of the animals may be hypothesized only in those farms were non-compliances are recorded and the competent authority impose the farmer to drive farming practices within the regulation standards, whereas no improvements can be hypothesized for those farms where no non-compliances were found (Fig. 2).

WELFARE STANDARDS - Welfare Standards are additional to any statutory legal requirements and represent a simple and straightforward tool for quality assurance. One of the most famous standards used in the United Kingdom is Freedom Food, a wholly owned subside of the Royal Society for the Prevention of Cruelty against Animals, formed to implement these standards. Based on satisfactory inspection farmers, transporters, slaughterers, processors and retailers may subscribe to the standards and use the Freedom Food trademark. All participants are regularly visited and evaluated by Freedom Food Ltd. A charge is imposed to cover inspection, administration and marketing costs. These standards are based on the five freedoms (hence the name of the trademark) as

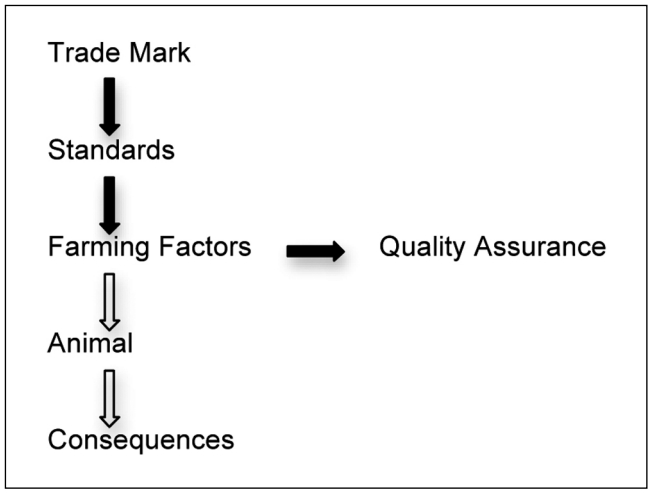


Figure 3 - Role and possible effects of voluntary standards (empty arrows indicate unverified relationships).

defined by the Farm Animal Welfare Council (FAWC, 1994). These freedoms provide a framework for the setting of the standards considered as necessary to provide an adequate level of animal welfare. Within the specific protocol for sheep a number of different aspects are taken into account concerning the following main areas: Food and water (e.g. grazing, drinking space), Environment (e.g. space allowance, floor), Management (e.g, shearing, use of sheep dogs), Health (e.g. health plan, parasitic infestations), Transport (e.g. handling during loading/unloading, casualty animals), Slaughter (e.g. stunning method, sticking procedure). In UK another example of standards specific for sheep has been issued by the trademark Red Tractor, less restrictive than Freedom Food and close to legal requirements. Within this trademark routine visits at 18-month intervals are performed. Some of the regulated aspects are Animal Health, Animal Medicine, Feed and Water, Vermin Control, Housing, Casualties and Transport. A third trademark is also available in UK: Soil Association is more stringent than Freedom Food and it is required for organic certification in UK. Some of the regulated aspects are Management practices, Housing, Feeding, etc. Examples of animal welfare standards in USA are those issued for sheep within the Animal Welfare Approved trademark, which take account of the following aspects: Breed, Health Management, Animal Management, Pasture Access, Housing and Shelter, Protection from predators and Control of rats and mice, Transport and Slaughter. Certified Humane is another example of American standards for sheep which focuses on Feed and Water, Environment, Management, Health, Transportation and Slaughter aspects.

Although ensuring basic resources to promote the welfare of the animals, a limit of any standards is that they are unable to produce a satisfactory assessment of the welfare state of the animals and, provided that predetermined requisites, as stated by the standards, are fulfilled, the process can receive the quality assurance label, independently by the real conditions of the animals. A possible improvement of the animal welfare may be achieved in farms willing to gain the access to the trademark, thus motivated to ameliorate the farming factors unable to fulfil the requirements as set by the standards (Fig. 3), whereas no improvements have been observed in certified farms (Main et al., 2003).

MONITORING SCHEMES - Monitoring systems rely either on resource measures, which comprise structural and technical elements (space allowance, feeding facilities, etc.), the quality of human–animal relationship and management-related factors (hygienic and climatic conditions and routine farming practices), or on animal-based variables, dealing with behaviour, health and physiology of the animals, or on a combination of resource and animal-based indicators to obtain a valid assessment of animal welfare. Although numerous studies have assessed the effect of management stressors on sheep welfare, monitoring schemes for assessing small ruminant welfare at farm level have been lacking until few years ago. Due to this lack a protocol scientifically validated for cattle, the Animal Needs Index (ANI) 35 L 2000 (Bartussek et al., 2000) was adapted to sheep by Napolitano et al. (2009). The protocol proved to be feasible (the mean time needed to perform welfare assessment was 85 min per farm and no sophisticated equipment was necessary in both time-consuming and economical terms) and reliable, as the inter-observer reliability of the scores was high. As the ANI is a system mainly based on resource variables, several animal-based variables were tested for possible inclusion in the protocol. Avoidance distance showed high levels of convergent and scientific validity and intra-observer reliability (as defined by Waiblinger et al., 2006). Lameness, integument alterations and body condition score were not tested for validity, but showed excellent intra-observer reliability (Napolitano et al., 2011), whereas good inter-observer reliability was noted for integument alteration, hoof overgrowth, lameness and dirtiness (Napolitano et al., 2009). Similarly, Phythian et al. (2012) observed high levels of inter-observer reliability for the assessment of group lameness and cleanliness of the breech area, whereas excellent intra-observer reliability was found for lameness, cleanliness of the breech area, demeanour and wool loss. In another study Phythian et al. (2013) showed that two groups of assessors reached high levels of inter-observer reliability using a list of 12 predetermined behavioural descriptors specifically developed for sheep, thus indicating the suitability of qualitative behaviour assessment for the evaluation of positive emotional state at farm level. The indicators to be used in the development of a monitoring scheme specific for sheep were previously selected on the basis of a preliminary study using pre-meeting consultation and focus group discussions (Phythian et al., 2011). An expert panel meeting was used to identify the main welfare issues in sheep farming. Subsequently, the expert panel was asked to identify indicators of sheep welfare linked to the suggested welfare issues within the five freedoms framework (FAWC, 1994). This approach allowed achieving consensual validity to a list of potential indicators of sheep welfare. More recently Giuliotti et al. (2013) used a monitoring protocol specifically developed by the Research Centre on Animal Production (CRPA, Reggio Emilia, Italy) for dairy sheep (https://agri.regione.emilia-romagna.it/IBA/elenco_questionari.do). The protocol mainly includes resource variables concerning Management and Personnel, Farming and Housing, Environmental control, Feed and Water, Health and Behaviour. Although not yet validated, the protocol has been used in the rural development programme of Tuscany region for the payments concerning a specific measure on animal welfare.

Within the VII Framework Program the EU financed the project AWIN (Animal Welfare Indicators). The overall research objectives of the AWIN project are being pursued through four work-packages (WP1 = development of animal welfare protocols, WP2 = study of the impact of pain and disease on animal welfare, WP3 = study of the effects of pre-natal factors on the development and welfare of the offspring, WP4 = promotion of research and education in animal welfare). These objectives focus on species that, although commercially relevant worldwide, have so far been overlooked in animal welfare assessments. These species are sheep, goats, horses, donkeys and turkeys. As to sheep, the project is organised in a 4 stage process for the development of the indicators: Stage 1 = literature review and expert panel meeting to decide on candidate indicators (performed in 2011); Stage 2 = testing selected indicators for validity, reliability, feasibility etc. (lasting 2 years, ending November 2013, the data analyses are still in progress); Stage 3 = testing the prototype protocol on commercial farms as built following a stakeholder meeting held in November 2013 and taking into consideration the stage 2 results (current activity); Stage 4 = integration and feedback. This latter stage is unlikely to produce an overall assessment score as in the Welfare Quality project. The pro-

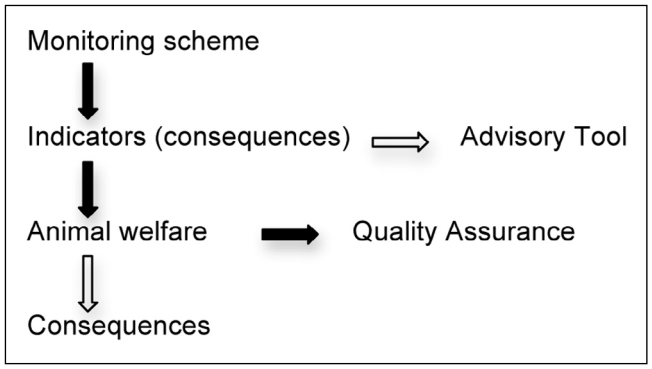


Figure 4 - Roles and possible effects of monitoring schemes (empty arrows indicate unverified relationships).

tocol itself is envisaged as a 2-phase process: in the Phase 1 assessment an initial general screening is performed consisting in a shorter package of measures. In the phase 2 more detailed diagnostic assessments are conducted only if there are issues raised in the phase 1 assessment and only on a restricted number of animals (group of highest concern) gathered by shepherds in available facilities for closer inspection (nose to tail assessment). The animal-based measures taken in phase 1 are: qualitative behaviour assessment, quantitative behaviour assessment (standing, lying, panting, scratching, vigilant, etc.), fearfulness assessed using human approach (minimum distance, flight distance, time to resume normal behaviour), physical assessment of fleece (cleanliness, length, quality), tail length (full, docked well, docked short) and lameness, whereas the environmental is assessed both outdoors (in terms of water supply, shelter provision, landscape) and indoors (in terms of water supply and pen environment). In the phase 2 the following aspects are assessed: teeth (e.g. missing teeth), mouth mucosa (colour), eyes (e.g. ocular discharge), ears (e.g. damage from tags), nose (nasal discharge), horns (e.g. trimming), respiration (e.g. coughing), skin (e.g. myiasis), fleece length (appropriateness to time of the year), fleece quality (e.g. fleece loss), coat (cleanliness), legs (e.g. lesions), BCS (four point scale), udder (e.g. temperature), tail (length), dag score (five point scale), lameness (four point scale). Although such measures are unlikely to be integrated for quality assurance purposes, in the fourth stage of the project which is the next stage, the project will focus on stakeholder-friendly outputs or farmer friendly feedbacks so that they will be able to receive instant information on how well their farms are doing, using tablets or apps that might allow graphics or feedback on where a farm is relative to the reference population (benchmarking). The most effective animal welfare monitoring schemes are based on the assessment of the negative consequences of farming factors on animals. However, no direct link between consequences and factors is usually performed. Therefore, albeit valid and reliable, such schemes can be only used to express a scientifically based judgement on the welfare state of the animals, whereas little is done to promote a continuous process of animal welfare improvement (Whay, 2008).

RISK ASSESSMENT - Risk assessment has been defined by the EFSA Panel on Animal Health and Welfare (2012b) as a scientifically-based process consisting of exposure assessment (in terms of level, duration, frequency and variability of exposure to hazards), consequence characterisation (i.e. evaluation of the nature of animal welfare effects caused by a hazard) and risk characterisation (estimation, including associated uncertainties, of the probability of occurrence and magnitude of adverse animal welfare effects). It is part, along with risk management and risk communication, of a wider process called risk analysis.

Therefore, another approach to the development of tools for on farm management of animal welfare is the use of risk assessments of the hazards that pose potential threats to welfare. This strategy starts with the identification of hazards then involves quantification of their likelihoods and potential impacts in terms of intensity, duration and prevalence, in order to establish the need for monitoring and managing the risks. The European Food Safety Authority (EFSA) has developed risk assessment systems for a number of farm animal species and production systems for the dairy cattle, chickens, pigs, beef cattle and fish farming industries. Recently the EFSA Panel of Animal Health and Welfare has been invited by the European Commission to produce a scientific opinion on the welfare risks related to the farming of sheep for wool, meat and milk production. In this case the group working on sheep welfare has adopted a more comprehensive methodology starting with the description of the main categories of management systems (shepherding, intensive, semi-intensive, semi-extensive, extensive, very-extensive and mixed systems). Subsequently, in agreement with Phythian et al. (2011) a bottom-up approach was followed (Fig. 5) with the identification of the main welfare consequences (adverse effects) of farming as resulted from the analysis of a questionnaire circulated among more than 300 sheep farming experts including academics, practitioners and farmers. Overall the systems, the main adverse effects were lameness, thermal discomfort, enteric disorders, mastitis and skin disorders for ewes, pain induced by management procedures, enteric disorders, thermal discomfort and mis-mothering for lambs. A further more restricted group of experts will be asked to associate the main risk factors to those consequences following the scheme reported in Table 1 (for sake of brevity only the consequences for ewes in the semi-intensive system is shown as an example).

Tabella 1 - Example of association between the main welfare consequences identified in the semi-intensive farming system and the corresponding risk factors (hazards) as requested by EFSA to hearing experts.

Welfare consequence	Risk factors common to all production purposes	Risk factors specific for meat farms	Risk factors specific for dairy farms	Rsk factors specific for wool production
Mastitis				
Skin disorders				
Lameness				
Enteric disorders				
Reproductive disorders				

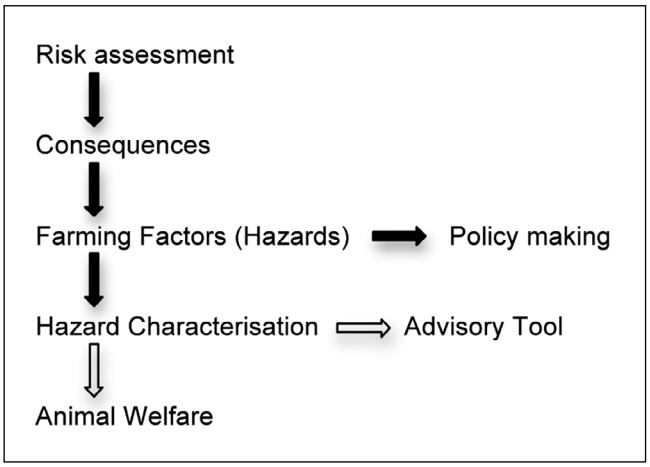


Figure 5 - Roles and possible effects of risk assessment (empty arrows indicate unverified relationships) as envisaged by the working group on sheep welfare from EFSA.

The pitfall of the risk assessment approach is that it is not usually performed on individual farms, therefore it can be used as a tool to support scientifically driven policy making while identifying and characterising risk factors potentially threatening sheep welfare. However, no indications about specific farm situations can be given either in terms of animal welfare or as a tool for continuous welfare improvement.

BENCHMARKING - Based on the combination of welfare monitoring, risk assessment, and benchmarking, Ferguson et al. (2014) are developing e new tool, the Unified Field Index (UFI) for welfare assessment in commercial farms, which is applied at two levels: on-farm (level 1) and externally (level 2). The welfare monitoring protocol incorporates measurement domains that address key areas concerning biological functioning, mental functioning and naturalness. Within this framework animal based-, resource based-, management based-measures and other ethical criteria are taken into account. These variables can represent the inputs for risk assessment and identification of hazards to be conducted on farm (self audit). Data gathered on-farm (level 1) can be used for further analysis and production of statistics (external audit) for across farm benchmarking, welfare assurance outputs, identification of best farming practices and feedback for continuous welfare monitoring. A similar approach has been used in the AWIN project where the production of statistcs concerning the position of the farm as compared with the reference population can promote the identification of best practices and implementation for welfare management and continuous improvement.

CONCLUSION - Although individual form of assessment (welfare monitoring, risk assessment, statutory legal requirements) can provide useful tools to fulfil one or more needs in the field of animal welfare, such as quality assurance, policy making, welfare issue identification, compliance with predefined standards, only the combination of welfare assessment tools with benchmarking can promote the activation of a virtuous circle where after the evaluation of the welfare state of the animals and the identification of the risk factors, best management practices are identified and disseminated through the comparison of performances (Fig. 6).

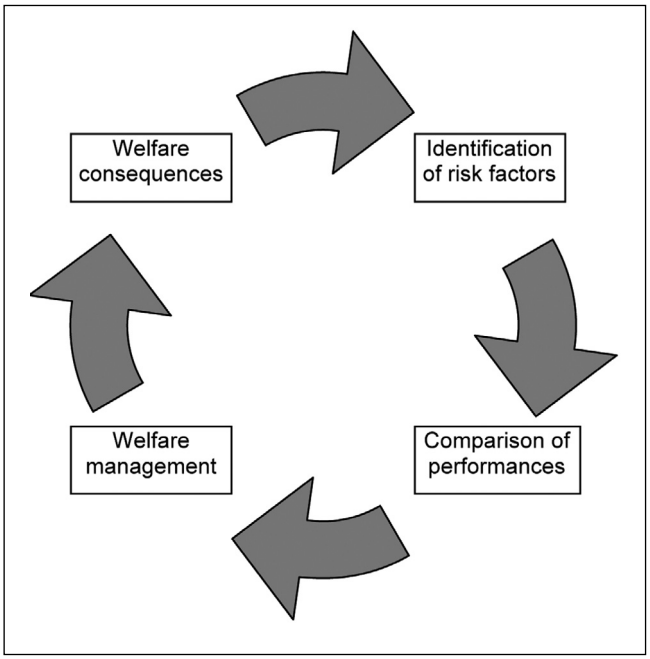


Figure 6 - Virtuous circle induced by the association of welfare assessment with benchmarking.

Esempi di valutazione del benessere nella specie ovina

Parole chiave: ovini, benessere animale, monitoraggio del benessere, valutazione del rischio.

References

Bartussek, H., Leeb, C.H., Held. S. (2000), Animal needs index for cattle ANI 35 L/2000. Federal Research Institute for Agriculture in Alpine Regions BAL Gumpenstein, A 8952 Irdning, Austria,

Commission of the European Communities. (2006), Decision concerning minimum requirements for the collection of information during the inspections of production sites on which certain animals are kept for farming purposes (2006/778/CE). Official Journal of the European Union L 314: 39-47.

Council of the European Union. (1998. Council Directive 98/58/EC concerning the protection of animals kept for farming purposes. Official Journal of the European Union L 221: 23-27.

Dwyer, C. (2008), The welfare of sheep. Springer Science+Business Media B. V.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare. 2012a. Statement on the use of animal-based measures to assess the welfare of animals. EFSA Journal 10(6): 2767.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare. 2012b. Scientific Opinion on Guidance on Risk Assessment for Animal Welfare. EFSA Journal 10(1): 2513.

FAWC (Farm Animal Welfare Council). (2009), Report on farm animal welfare in Great Britain: past, present and future. FAWC, London.

Ferguson, D., Colditz, I., Collins, T., Matthews, L., Hemsworth P. (2013), Assessing the welfare of farm animals. Progress Report - APL Project No 2011/1036.421 - Identify and integrate measures of animal welfare that meet the needs of animals and society. (www.animalwelfare.net.au/sites/default/files/Assessing%20the%20Welfare%20of%20Farm%-20Animals%20Exec%20Sum.pdf).

Fraser, F. (2008), Understanding Animal Welfare: The Science in its Cultural Context. Wiley-Blackwell, USA.

Giuliotti, L., Paganelli, O., Rossi, P., Gastaldo, A., Benvenuti, M.N. (2013), Animal welfare assessment in dairy sheep farms in Tuscany. Italian Journal of Animal Science 12 (Suppl. 1): 47.

Keeling, L. (2009), Definition of a framework for developing assessment systems. In: Keeling, L. (Ed.), An Overview of the Development of the Welfare Quality® Project Assessment Systems. SLU Service/ Reproenheten, Uppsala, Sweden: 1-7.

Main, D.C.J., Whay, H.R., Green, L.E., Webster, A.J.F. (2003), Effect of the RSPCA Freedom Food scheme on the welfare of dairy cattle. Veterinary Record 153: 227-231.

Napolitano, F., De Rosa, G., Ferrante, V., Grasso, F., Brughieri, A., 2009. Monitoring the welfare of sheep in organic and conventional farms using an ANI 35 L derived method. Small Ruminant Research 83: 49-57.

Napolitano F., De Rosa G., Girolami A., Scavone M., Braghieri A. (2011), Avoidance distance in sheep: Test–retest reliability and relationship with stockman attitude. Small Ruminant Research 99: 81-86.

Phythian, C.J., Michalopoulou, E., Jones, P.H., Winter, C.J., Clarkson, M.J., Stubbings, L.A., Grove-White, D., Cripps, P.J., Duncan, J.S. (2011), Validating indicators of sheep welfare through a consensus of expert opinion. Animal 5: 943-952.

Phythian, C.J., Cripps, P.J., Michalopoulou, E., Jones, P.H., Grove-White, D., Clarkson, M.J., Winter, A.C., Stubbings, L.A., Duncan, J.S. (2012), Reliability of indicators of sheep welfare assessed by a group observation method. Veterinary Journal 193: 257-263.

Phythian, C.J., Michalopoulou, E., Duncan, J., Wemelsfelder, F. (2013), Inter-observer reliability of Qualitative Behavioural Assessments of sheep. Applied Animal Behaviour Science 144: 73-79.

Waiblinger, S., Boivin, X., Pedersen, V., Tosi, M.V., Janczak, A.M., Visser, E.K., Jones, R.B. (2006), Assessing the human–animal relationship in farmed species: a critical review. Applied Animal Behaviour Science 101: 185–242.

Whay, H. R. (2008), On-farm animal welfare assessments and audits in the UK. In Proceedings of the 41st Annual Conference of the American Association of Bovine Practictioners 486: 73-77.

Un protocollo per la valutazione del benessere nella capra: i risultati del progetto AWIN

S. MATTIELLO[1], M. BATTINI[1], S. BARBIERI[1], A. VIEIRA[2], G. STILWELL[2], E. CANALI[1], A. ZANELLA[3]

[1] Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica
[2] Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (Portugal)
[3] Universidade de São Paulo (Brasil)

Parole chiave: benessere, salute, capra, indicatori diretti.

INTRODUZIONE - La crescente importanza delle tematiche relative al benessere animale ha portato, a partire dal 2001, allo sviluppo in Europa di svariati metodi e protocolli per la valutazione del benessere in campo per alcune specie zootecniche. Ad esempio gli Indici di Benessere Animale TGI35L e TGI200 sono nati rispettivamente in Austria (Bartussek, 2001) e in Germania (Sundrum et al., 1994), per la valutazione del benessere negli allevamenti biologici, mentre strumenti di valutazione specifici per gli allevamenti di bovine da latte sono stati messi a punto in Francia (Capdeville e Veissier, 2001) and in Italia (Tosi et al., 2001). La maggior parte di questi sistemi si basa prevalentemente sulla registrazione di parametri ambientali e gestionali, definiti come "*resource-based*" (Main et al., 2003). Tuttavia, la relazione tra questi parametri e l'effettivo livello di benessere degli animali non è sempre completamente chiara e lineare (Blokhuis et al., 2006). I parametri "*resource-based*" rappresentano, infatti, dei fattori di rischio per il benessere e non possono essere considerati dei veri e propri indicatori diretti. Pertanto, risulta evidente l'importanza di sviluppare degli indicatori che siano incentrati direttamente sugli animali ("*animal-based*") e che siano in grado di misurare il loro reale stato di benessere, in relazione ai loro tentativi di adattarsi all'ambiente. L'uso di questa categoria di indicatori è relativamente nuovo e necessita ancora di numerosi approfondimenti (EFSA, 2012a; 2012b; 2012c). I primi protocolli "*animal-based*" per la valutazione del benessere in campo sono stati messi a punto nell'ambito del progetto europeo Welfare Quality® e hanno riguardato le principali specie oggetto di allevamento intensivo: suini (Welfare Quality® Protocol, 2009a), bovini da latte e da carne (Welfare Quality® Protocol, 2009b), polli da carne e galline ovaiole (Welfare Quality® Protocol, 2009c). Nonostante i progressi compiuti nello sviluppo di protocolli di valutazione del benessere in allevamento, altre specie di interesse zootecnico, che rivestono una notevole importanza economica in Europa e nel mondo, sono state relativamente trascurate e sono necessari ulteriori e approfonditi studi in questo ambito.

IL PROGETTO AWIN - Il progetto Animal Welfare Indicators – AWIN (www.animal-welfare-indicators.net), finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del 7° Programma Quadro, è finalizzato all'integrazione e alla disseminazione di indicatori diretti di benessere animale, compreso il dolore, in specie quali gli equidi (cavalli e asini), i tacchini e i piccoli ruminanti (pecore e capre). Al progetto, iniziato nel maggio 2011 con una durata prevista di 4 anni, partecipano 11 istituzioni che rappresentano 7 Stati europei e 2 extra-europei. AWIN è organizzato in cinque work-package (WP) complementari tra loro, con i seguenti compiti specifici: messa a punto di protocolli per la valutazione del benessere (compreso il dolore) negli equidi, nei tacchini, nelle pecore e nelle capre (WP1); studio delle conseguenze degli stati patologici sul benessere (WP2); indagine sui fattori di allevamento che possono influenzare l'ontogenesi e le strategie adattative degli animali (WP3); e creazione di una piattaforma interattiva su web finalizzata alla ricerca e alla formazione sul benessere animale (WP4). I WP sono integrati tra loro attraverso una serie di attività condivise, coordinate dal WP5, che ha la specifica funzione di gestione del progetto (Fig. 1).

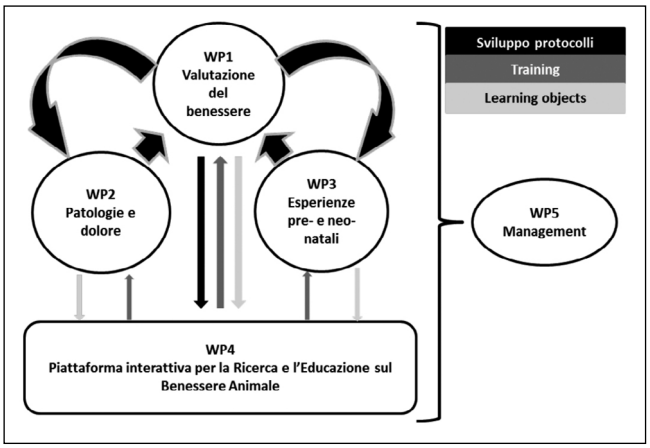


Figura 1 - Rappresentazione schematica dell'integrazione tra work-package (WP) nel progetto AWIN.

Un aspetto fortemente caratterizzante del progetto risiede nel WP4, che prevede il coinvolgimento di tutti i partner per la creazione di un sito web interattivo per promuovere la ricerca e la formazione in tema di benessere animale, integrando ricerche passate, presenti e future, nonché materiale didattico. Il contributo dei singoli partner al WP4 si concretizza con la messa a punto di specifici pacchetti di insegnamenti interattivi ("*learning objects*"), divulgati in un'apposita sezione del sito AWIN dedicata alla formazione (http://www.animal-welfare-indicators.net/site/index.php/learning-objects), in parte già attiva. Tale materiale deriva dalle sperimentazioni che vengono di volta in volta attuate nel corso del progetto, e si pone l'ambizioso obiettivo di uniformare l'insegnamento dell'etologia applicata e del benessere animale a livello europeo.

IL WP1 - Il WP1 si articola in tre compiti (*task*), strettamente legati l'uno all'altro, che prevedono lo sviluppo di un sistema precoce di allarme per i rischi connessi al benessere (basato su dati raccolti al macello), lo sviluppo di prototipi per la valutazione del benessere nelle varie specie (in collaborazione con WP2 e WP3) e infine il testaggio in allevamento di tali protocolli.

L'approccio seguito per la messa a punto dei prototipi si è basato inizialmente su un'approfondita revisione bibliografica della letteratura sugli indicatori di benessere relativi a ciascuna specie, seguita da un *meeting* tra gli esperti di specie del progetto, in cui ciascun potenziale indicatore è stato approfonditamente discusso in termini di validità, ripetibilità (inter- e intra-osservatore) e fattibilità in campo. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di individuare gli indicatori più promettenti, in grado di coprire i 4 principi e i 12 criteri individuati dal progetto Welfare Quality® per coprire tutti gli aspetti di benessere animale (Tab. 1).

Tabella 1 - I quattro Principi e i dodici Criteri individuati dal Progetto Welfare Quality® e utilizzati come punti di riferimento per la scelta degli indicatori nel Progetto AWIN.

Principi	Criteri
Buona alimentazione	assenza da fame prolungata assenza da sete prolungata
Buona stabulazione	riposo confortevole comfort termico facilità di movimento
Buona salute	assenza di lesioni assenza di malattia assenza di dolore da procedure gestionali
Comportamento appropriato	espressione del comportamento sociale espressione di altri comportamenti buon rapporto uomo-animale stato emozionale positivo

Il progetto ha quindi focalizzato l'attenzione su questi indicatori, al fine di verificarne le caratteristiche di validità, ripetibilità e fattibilità. Al termine di questa fase, gli indicatori sono stati presentati e discussi con il mondo operativo durante appositi *stakeholder meeting*. Tra gli aspetti peculiari del progetto AWIN, risalta, infatti, il forte coinvolgimento delle parti sociali fin dalle prime fasi di stesura dei protocolli, che devono necessariamente trovare un consenso anche da parte delle associazioni di allevatori, produttori, grande distribuzione e consumatori finali. Al fine di ottenere il *feedback* più ampio possibile, è stata inoltre aperta una consultazione via web per ciascuna specie di interesse del progetto, in modo da raccogliere le opinioni del mondo operativo. La *survey* è stata disponibile al pubblico per 15 mesi su diversi siti istituzionali, oltre che sul sito del progetto, ed ha permesso di raccogliere 261 questionari compilati. La maggior parte dei questionari ha riguardato la specie equina (40% dei questionari, compilati prevalentemente da proprietari di cavalli) e quella ovina (30% dei questionari, compilati prevalentemente da veterinari ed allevatori). I risultati della *survey* sono stati decisamente positivi, in quanto hanno confermato una buona concordanza tra gli indicatori più promettenti individuati da AWIN e gli indicatori suggeriti dagli *stakeholder*. Questo fa ben sperare in una buona accettazione dei protocolli finali da parte del mondo operativo.

IL PROTOCOLLO PER LE CAPRE - La messa a punto del prototipo di protocollo per la valutazione del benessere nella specie caprina è stata affidata all'Universidade Técnica de Lisboa (Portogallo), sotto la guida del Prof. George Stilwell, con la collaborazione del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET) dell'Università degli Studi di Milano.

Durante il primo meeting, tenutosi a Milano nel novembre 2011, gli esperti di capre del progetto AWIN si sono incontrati e hanno concordato di concentrarsi nella messa a punto di un protocollo per allevamenti intensivi di capre da latte. Tale scelta è stata supportata dal fatto che questa tipologia di allevamento è attualmente la più diffusa in Europa. Si è scelto di focalizzare il protocollo sulle capre adulte in lattazione; tuttavia, ben riconoscendo l'importanza del benessere anche per i becchi e per gli animali giovani, si ipotizza di poter sviluppare ulteriormente il protocollo entro la fine del progetto, adattandolo a queste categorie di animali.

Durante il primo meeting sono inoltre stati discussi i potenziali indicatori individuati tramite la precedente revisione bibliografica (Battini et al., submitted), al fine di individuare i più promettenti e di selezionare le azioni future da intraprendere all'interno del progetto, secondo lo schema operativo riportato in Fig. 2.

Gli indicatori testati e validati sono quindi stati inclusi nel prototipo. Per ciascuno di questi indicatori, è stato preparato del materiale di *training*, che comprende una sintetica definizione dell'indicatore e di come deve essere rilevato, oltre a una serie di esempi e di test di autovalutazione. Questo materiale è servito a garantire una formazione comune a tutti gli osservatori italiani e portoghesi coinvolti nel successivo testaggio dei prototipi. La formazione è stata effettuata mediante il suddetto materiale, seguita da un periodo di *training* teorico-pratico di una settimana, al fine di ottenere una buona concordanza tra osservatori. Il materiale di *training* relativo agli indicatori che verranno inclusi nel protocollo finale, dopo la fase di testaggio del prototipo, sarà reso pubblico sul sito del progetto, per favorire la formazione di tutti gli operatori che vorranno in futuro utilizzare i protocolli.

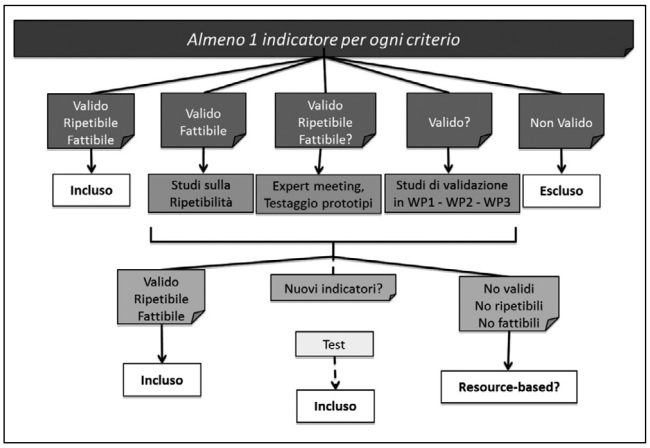


Figura 2 - Rappresentazione schematica del processo di selezione degli indicatori più promettenti da includere nei protocolli.

Il prototipo prevede innanzitutto che, prima di visitare l'azienda da ispezionare, l'operatore raccolga una serie di informazioni preliminari, quali il numero di capre in lattazione e di box presenti e l'ora di somministrazione del pasto principale.

È importante verificare che il giorno previsto per la visita sia un normale giorno di lavoro (escludendo quindi le giornate in cui si prevede, per esempio, di formare nuovi gruppi, di effettuare vaccinazioni o visite veterinarie, ecc.).

Al fine di rendere più fattibile e di rapida esecuzione l'applicazione del protocollo, le osservazioni vengono realizzate su un unico recinto di capre adulte in lattazione, anche se in azienda sono presenti più recinti. Questa decisione deriva dai risultati delle indagini preliminari in quattro grandi allevamenti, che hanno confermato

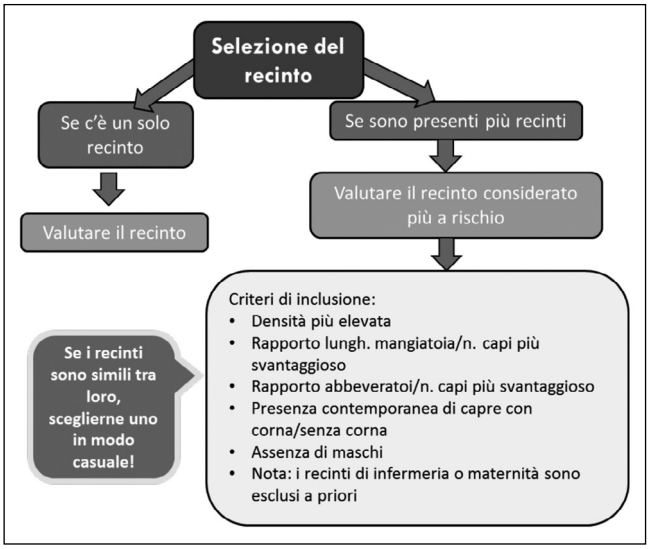


Figura 3 - Criteri di selezione del recinto da osservare.

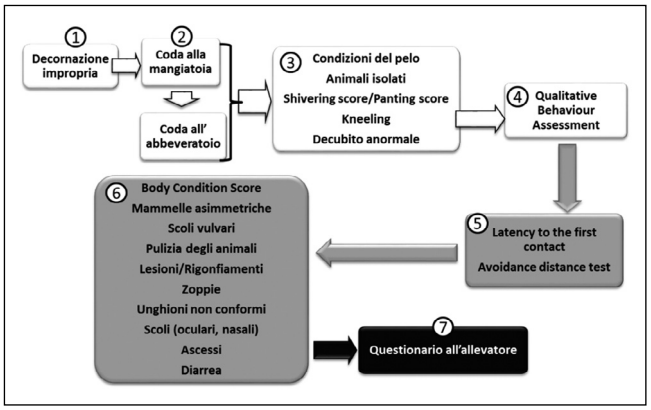


Figura 4 - Sequenza di rilevamento degli indicatori nel prototipo di protocollo AWIN per la valutazione del benessere nelle capre.

l'assenza di differenze tra recinti all'interno di ogni singola azienda, relativamente a una serie di indicatori di benessere (Vieira et al., 2012). In ogni caso, al fine di minimizzare il rischio di falsi negativi, è prevista una selezione del recinto da osservare, basata su specifici criteri di rischio (Fig. 3). Le visite vanno sempre effettuate in assenza di maschi all'interno del recinto, in quanto la loro presenza può influenzare negativamente il risultato di alcuni test, in particolare per la valutazione del rapporto uomo-animale.

Il protocollo è suddiviso in sette fasi principali di rilevamento di indicatori *animal-based*, e di un'ulteriore fase che prevede la somministrazione di un questionario all'allevatore, per il rilevamento di parametri relativi a strutture e gestione (*resource-based*); le osservazioni iniziano immediatamente dopo la somministrazione dell'alimento e si susseguono seguendo lo schema illustrato nella Fig. 4. L'ordine di rilevamento dei vari indicatori è rigido e non casuale, ma è stato ideato con l'intento di garantire un flusso continuo di raccolta, riducendo al minimo il disturbo sia per gli animali sia per l'allevatore, e soprattutto per garantire che i risultati delle osservazioni comportamentali non siano influenzati da operazioni di manipolazione o da altre fonti di disturbo. Questo è il motivo per cui, per esempio, tutti i dati comportamentali vengono rilevati dall'esterno del recinto, arrecando quindi il minimo disturbo possibile agli animali.

Le prime quattro fasi si eseguono stando al di fuori del recinto, minimizzando il disturbo agli animali e mantenendo inalterata la routine aziendale. Per le ultime due fasi è invece necessario entrare nel recinto, sia per l'esecuzione dei test per la valutazione del rapporto uomo-animale, sia per il rilevamento di dati sanitari individuali.

Il primo indicatore, facilmente rilevabile dall'esterno quando le capre hanno la testa nella rastrelliera della mangiatoia, è la presenza di capre decornate in modo scorretto o incompleto. Nei successivi 15 minuti, viene contato a intervalli di 1 minuto il numero di capre che non riescono ad avere accesso alla mangiatoia e vengono quindi definite in coda. Dal momento in cui la prima capra inizia a bere, vengono inoltre contate per altrettanti 15 minuti (sempre a intervalli di 1 minuto) le capre in coda all'abbeveratoio (queste osservazioni si sovrappongono spesso, almeno parzialmente, alle osservazioni sulle code in mangiatoia). Subito dopo, muovendosi lentamente all'esterno del recinto, viene contato il numero di capre con pelo in cattive condizioni, di capre isolate (*oblivious animals*), di quelle che si presentano con arti anteriori piegati e posteriore sollevato e che camminano o restano in stazione in questa posizione (*kneeling*) o di quelle che manifestano sintomi di stress termico da caldo (*panting*) o da freddo (*shivering*). Al termine, di questi rilievi, sempre dall'esterno del recinto, le capre vengono osservate per almeno 10 minuti (massimo 20 minuti, se sono necessari più punti di osservazione a causa delle dimensioni del recinto) per la valutazione qualitativa del comportamento (QBA, *Qualitative Behaviour Assessment*; Grosso et al., 2014).

La fase successiva si svolge all'interno del recinto per effettuare i test di valutazione del rapporto uomo-animale, che consistono nella misurazione del tempo di latenza al primo contatto da parte di una capra nei confronti dell'operatore e nell'effettuazione del test di evitamento (Mattiello et al., 2010).

L'ultima fase di rilievo di indicatori diretti riguarda il BCS e gli indicatori sanitari (presenza di lesioni e gonfiori, presenza di scoli vulvari, nasali ed oculari, conformazione degli unghioni, presenza di mammelle asimmetriche, pulizia degli animali, presenza di ascessi e di sintomi di diarrea), che vengono valutati sui singoli soggetti. Questa fase può richiedere un tempo piuttosto lungo, soprattutto se il numero di animali presenti nel recinto è elevato e se non sono presenti strutture di cattura per gli animali. Per ridurre il tempo di esecuzione entro tempi accettabili, per questa fase si è optato per una strategia di campionamento analoga a quella utilizzata nel progetto Welfare Quality® per le bovine da latte, che prevede l'ispezione di un numero di animali proporzionale alla numerosità del recinto, con percentuali che variano dal 100% dei soggetti (nei recinti con meno di 30 animali) a un minimo di 25% dei soggetti presenti, nei recinti con più di 150 animali. Purtroppo, le condizioni operative non consentono una vera e propria scelta casuale degli individui da valutare. Tuttavia, gli osservatori vengono istruiti a camminare nel recinto per selezionare le capre da valutare nel modo più casuale possibile.

Infine, viene richiesta la collaborazione dell'allevatore per rispondere ad un breve questionario, che contiene domande relative alle caratteristiche generali dell'azienda, alle strutture, alle modalità di gestione e ai principali dati produttivi e riproduttivi aziendali (età media delle capre in lattazione, numero medio di parti/capra, numero medio di giorni in mungitura, valore medio annuale della carica di cellule somatiche, quantità di latte prodotto per lattazione).

Per la raccolta dei dati relativi ai prototipi, il WP1 ha messo a punto un sistema digitalizzato, che si basa sull'utilizzo del programma *open-source "Open Data Kit"* (ODK), sviluppato dalla *University of Washington, Department of Computer Science and Engineering*. Questo programma funziona su sistema operativo Android e permette una facile e rapida registrazione dei dati, che vengono memorizzati e inviati ad un server centrale, risparmiando tempo, evitando errori di trascrizione e rendendo i risultati facilmente disponibili ed utilizzabili. L'applicazione si è dimostrata molto utile, flessibile e di facile utilizzo, senza necessità di lunghi tempi per la formazione (Dai et al., 2014).

La scelta del campione di aziende in cui effettuare il testaggio del prototipo in Portogallo è stata effettuata sulla base del *data base* nazionale, mentre in Italia la selezione è avvenuta grazie alla preziosa collaborazione del Servizio di Assistenza Tecnica agli Allevatori (SATA) della Regione Lombardia. Sono stati inclusi nel campione allevamenti di varie dimensioni (da quelli più piccoli, con meno di 50 capre adulte, fino a quelli più grandi, con più di 1.000 capre adulte), al fine di verificare la fattibilità in differenti situazioni gestionali.

CONCLUSIONI - Il prototipo proposto è stato testato in 60 allevamenti di capre da latte (30 in Italia e 30 in Portogallo). In 20 di questi allevamenti (10 in Italia e 10 in Portogallo), i rilievi sono stati effettuati in contemporanea da due operatori, al fine di poter testare la ripetibilità tra osservatori; inoltre, 20 allevamenti (10 in Italia e 10 in Portogallo) sono stati visitati sia in inverno che in estate dal medesimo osservatore, al fine di valutare la ripetibilità tra stagioni.

I dati raccolti sono ancora in fase di elaborazione. Sulla base dei risultati preliminari ottenuti, prevediamo una semplificazione ed un accorciamento dei tempi di esecuzione del protocollo, che mirano a migliorare la fattibilità, senza però perdere informazioni essenziali. In quest'ottica, il progetto AWIN prevede che i protocolli finali si articolino su due livelli: un primo livello di raccolta dati, molto rapido e di facile utilizzo, ed un eventuale secondo livello di approfondimento, da realizzarsi solo nel caso in cui nel primo livello si evidenzino possibili carenze o problematiche di benessere. Gli in-

dicatori di primo e secondo livello verranno selezionati sulla base dei risultati del testaggio dei prototipi.
I protocolli finali saranno disponibili entro la fine del progetto, prevista per aprile 2015.

RINGRAZIAMENTI - Gli autori ringraziano il 7° Programma Quadro dell'Unione Europea (FP7-KBBE-2010-4) per aver finanziato il progetto "AWIN – Animal Welfare Indicators".

A protocol for welfare assessment in goats: results from the awin project

Key words: welfare, health, goat, animal-based indicators.

Bibliografia

Bartussek H. (2001), An Historical Account of the Development of the Animal Needs Index ANI-35L as Part of the Attempt to Promote and Regulate Farm Animal Welfare in Austria: An Example of the Interaction Between Animal Welfare Science and Society. Acta Agricoltura Scandinavica, Section A Animal Science 51 (30): 34-41.

Battini M., Vieira A., Barbieri S., Stilwell G., Mattiello S. (submitted), Animal-based indicators for on-farm welfare assessment for dairy goats: a review. Journal of Dairy Science.

Blokhuis H.J., Jones R.B., Veissier I., Geers R. (2006), COST Action 846 Measuring and Monitoring farm animal welfare. K.U. Leven.

Capdeville J, Veissier I. (2001), A method of assessing welfare in loose house dairy cows at farm level, focusing on animal observatins. Acta Agricoltura Scandinavica, Section A Animal Science; Suppl. 30: 62-68.

Dai F., Dalla Costa E., Battini M., Barbieri S., Minero M., Mattiello S., Canali E. (2014), An innovative tool for on-farm data collection and information sharing. WAFL Conference, Clermont-Ferrand, France (abstract).

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2012a), Scientific Opinion on the use of animal-based measures to assess welfare of dairy cows. EFSA Journal; 10(1): 2554, 81.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) (2012b), Scientific Opinion on the use of animal-based measures to assess welfare in pigs. EFSA Journal; 10(1): 2512, 85.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2012c), Statement on the use of animal-based measures to assess the welfare of animals. EFSA Journal; 10(6): 2767, 29.

Grosso L., Battini M., Wemelsfelder F., Barbieri S., Minero M., Dalla Costa E., Mattiello S. (2014), Qualitative Behavioural Assessment of intensive and extensive goat farms. 48th ISAE Congress, 29/07/14-02/08/14, Vitoria-Gasteiz, Spain (abstract).

Main D.C.J., Kent J.P., Wemelsfelder F., Ofner E., Tuyttens F.A.M. (2003), Applications for methods of on-farm welfare assessment. Animal Welfare 12: 523-528.

Mattiello S., Battini M., Andreoli E., Minero M., Barbieri S., Canali E. (2010), Technical note. Avoidance distance test in goats: A comparison with its application in cows. Small Ruminant Research; 91: 215-218.

Sundrum A., Andersson R., Postler G. (1994), Tiergerechth itsindex – 200: Ein Leitfaden zur Beurteilung von Haltungssystemen. Institüts für Organischen Landbau der Universität Bonn, 211 pp.

Tosi M.V., Canali E., Gregoretti L., Ferrante V., Rusconi C., Verga M., Carenzi C. (2001), A descriptive analysis on welfare indicators measured in Italian dairy farms: preliminary results. Acta Agricoltura Scandinavica, Section A Animal Science; Suppl. 30: 69-72.

Vieira A., Battini M., Ajuda I., Mattiello S., Stilwell G. (2012), Set up of a sampling strategy for the collection of animal-based welfare indicators during milking. Proceeding of XI International Conference on Goats, 23-27 September 2012, Las Palmas, Gran Canaria (Spain) (abstract).

Welfare Quality® Protocol (2009a), Welfare Quality® Assessment Protocol for pig (sows and piglets, growing and finishing pigs), Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands, 122 pp.

Welfare Quality® Protocol (2009b), Welfare Quality® Assessment Protocol for cattle. Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands, 180 pp.

Welfare Quality® Protocol (2009c), Welfare Quality® Assessment Protocol for poultry (broilers, laying hens). Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands, 114 pp.

Welfare considerations and dilemmas in small ruminant emergency medicine

G.C. FTHENAKIS

Veterinary Faculty, University of Thessaly, Karditsa, Greece

Key words: emergency medicine, goat, notifiable disease, peri-parturient period, sheep, welfare.

Emergency medicine is the scientific field involved in providing rapid and effective veterinary and nursing care in cases threatening the life of animals and/or their health and production.

In small ruminants, 'emergency medicine' includes emergency medicine in individual sheep/goats and emergency medicine in sheep/goat populations. In practicing emergency medicine in small ruminant health management, one always takes into account financial constraints, as well as the welfare of sick or at risk to become sick animals.

Emergency medicine in individuals aims to treating disease problems with an immediate risk for the life of animals. These can refer to problems in young (e.g., neonatal hypothermia) or adult (e.g., dystocia, urethral obstruction) animals and can be dealt with by using knowledge from various veterinary specialities (e.g., anaesthesiology, obstetrics, neurology, surgery).

Emergency medicine in populations aims to control various diseases with a risk to the animals of a farm or a geographical region. Moreover, it functions as a safety net for animal production. These diseases may be of endemic (e.g., cases of abortion), epidemic (e.g., blue-tongue disease) or emerging (e.g., Schmallenberg disease) nature and can be dealt with by using knowledge from various scientific fields (e.g., diagnostic medicine, epidemiology, preventive medicine).

In all circumstances, consideration should be taken that welfare status of individuals must be maintained to a standard appropriate for those individuals at that moment. The traditional 'cost-benefit' analysis will need to be extended to take into account facets beyond the traditional financial implications, to a meaning that includes the degree of sufferring acceptable to the affected animals, as well as taking into account that positive outcomes of treatment are by no means certain.

The peri-parturient period is a time in the life of a ewe or doe when most emergency problems would arise. This is mainly due to the pressure in the metabolism of the pregnant animal and the specific financial circumstances at that stage. Pregnancy toxaemia, abortion, dystocia, hypocalcaemia (among others) require an immediate action from a veterinarian. Nevertheless, there are circumstances, in which the scientific literature indicates an unfavourable prognosis. For example, in pregnancy toxaemia, these include the development of neurological signs in the ewe and the *in utero* death of foetus(es). Therapeutic efforts need to take place for a long period and can often be unsuccessful; at the same time, veterinary expenses can be high, but unrewarding to the farmer. Moreover, in such cases, welfare status of the affected animal is reduced and, possibly, may never be restored. The attending veterinarian will need to take a professional decision, based on her scientific background: is effective treatment a feasible option or is euthanasia the best approach for the welfare of the affected animal?

The first days of life of a sheep/goat will be the most stressful period in the life of that animal. A variety of adverse conditions, often caused or predisposed by inappropriate management (e.g., liver rupture, hypothermia, dislocation) can affect newborns, reducing their welfare status and requiring immediate veterinary care. Again, some of these disorders, depending on the severity of each condition, may have an adverse prognosis, which will require from the attending veterinarian a welfare evaluation. Moreover, in those scenarios, diseased animals have a little financial value and, moreover, have thatfar produced no economic benefits to the farmer. The attending veterinarian will need to make a professional decision, based on her scientific background: is effective treatment an option that will compensate the farmer financially in the future or is euthanasia the preferred approach for financial viability of the farm?

In emergency medicine in populations, there are many examples (e.g., foot-and-mouth disease, sheep pox), in which healthy individuals, with generally acceptable standards of welfare, are accounted for euthanasia. This occurs within the appropriately defined surveillance areas. The attending veterinarian will need to make a professional decision, based on her scientific background: is euthanasia of the defined cohort a means to control the disease or, possibly, euthanasia of a much larger number of animals would be required in the future?

Initially, in all cases, accurate and rapid diagnosis of the problem is paramount. This should be followed by analysis of the situation and evaluation of the various remedial options. Consideration of the welfare status of the animals, coupled with prognosis of the probabilities for recovery, as well as the time-scale for achieving full recovery needs to be an integral element of the decision process. That way, emergency responses are correct and promote welfare status of individual animals or populations of animals.

WORKSHOP CON GLI ALLEVATORI

La valorizzazione delle lane autoctone: allevatori ed esperti a confronto

Percorsi di innovazione per valorizzare le lane e i colori del Mediterraneo. Il progetto MED-Laine/MED-L@ine

E. VAGNONI, E. CAMPUS, F. CAMILLI, P. DUCE

Istituto di Biometeorologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche - IBIMET CNR

Parole chiave: lane locali, sviluppo rurale, competenze, innovazione.

INTRODUZIONE - La redditività, se non la stessa sopravvivenza, di molte attività imprenditoriali legate agli usi tradizionali di materie prime di origine agricola è fortemente condizionata dalla capacità di (auto)rinnovamento dei modelli produttivi e dall'accesso a mercati più remunerativi. Oggi più che mai la competitività delle piccole e medie imprese rurali dipende dalle soluzioni tecnologiche che il mondo della ricerca saprà offrire in termini di miglioramento della sostenibilità e d'innovazione dei processi produttivi. Le esperienze di successo ci insegnano che non occorre rinunciare o stravolgere il "carattere identitario" di ciascun sistema produttivo, ma, viceversa, è essenziale trovare soluzioni che esaltino i legami tra prodotti, ambiente e territorio. In questo ambito, la filiera delle lane italiane costituisce indubbiamente un caso emblematico. A fronte di una produzione media annuale di circa 9 mila tonnellate di lana di pecora, appena il 5% delle lane prodotte in Italia trova una collocazione commerciale accettabile. Il resto viene svenduto, smaltito o ancora peggio abbandonato/bruciato nei campi. Nel giro di pochi decenni la lana è passata dall'essere una risorsa preziosa - fonte di reddito per tutti gli attori della filiera - a costituire un ingombrante e oneroso scarto di produzione. Le cause del tracollo, per quanto molteplici e complesse, sono fondamentalmente riconducibili all'evoluzione del settore tessile italiano che ha rappresentato, storicamente, lo "sbocco naturale" della produzione laniera, anche di quella meno pregiata. L'avvento di nuove fibre (in maggioranza sintetiche) che hanno sostituito quasi del tutto la lana di pecora e, prima ancora, la forte pressione competitiva dei grandi produttori (Australia, Cina e Nuova Zelanda concentrano oltre la metà della produzione mondiale di lana) hanno segnato, irrevocabilmente, il destino delle lane locali. La Sardegna, una regione con forti radici agro-pastorali e con circa il 45% del patrimonio ovino nazionale, non fa eccezione. Di fatto, se la tosatura non rappresentasse una pratica obbligatoria per garantire la salute e la produttività delle greggi (allevati per ricavarne latte e carne), la maggioranza degli allevatori rinuncerebbe volentieri alla produzione di lana.

La gestione della lana negli allevamenti ovini rappresenta, pertanto, un problema tanto urgente quanto inevitabile. E il rilancio, su nuove basi, del comparto tessile tradizionale rimane una sfida aperta per l'intera economia italiana. Aldilà della crisi dei mercati, la lana rimane un materiale naturale a basso costo e facilmente rinnovabile: racchiude in sé una vastissima gamma di usi potenziali pienamente sostenibili che le conoscenze tecniche e scientifiche possono aiutare a tradurre in opportunità di reddito per le imprese e di sviluppo socio-economico per le aree rurali marginali. Un reale processo di innovazione richiede l'abbattimento di ogni barriera pregiudiziale e la totale apertura verso qualsiasi tipo di contributo che possa rappresentare un valore aggiunto allo sviluppo delle conoscenze sinora disponibili. La ricerca scientifica può e deve recitare un ruolo di primo piano, indicando strategie sostenibili e soluzioni tecnologiche trasferibili che contribuiscano all'innovazione del settore. A tal fine, appare cruciale capitalizzare le esperienze e le competenze presenti nei territori e investire in nuove progettualità che sappiano integrare le esigenze di crescita economica immediata del tessuto produttivo con la lungimiranza dello sviluppo sostenibile. La verifica della sostenibilità economica e ambientale dei processi produttivi deve necessariamente costituire l'unico criterio guida per la ricerca degli usi ottimali della lana, dal tessile tradizionale, alla bioedilizia, ai *fine chemicals*. Nessuna ipotesi è da scartare aprioristicamente né, tantomeno, una soluzione preclude l'altra, semmai l'arricchisce e la integra.

Muovendo da tali premesse, l'Istituto di Biometeorologia del CNR (IBIMET CNR) ha, da tempo, avviato una linea di ricerca che partendo dalla valorizzazione di specie vegetali ad uso *no food* intende contribuire allo sviluppo della filiera tessile promuovendo approcci innovativi orientati alla sostenibilità. E il progetto MED-Laine/MED-L@ine rappresenta l'esperienza più significativa di questo percorso. In realtà o almeno formalmente, si tratta di due progetti distinti aventi in comune il seguente obiettivo generale: valorizzare le lane autoctone/locali, rivitalizzare la filiera tessile-laniera e promuovere i territori rurali con il turismo culturale e educativo-didattico. Il (primo) progetto MED-Laine, "*À la recherche des couleurs et des tissus de la Méditerranée*" ha avuto inizio nel maggio 2009 ed è terminato a dicembre 2011, utilizzando un budget complessivo di 857.000 €. Il progetto MED-L@ine, "Reti di competenze e innovazione per valorizzare le lane e i colori del Mediterraneo", proposto come iniziativa di capitalizzazione e sviluppo dei risultati raggiunti dall'esperienza precedente, è iniziato a luglio 2013 e si concluderà a giugno 2015 (budget: 1.792.190 €). Entrambe i progetti sono co-finanziati dal Fondo Europeo di Sviluppo Regionale nell'ambito del Programma di Cooperazione Transfrontaliera Italia-Francia "Marittimo" 2007-2013. La strategia d'intervento fa leva sull'innovazione dei sistemi produttivi tradizionali e la ricerca di nuovi usi della lana, integrati sinergicamente con azioni di promozione e di valorizzazione delle aree rurali. In particolare, gli obiettivi immediati riguardano: i) la crescita della consapevolezza e del protagonismo degli allevatori ovini all'interno della filiera e la valorizzazione del loro ruolo in termini economici; ii) promuovere l'innovazione tecnologica e creare opportunità di accesso a nuovi mercati per le PMI di trasformazione e commercializzazione di lane e dei prodotti da esse derivati; ii) promuovere lo sviluppo turistico di aree rurali marginali ad alto valore storico e ambientale. In funzione dell'impianto strategico del Progetto, si è costituito un partenariato che rappresentasse le competenze tecniche e istituzionali necessarie per garantire piena sostenibilità all'iniziativa. Il gruppo di partenza ha coinvolto: i centri di ricerca IBIMET CNR (capofila del Progetto) e Agris-Sardegna (agenzia della Regione Sardegna per la ricerca e l'innovazione tecnologica in Agricoltura), le amministrazioni provinciali di Grosseto, Sassari e Medio Campidano, le imprese rappresentate dalla Camera dei Mestieri e dell'Artigianato dell'Alta Corsica. Nella seconda fase (MED-L@ine) si è rafforzata la partecipazione delle imprese con l'ingresso di un'associazione di allevatori e una ditta di trasformazione della Sardegna.

MATERIALI E METODI: LE PRINCIPALI ATTIVITÀ SVOLTE - In coerenza alla strategia di intervento adottata, le attività progettuali si sono articolate nei seguenti settori operativi:

Filiera delle lane locali.

- Analisi SWOT e identificazione di strategie di sviluppo del comparto laniero, attraverso indagini partecipative, *focus group* e interviste in profondità con gli *stakeholders* dei territori di Sardegna, Alta Corsica e provincia di Grosseto;

- Approfondimento degli studi per la selezione, il recupero e la certificazione di razze ovine autoctone (Pecora Nera di Arbus, Amiatina e Vissana);
- Analisi strumentali per la caratterizzazione chimico-fisica di lane ottenute da razze autoctone e analisi delle proprietà meccaniche dei tessuti da esse derivate;
- Messa a punto e applicazione di un protocollo di analisi sensoriale per la valutazione delle caratteristiche tattili di lane in fiocco da razze autoctone e tessuti da esse derivate;
- Definizione di un sistema di tracciabilità dei prodotti ad uso del settore tessile-tintorio;
- Realizzazione di prototipi di capi di abbigliamento e complementi di arredo in lana colorata con estratti di specie vegetali locali;
- Sistematizzazione delle indagini svolte in pubblicazioni tecniche e scientifiche.

Filiera delle piante officinali ad uso tintorio

- Individuazione delle specie vegetali locali ad uso officinale e tintorio;
- Messa a punto di un metodo di estrazione e ottimizzazione dei fitoestratti mediante impianti semi-industriali;
- Studio e sperimentazione delle proprietà funzionalizzanti (antitarmiche, anti-UV, anti-radicaliche e anti-microbiche) dei fitoestratti;
- Elaborazione di linee guida per studi di *Life Cycle Assessment* della filiera produttiva;
- Pubblicazioni tecnico-scientifiche per la divulgazione dei risultati ottenuti.

Marketing territoriale e promozione del turismo rurale e culturale-didattico

- Azioni di networking dei territori;
- Eventi di animazione territoriale e di comunicazione/ informazione finalizzati al trasferimento di conoscenze e all'interscambio di buone pratiche;
- Progettazione e realizzazione di percorsi/eventi di promozione del turismo culturale e didattico integrati alla filiera tessile-laniera;
- Analisi economiche e valutazione dei mercati dei prodotti in lana;
- Definizione e sviluppo di un modello integrato di marketing territoriale;
- Concorso di idee per la progettazione di prodotti innovativi realizzati con l'impego di lane locali e coloranti vegetali.

Le metodologie utilizzate in ogni ambito d'intervento sono state orientate dai criteri della ricerca-azione e sono state sviluppate con il pieno coinvolgimento degli attori locali, seguendo un approccio altamente partecipativo (*learning by doing*).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI: IMPATTI E NUOVE SFIDE

- Le attività di studio, ricerca e promozione dei territori condotte nell'ambito di MED-Laine hanno consentito sia di sviluppare e approfondire conoscenze di tipo tecnico-scientifico, sia di tessere una fitta rete di relazioni/interscambi con i principali attori delle filiere produttive. Le esperienze acquisite attraverso il Progetto riguardano molteplici tematiche e livelli di azione. Sul piano tecnico-scientifico, le conoscenze prodotte e diffuse per la riscoperta e valorizzazione delle lane locali e delle piante officinali mediterranee hanno ampliato e valorizzato nuovi scenari di ricerca e sviluppo per l'uso redditizio, sostenibile e integrato delle risorse lana e flora spontanea. Inoltre, le indagini partecipative sulla struttura della filiera laniera e sui modelli di marketing territoriale ad essa correlati hanno confermato le reali possibilità di crescita del settore sia in termini produttivi che commerciali. Dal punto di vista socio-economico e istituzionale, le attività di animazione territoriale e l'intera esperienza del Progetto hanno permesso di consolidare il ruolo dei partner coinvolti all'interno delle strategie di sviluppo promosse e di elevare il grado di consapevolezza degli operatori privati rispetto alle opportunità di reddito derivanti dall'innovazione di un settore tradizionale (apparentemente) decaduto e nei confronti del loro stesso ruolo e protagonismo nel promuovere tale processo. Dalla sistematizzazione dei risultati progettuali, è emerso chiaramente come il raggiungimento degli obiettivi di lungo periodo e la stessa sostenibilità dei risultati immediati dipendano fortemente dalla stretta cooperazione tra i differenti attori istituzionali e socio-economici che fanno parte e/o interagiscono sinergicamente con la filiera produttiva. Di fatto, uno degli elementi di efficacia del progetto è senz'altro la proficua collaborazione inter-istitituzionale e l'approccio di tipo *bottom-up*, adottato in ogni momento decisionale e fase operativa. L'interazione tra Centri di ricerca, Enti locali e settore privato, la costante attenzione verso l'attivo coinvolgimento dei gruppi meta e la concretezza dei risultati progettuali hanno radicato MED-Laine nel tessuto socio-economico locale, alimentando un crescente interesse verso le tematiche promosse. Si evidenzia, in particolare, che nel 2011 il prezzo medio di vendita della lana sucida nel mercato locale è cresciuto di oltre il 100% rispetto al valore medio del 2009. Per quanto si tratti di un dato da contestualizzare nel trend di generale crescita del mercato internazionale della lana, l'effetto positivo indotto nel mercato locale dalle azioni del Progetto appare, verosimilmente, rilevante. La nascita, in Sardegna, di un consorzio per la raccolta e vendita della lana (nella prima campagna sono stati raccolti oltre 3.500 t di lana da circa 700 produttori) né rappresenta la testimonianza (e causa) più diretta.

Sul piano istituzionale è da sottolineare la firma di un protocollo di intesa tra la Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura del Nord Sardegna, la Provincia di Sassari e IBIMET CNR, volto alla promozione della continuità e al rafforzamento del progetto MED-Laine e la stipulazione di un Accordo Quadro di Cooperazione tra la province di Sassari e Grosseto, finalizzato alla valorizzazione congiunta delle zone interne e delle principali produzioni agricole e artigianali di carattere identitario dei due territori. Tale accordo, firmato, non casualmente in occasione della conferenza finale del progetto MED-Laine, s'inquadra nello storico vincolo di amicizia tra le due Province (nella Provincia di Grosseto è forte la presenza di emigrati sardi e/o loro discendenti, originariamente e ancora oggi in gran parte impegnati nell'allevamento ovino), che MED-Laine ha saputo valorizzare, promuovendo la sinergia tra i sistemi produttivi agricoli integrati ed il turismo rurale nelle aree d'intervento.

La strategia di comunicazione e divulgazione, per quanto essenziale nella dotazione di risorse finanziarie e di strumenti, ha saputo essere efficace e la forza comunicatrice dei risultati (tangibili) conseguiti è stata determinante. La presenza di pubblico ad ogni evento promosso dal Progetto - sia di carattere formativo e/o per il trasferimento tecnologico, sia di natura informativa e divulgativa - è stata sempre numerosa e partecipata. Nei cosiddetti "tavoli tecnici" per la raccolta e l'interscambio di informazioni sulle filiere tessili, artigianali e del turismo sono stati coinvolti oltre 500 rappresentanti del settore pubblico e privato, ogni seminario di presentazione dei risultati progettuali (tra seminari ed attività di animazione territoriale si sono realizzati 16 eventi) ha visto la partecipazione, in media, di circa 70 persone. Un ulteriore indicatore della capacità di penetrazione del Progetto, è rappresentato dall'elevato numero di domande di partecipazione ricevute nell'ambito del concorso di idee per la progettazione di prototipi in lana sarda (denominato "Pura Lana Sarda"). Inoltre, l'analisi delle visite al sito internet del Progetto (medlaine.eu) – realizzato con funzionalità essenziali e ricorrendo a risorse interne - nel periodo compreso tra luglio 2011 e febbraio 2014 (perciò, ben oltre la chiusura ufficiale) ha rivelato quanto segue:

- un totale di 3.400 visitatori di cui oltre 2.160 visitatori unici;
- quasi 12.000 visualizzazioni della pagina con una durata media della visita di circa 3,5 minuti;
- una frequenza di rimbalzo (rapida uscita dal sito) ben al di sotto del 50%;
- oltre il 31% di accessi diretti (non effettuati attraverso motori di ricerca o link di altri siti) e una media del 64% di nuove visite;
- la provenienza geografica dei visitatori copre quasi tutti i continenti (Europa, su tutti, insieme ad Australia, Nuova Zelanda, Americhe e Asia).

Gli impatti positivi generati nei territori di implementazione del progetto MED-Laine sono stati riconosciuti e apprezzati anche in ambito europeo. MED-Laine è stato selezionato tra i finalisti del RegiostarsAwards 2013, il concorso promosso dalla CE per valorizzare i migliori progetti finanziati da tutti i programmi dell'UE. Nell'ambito della categoria *Sustainable Growth*, MED-Laine è stato l'unico progetto del Mediterraneo ad arrivare sino alla fase finale del Concorso.

In estrema sintesi, i fattori di successo di MED-Laine posso essere così schematizzati:

- passione, competenze e umiltà come principi cardine delle scelte strategiche e delle azioni intraprese;
- dialogo e confronto per superare le inevitabili difficoltà di coordinamento e implementazione delle attività;
- costante orientamento verso azioni e risultati cantierabili e di impatto immediato nell'economia locale;
- organizzazione, coordinamento e gestione efficienti per rispondere puntualmente alle esigenze emerse nell'evoluzione del contesto operativo.

Il Progetto ha rappresentato, indubbiamente, un'esperienza positiva ed ha offerto un piccolo ma significativo contributo, fatto non solo di entusiasmo e speranza, per un effettivo rilancio del comparto laniero. Ma per passare da una fase pilota a una scala aziendale con effetti moltiplicatori stabilmente proiettati nel lungo periodo, la strada da percorrere è, tuttavia, ancora in salita. Tra i principali problemi e carenze strutturali messi in luce da MED-Laine si citano:

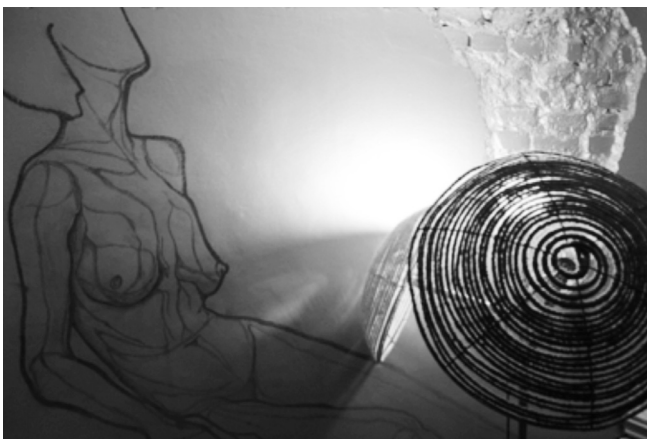
- Frammentazione e scarso coordinamento tra gli operatori di settore;
- Mancanza di infrastrutture di supporto allo sviluppo delle filiere produttive;
- Necessità di un marchio comune per tutelare le produzioni locali;
- Obsolescenza tecnologica e scarsa efficienza ambientale dei sistemi di trasformazione della lana;
- Debolezza della strategie di marketing e di comunicazione.

Raccogliendo l'eredità del successo e puntando alla soluzione delle problematiche emerse dalla prima esperienza, il partenariato MED-Laine ha rilanciato la sfida. Aggiungendo caratteri innovativi alla proposta originaria e ampliando la base socio-istituzionale del progetto. Le parole chiave - simbolicamente rappresentate dalla "@" di L@ine - che ispirano e sintetizzano, al contempo, la strategia operativa sono le seguenti: capitalizzazione, innovazione tecnologica, rete. Se il progetto originario ha enfatizzato gli aspetti della Ricerca per la caratterizzazione dei territori, il nuovo MED-Laine, attraverso un solido blocco di investimenti infrastrutturali, si rivolge direttamente al settore economico-produttivo, assumendo un forte carattere dimostrativo e applicativo. Da qui, deriva la scelta di coinvolgere i piccoli/medi produttori associati come Partner del progetto e di identificare chiaramente nelle microimprese e PMI locali i gruppi meta privilegiati. Il progetto prevede investimenti di natura sia immateriale, sia materiale. In generale, si tratta di interventi di piccole/medie dimensioni in grado di intercettare una quota comunque rilevante dei fabbisogni infrastrutturali dei settori locali di riferimento e che potranno avere, indubbiamente, un importante valore dimostrativo e moltiplicatore. In sostanza, MED-L@ine intende avvicinare e promuovere un percorso di collaborazione stabile e proficua tra la Ricerca e il mondo produttivo/imprenditoriale, affinché, con un approccio *win-win*, si (retro)alimenti con effettiva reciprocità lo sviluppo sostenibile del territorio. Le attività previste e già avviate comprendono:

- un centro di competenza transfrontaliero destinato al rafforzamento delle filiere laniere locali e alla messa in rete di Imprese, Enti Territoriali e Centri di Ricerca. Il centro di competenza avrà come base funzionale un portale informatico e un laboratorio chimico strumentale dedicato alle lane locali e ai prodotti tessili, agli estratti vegetali e ai prodotti da essi trasformati. Il portale informatico sarà molto più di un sito web e sarà dotato di varie funzionalità: forum di discussione, per l'interscambio di esperienze, ricerche, buone pratiche; formazione online e trasferimento di conoscenze; database centralizzato e integrazione con sistemi esterni (altri database, social networks, ecc.).
- la realizzazione, in Sardegna e in provincia di Grosseto, di infrastrutture per la logistica di raccolta e la selezione e vendita delle lane locali;
- l'installazione, in provincia di Grosseto, di un impianto di estrazione pilota per la produzione su scala aziendale di estratti vegetali da piante officinali;
- la realizzazione di un sistema web-based per l'elaborazione di guide turistiche on demand su dispositivi mobili e per l'implementazione di un servizio di marketing territoriale geo-localizzato;
- la trasmissione al pubblico delle tematiche di Progetto attraverso interventi di animazione territoriale nei siti turistici, l'organizzazione di seminari di divulgazione e la realizzazione di eventi espositivi itineranti.

L'intervento avrà, pertanto, il suo fulcro nel Centro di competenza, a cui saranno sinergicamente integrati gli investimenti aggiuntivi. Il laboratorio verrà allestito presso l'Area della Ricerca del CNR di Sassari, sarà gestito da IBIMET CNR e potrà contare sulle competenze di altri istituti CNR - ISE (Istituto per lo Studio degli Ecosistemi), ICB (Istituto di Chimica Biomolecolare), ISPAAM (Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo), ISMAC (Istituto per lo Studio delle MACromolecole) - nonché sulla collaborazione di altri centri di ricerca (Università di Sassari e Università di Firenze). Coerentemente agli obiettivi di Progetto, la strumentazione del laboratorio sarà utilizzata per attività di ricerca mirate alla definizione di migliori o nuovi usi della lana che consentano una maggiore e completa valorizzazione della materia prima. Partendo dal completamento e dall'approfondimento delle indagini di caratterizzazione delle lane locali e delle proprietà funzionalizzanti di alcune specie vegetali ad uso officinale-tintorio effettuate nel corso di MED- Laine, si esploreranno potenziali utilizzi innovativi nei campi: tessile (tessuti tecnici e "tessuti intelligenti"), bio-edile (coibentazione e mattoni autoportanti), cosmetico (proprietà emollienti lanolina e derivati), biomedicale (tessuti, filtri, ecc.), agronomico (nuovi fitofarmaci, nuovi formulanti, nuovi fertilizzanti/ammendanti), chimico (preparazione di biocatalizzatori e *bio-based fine chemicals*). Lo sviluppo di conoscenze e la fornitura di servizi di consulenza tecnico-scientifica alle imprese del territorio, includeranno, inoltre, studi di *Life Cycle Assessment* e applicazioni di *Consumer Sciences*.

L'interazione con il tessuto produttivo dei territori rimarrà l'elemento fondante della *mission* del Progetto. Il Centro di competenza agirà da polo catalizzatore dei vari attori e da nucleo di integrazione delle varie componenti operative, svolgendo anche in questo campo un importante ruolo nella promozione dell'innovazione tecnologica e dei sistemi di Qualità attraverso lo sviluppo e la diffu-



"Corbulait". Lampada in metallo e lana presentata al concorso di idee "Pura Lana Sarda" da Gabriella Loi e Ursula Grodzicka.

sione di informazioni, conoscenze tecnico-scientifiche, competenze - *expertise* e *know-how* in genere.
Ancora una volta, la sostenibilità dell'iniziativa si poggerà fortemente sulla capacità del partenariato di individuare ed applicare tutte quelle forme di collaborazione ed interazione tra gli attori chiave che abbiano finalità ed interessi comuni e condivisi anche al di fuori del territorio transfrontaliero. In questo senso, MED-L@ine è e rimarrà un cantiere sempre aperto.

Enhancing Mediterranean colors and wools by means of research and innovation. The MED-Laine/MED-L@ine project

Key words: local wool, rural development, expertise, innovation.

Bibliografia

AAVV (2011). La Lana sarda: una risorsa da riscoprire. Primi risultati di un percorso di studio e valorizzazione ispirato alla sostenibilità. ISBN 9788890221064 IBIMET CNR.

AAVV (2011). Piante officinali: un patrimonio per lo sviluppo sostenibile dei territori del Mediterraneo. ISBN 9788895597102 IBIMET CNR.

Barbo Santillo Frizell (2010). Lana carne e latte. Paesaggi Pastorali tra mito e realtà. Mario Pagliai Editore.

Camilli F., Burgassi T., 2012. Lana: rifiuto o risorsa?. Agriregionieuropa, Numero 28.

IBIMET CNR (2011). Pura Lana Sarda. Tra innovazione e tradizione.

Progetto Lane AUTOctone (Plauto)

C. CARRINO[1], E. CIANI[2], N.DIBENEDETTO[3], E. PIERAGOSTINI[4]

[1] Az. Agr. "F.lli Carrino; [2] Dip. Bioscienze Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università di Bari;
[3] Consorzio Murgia Viva; [4] DETO - Sez. Cliniche Veterinarie e Produzioni Animali

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

INTRODUZIONE - Per il 2013 sono stati censiti in Puglia 280.000 capi ovini, cui corrisponde un totale annuo di 560 tonnellate di lana. La tosa delle pecore costituisce in generale un costo ineludibile, aggravato dal fatto che la fibra ottenuta, senza mercato, deve essere eliminata come rifiuto speciale o ceduta a raccoglitori a costo irrisorio. Da qualche anno sembra che il vento stia cambiando anche se le magre cifre spuntate per la vendita sono ancora lontane dal coprire le spese di tosa.

Riscoprire le possibilità di utilizzo della lana significa riappropriarci di un pezzo della nostra storia ma, soprattutto, dare fiato all'economia di alcune realtà quali la Murgia ed il foggiano, vocate all'allevamento ovino che, insieme al relativo indotto, possono rivelarsi strategiche per uno sviluppo futuro in un momento di grande difficoltà economica quale l'attuale

Gli Autori hanno riflettuto su come riutilizzare queste lane che, spesso, per la loro tipologia e per la loro finezza hanno i requisiti per trovare compratori fra gli acquirenti abituali che producono filati e tessuti di alta qualità. Recenti esperienze, in questo senso, insegnano che una nicchia di mercato esiste e nel contempo si registrano segnali di come questa possa essere ampliata; ad esempio la FAO ha infatti dichiarato il 2009 l'anno internazionale delle Fibre Naturali. Convegni internazionali, workshop, sfilate, mostre ed eventi di vario genere sono stati tenuti in tutto il mondo, anche allo scopo di stimolare l'interesse da parte del pubblico, rafforzare le piccole e medie imprese impegnate nella sua produzione e sviluppo, nonché incoraggiare i governi a mettere in atto strategie appropriate a rafforzare questo genere di produzioni.

La riscoperta della pastorizia, anche per le ragioni dianzi richiamate, è un elemento sul quale costruire un percorso di crescita, partendo dalle tradizioni proprie della Puglia e coniugando le stesse con nuove tecnologie. La rinascita della filiera della lana tessile sarebbe un primo risultato cui potrebbe essere affiancata la possibilità di individuare altre modalità di impiego quali l'utilizzo di scarti di lana in bio-edilizia o per pacciamature innovative nell'orto-floro-vivaismo.

Sulla base di questa convinzione nel 2013 gli Autori hanno risposto all'Avviso pubblico per l'invito a presentare proposte progettuali di ricerca e sperimentazione in agricoltura (B.U.R.P. n. 59 del 02/05/2013) presentando un progetto per la valorizzazione delle lane autoctone che a seguito di selezione è stato ammesso al finanziamento che verrà erogato verso la fine del 2014.

Soggetto promotore: Il DETO è un grosso dipartimento dell'Università di Bari, cui afferiscono importanti settori della medicina e della medicina veterinaria raggruppati in sezioni; in particolare la sezione di Cliniche Veterinarie e Produzioni Animali è costituita da 34 ricercatori che vantano un nutrito pacchetto di competenze veterinarie e zootecniche tra le quali, esperienze di genetica applicata allo studio e gestione delle popolazioni autoctone pugliesi e sul benessere degli animali, assumono rilevanza specifica ai fini del Progetto. A questi si assomma la competenza nell'ambito della caratterizzazione genetica delle razze della Prof. Ciani.

Soggetti partecipanti

1. L'Az. Agr. **"F.lli Carrino"** è una storica realtà del foggiano gestita come az. agricola multifunzione (allevamento ovini, suini e bufali, caseificio, spaccio aziendale) dai tre fratelli, terza generazione di allevatori di ovini di razza Gentile di Puglia. Da sempre sostenitori della necessità di valorizzare la lana, in particolare della razza Gentile, un paio d'anni fa hanno inviato a Prato la lana aziendale avendone indietro un quantitativo di rocche utilizzate in parte per confezionare maglieria (pullover, sciarpe berretti di straordinaria. Da sempre sostenitore della necessità di valorizzare la lana, in particolare della razza Gentile, un paio d'anni fa ha inviato a Prato la lana aziendale avendone indietro un quantitativo di rocche utilizzate in parte per confezionare maglieria (pullover, sciarpe berretti di fattura straordinaria) avvalendosi di una abile artigiana di Corato. Gli oggetti sono pregevoli, ma l'esperienza si è interrotta perché la commercializzazione in azienda non è lo sbocco giusto per un prodotto artigianale di qualità.
2. La Soc. Cons. "Murgia Viva" a.r.l. è costituita da 9 soci e da diversi anni opera per la valorizzazione del patrimonio ovino e caprino, per il miglioramento dei metodi di allevamento, alimentazione, management aziendale e benessere animale, per la promozione delle risorse storiche, culturali, turistiche, enogastronomiche, ambientali e produttive legate all'identità del territorio e per favorire socialità e partecipazione nel settore agrozootecnico, realizzando attività di promozione sociale e culturale. Diverse le esperienze maturate nel campo della collaborazione scientifica con Enti Pubblici di ricerca come l'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", l'Ente Parco Nazionale dell'Alta Murgia e la Regione Puglia - Assessorato all'Agricoltura. Grazie alla disponibilità in seno al Consorzio di un Caseificio Aziendale il Consorzio produce un'ampia gamma di prodotti lattiero-caseari di altissima qualità.
3. Fondazione **"Le Costantine"** - Giulia Starace e prima ancora la madre, Carolina De Viti De Marco, hanno trasformato un'antica e preziosa tradizione, che affonda le sue radici nel passato, in un'attività organizzata capace di elevare economicamente e spiritualmente le donne di Casamassella. Nel 2002 la tessitura è stata riaperta presso la tenuta "Le Costantine". Le tessitrici del laboratorio "Cantando e amando" riprendono con maestria e dedizione le tecniche risalenti a centinaia di anni fa, come quella detta dei "pinti" e realizzano con antichi telai a quattro licci, preziosi manufatti con fibre e colori naturali o con tinture vegetali: davanti agli occhi sfilano tappeti, magnifici arazzi, borse e stole, coperte di lana pregiata, asciugamani, tovaglie, copriletti esclusivi e sciarpe in cashmere con vecchi motivi o disegni più attuali. Ogni prodotto realizzato dalle donne di Casamassella è contrassegnato da un'etichetta, a garanzia di eccellenza e qualità, pronta a soddisfare gusti ed esigenze della clientela più attenta.

Obiettivo generale - Detto progetto, denominato PLAUTO, ha come obiettivo generale lo sperimentare, il promuovere e l'implementare competenze, procedure e modelli organizzativi innovativi finalizzati al recupero e alla valorizzazione commerciale delle lane

ovine di Puglia, in un'ottica di diversificazione multifunzionale delle imprese agricole compatibile con gli attuali sistemi agricoli, sostenibile in termini economici ed ambientali e in grado di generare ricadute in termini di aggregazione orizzontale degli allevatori, integrazione verticale in micro-filiere, creazione di nuove opportunità di lavoro e promozione territoriale.

Obiettivi operativi

1. Promuovere la ricostruzione di micro-filiere di trasformazione tessile della lana ovina in chiave innovativa, con attenzione agli aspetti di
   a. sostenibilità ambientale; presidio e conservazione dei paesaggi (legame pascolamento/conservazione paesaggi pseudo-steppici di interesse naturalistico) e della biodiversità vegetale e animale (anche biodiversità domestica: razze ovine pugliesi autoctone a rischio di estinzione)
   b. legame storico, culturale e vocazionale con il territorio; recupero di antichi saperi (es. filatura manuale) e professionalità di rinnovato interesse (es. tosatori); tracciabilità di processo e di prodotto
   c. micro-imprenditorialità (soprattutto giovanile e femminile), diversificazione delle attività produttive nelle imprese agricole (quale sostegno al reddito e incentivo al non abbandono), aggregazione orizzontale e integrazione verticale per il rafforzamento del sistema territoriale.
2. Sperimentare, su una più ampia dimensione inter-provinciale, il modello organizzativo di raccolta, pre-selezione e smistamento della lana adottato con successo a livello inter-comunale nel contesto di una precedente esperienza progettuale, quale premessa per la creazione di un centro di competenza regionale.
3. Acquisire elementi conoscitivi teorici e applicativi relativi alle possibilità di valorizzazione commerciale della lana in ambiti innovativi alternativi al settore tessile (bioedilizia, orto-floro-vivaismo).

DESCRIZIONE SINTETICA DEL PROGETTO - La proposta progettuale nasce da una approfondita conoscenza del territorio e delle problematiche/opportunità del comparto di allevamento ovino da parte di tre dei quattro partner di progetto, i quali vantano precedenti esperienze di collaborazione in questo ambito. Essa si pone come obiettivo generale lo studio di fattibilità, la promozione e l'implementazione di azioni innovative finalizzate al recupero e alla valorizzazione commerciale delle lane ovine di Puglia, in un'ottica di diversificazione multifunzionale delle imprese agricole compatibile con gli attuali sistemi agricoli, sostenibile in termini economici ed ambientali e in grado di generare meccanismi indiretti di aggregazione orizzontale degli allevatori e di integrazione verticale in micro-filiere.

Le azioni di progetto, identificate sulla base degli obiettivi operativi, sono di seguito sinteticamente schematizzate:

A. Costituzione di un centro inter-provinciale di raccolta, pre-selezione e smistamento della lana, quale primo passo verso la creazione di un centro in grado di operare sull'intero territorio regionale.
   Sulla base dell'esperienza maturata nel precedente triennio, il Consorzio "Murgia Viva" catalizzerà intorno a sé oltre 80 allevatori del comprensorio Bari/BAT, per un quantitativo complessivo annuo di oltre cinquanta tonnellate di lana e svolgerà il ruolo di raccordo, di indirizzo e di operatività concreta nelle attività di aggregazione dell'offerta, di gestione dei flussi materiali e delle operazioni di selezione della materia prima, di collocazione commerciale del prodotto, di promozione e valorizzazione delle lane di Puglia e degli aspetti culturali e territoriali ad esse connesse. Il Consorzio sarà affiancato dall'Az. Agr. F.lli Carrino, che svolgerà la propria preziosa azione di supporto relativamente al coinvolgimento degli allevatori della provincia di Foggia, tradizionalmente sede dell'allevamento della razza pugliese autoctona Gentile di Puglia, apprezzata fin da epoca romana per la qualità della fibra tessile che dalla sua lana può essere realizzata. L'Az. Agr. Carrino vanta, analogamente al Consorzio "Murgia Viva", una storica competenza allevatoriale e veterinaria, una fitta rete di contatti con il territorio ed una significativa attenzione agli aspetti della multifunzionalità, unitamente ad una pregressa esperienza nella direzione della valorizzazione e promozione della lana di Gentile di Puglia.

B. Definizione di un disciplinare di produzione delle "Lane di Puglia" quale primo passo per la qualificazione, la riconoscibilità e la tracciabilità di prodotto.
   Il disciplinare, snello nella sua impostazione, sarà incentrato sui principali aspetti gestionali in grado di influenzare le proprietà qualitative della lana (benessere, igiene, alimentazione, tipo genetico), con particolare enfasi sugli aspetti legati al momento della raccolta (tosatura, cernita e imballaggio). Saranno inoltre implementati indicatori di sostenibilità ambientale, quali disponibilità di terreni a pascolo, ricorso al pascolamento e carico di bestiame per ettaro, al fine di premiare gli allevatori virtuosi e incentivare alle buone pratiche zootecniche gli allevatori meno virtuosi.

C. Creazione di una micro-filiera pilota di trasformazione tessile delle "Lane di Puglia". Saranno esplorati due diversi segmenti produttivi e di commercializzazione:
   i. Il primo sarà incentrato sulla realizzazione di prodotti tessili artigianali di fascia alta, realizzati con telai professionali, lavorazione interamente manuale e pattern della tradizione salentina rivisitati in chiave contemporanea. La lavorazione sarà realizzata presso il laboratorio artigianale di Uggiano La Chiesa gestito dalla Fondazione "Le Costantane". Nonostante l'attenzione e la sensibilità nei confronti della promozione dei territori locali, attualmente la Fondazione impiega filati di provenienza sarda a causa dell'irreperibilità sul mercato di materia prima interamente pugliese. L'utilizzo di filati ottenuti da lana di ovini pugliesi consentirà, alla Fondazione, di potenziare il legame territoriale delle già pregiate produzioni tessili e, al Progetto, di sperimentare problematiche e punti di forza della micro-filiera locale, con particolare riferimento agli aspetti di commercializzazione dei prodotti. Tutti gli aspetti tecnici legati alle operazioni di lavaggio, cardatura e filatura della lana saranno, per motivi di imposizioni normative e per assenza, al momento, di realtà operanti sul territorio regionale, affidati al Consorzio "The Wool Company" di Biella.
   ii. Il secondo segmento produttivo sarà incentrato sul processo di lavorazione del filato di lana e sulla commercializzazione dei manufatti artigianali direttamente presso le aziende agricole, agrituristiche e loro consorzi. I manufatti saranno realizzati impiegando telai manuali da tavolo. La Fondazione "Le Costantine" sarà coinvolta in questa fase nelle operazioni di "concept design", di indagine finalizzata al recupero di pattern della tradizione contadina degli areali di Bari/BAT e di Foggia e di affiancamento alle aziende agricole per gli aspetti associati alle tecniche di tessitura.

D. Indagine conoscitiva sulla possibilità di impiego di scarti di lana in bio-edilizia.
   Analisi della domanda di isolamento termico in Italia. Stato dell'arte dell'offerta di isolanti termici in lana naturale (processo produttivo e tipologie merceologiche realizzate, prestazioni termiche, attori coinvolti, margini di guadagno).

E. Sperimentazione sull'impiego di dispositivi di lana da cascami di lavorazione tessile da utilizzare come pacciamanti nell'industria orto-floro-vivaistica, in sinergia con l'utilizzo di molecole di derivazione naturale (tannini) ad azione anti-nematodica.

F. Azioni di disseminazione e trasferimento

Approccio metodologico - Il Progetto è incentrato su due principi metodologici di carattere generale, adottati sulla base delle positive esperienze pregresse del partenariato, in particolare nel contesto del Progetto PARTNERSHEEP: approccio di tipo partecipativo e work-based learning. Il coinvolgimento e la partecipazione attiva di tutti gli stake-holders ha dimostrato, infatti, di es-

sere il pre-requisito indispensabile per la riuscita di iniziative analoghe. Per tale motivo, nel Progetto è dato ampio spazio ai momenti formali e informali di confronto e di sintesi tra i diversi portatori di interesse. Pur a fronte di una pianificazione razionale e mirata delle azioni di Progetto, siamo consapevoli che le peculiarità della proposta, la sua impostazione molto orientata verso il trasferimento operativo più che sulla sperimentazione in senso tradizionale, unitamente alla complessità ed eterogeneità delle figure coinvolte, comporterà una notevole flessibilità e capacità di adattamento delle azioni agli obiettivi prefissati. Ciò non sarà comunque realizzato a scapito della qualità del progetto, garantita attraverso l'identificazione e il soddisfacimento di indicatori obiettivi e misurabili di risultato.

Ai due principi generali sopra elencati, se ne aggiunge un terzo, relativo alla coerenza della proposta progettuale con le politiche locali, regionali, nazionali e comunitarie.

Beneficiari diretti (target group)

Aziende agricole, agrituristiche e loro consorzi, Masserie Didattiche
Lavoratori agricoli stagionali specializzati (tosatori e selezionatori)
Enti/imprese operanti nel settore tessile (es. Consorzio "The Wool Company", Fondazione "Le Costantine")
Enti/imprese operanti nel settore edile e degli isolanti termoacustici
Enti/imprese operanti nel settore orto-floro-vivaistico
Enti territoriali e amministrazioni pubbliche

Beneficiari finali

- Az. agricole, agrituristiche, loro consorzi, Masserie Didatt., giovani e donne inoccupati: opportunità di micro-imprenditorialità nel settore della trasformazione tessile laniera artigianale e dell'animazione territoriale; diversificazione produttiva e integrazione al reddito
- Tessuto produttivo pugliese: possibilità prospettica concreta di creare centro raccolta, selezione e commercializzazione di lana su asta internazionale, con allargamento all'intero bacino di approvvigionamento del Sud Italia; possibilità di sviluppare minicomparto integrato di trasformazione tessile delle "Lane di Puglia; possibilità di avviare collaborazioni con realtà extra-regionali già operanti, per trasferimento tecnologico nel settore della bio-architettura; possibilità di trasferimento di innovazione di prodotto al comparto orto-floro-vivaistico pugliese
- Enti territoriali e amministrazioni pubbliche: dialogo interistituzionale, *mainstreaming* verticale e sintesi tra approcci *bottom-up/top-down*
- Società civile

Principali risultati attesi

Accanto ai risultati tangibili (deliverables, sez. C.9), il Progetto consentirà di realizzare una serie di risultati di carattere maggiormente immateriale di seguito schematizzati:

- acquisizione di nuove conoscenze e competenze, tecnologie, procedure e buone pratiche, implementazione di nuovi modelli organizzativi
- aggregazione orizzontale (es. adesione a campagna di raccolta e disciplinare "lane di Puglia") e verticale (creazione micro-filera tessile artigianale), rafforzamento del dialogo interistituzionale e con il mondo produttivo (es. a livello di Comitato di Indirizzo di Progetto e di tavoli tecnici di discussione), integrazione delle policies
- valorizzazione commerciale
- conservazione, animazione e promozione territoriale
- promozione della creazione di nuove opportunità di reddito e di impiego (es. selezionatori lana, responsabile di coordinamento e gestione centro di raccolta lana, operatori esperti nella tessitura a mano a telaio professionale/da tavolo, tecnici esperti di animazione in agriturismi e masserie didattiche…)

Tabella 1

Azioni	Titolo	Tipologia
1	Lancio dell'iniziativa e della campagna di raccolta della lana	preparatorie
2	Costituzione di un centro inter-provinciale di raccolta, pre-selezione e smistamento della lana	ricerca/ sviluppo
3	Definizione del disciplinare di produzione delle "Lane di Puglia"	ricerca/ sviluppo
4	Creazione di una micro-filiera pilota di trasformazione tessile delle "Lane di Puglia"	ricerca/ sviluppo
5	Indagine conoscitiva su possibilità di impiego di scarti di lana in bio-edilizia	ricerca/ sviluppo
6	Sperimentazione su impiego di scarti di lana per pacciamature innovative nell'orto-floro-vivaismo	ricerca/ sviluppo
7	Azioni di trasferimento e animazione territoriale	trasferimento
8	Azioni di coordinamento e monitoraggio	coordinamento e monitoraggio

- sensibilizzazione della società civile sui temi del riconoscimento sociale della figura dell'allevatore, sul ruolo di custode del territorio e dei saperi tradizionali che esso svolge.

Innovazioni attese (deliverables)

Costituzione di un centro inter-provinciale di raccolta, pre-selezione e smistamento della lana (primo passo verso un centro regionale e verso la creazione del Consorzio "Lane di Puglia"); Innovazione: di conoscenze e competenze, tecnologica, di procedure, di modelli organizzativi.

Definizione di un disciplinare di produzione delle "Lane di Puglia", quale strumento di diffusione di buone pratiche, di garanzia di qualità e rintracciabilità, di sostenibilità ambientale, di valorizzazione commerciale. Innovazione: di conoscenze e competenze, di procedure.

Relazione tecnica e prototipi (manufatti artigianali) ottenuti in seguito alla creazione di una micro-filiera pilota di trasformazione tessile delle "Lane di Puglia" (due segmenti produttivi e di commercializzazione: segmento alto -Le Costantine- e segmento intermedio -aziende agrituristiche e masserie didattiche-. Innovazione: di conoscenze e competenze, tecnologica, di procedure, di modelli organizzativi.

Report sull'indagine conoscitiva in merito alle possibilità di impiego di scarti di lana in bio-edilizia. Innovazione: di conoscenze e competenze.

Report sulla sperimentazione sull'impiego di scarti di lana per pacciamature innovative nell'orto-floro-vivaismo. Innovazione: di conoscenze e competenze, tecnologica, di procedure.

Sintesi del progetto - La tabella 1 riporta l'Articolazione della proposta progettuale.

The native sheep's wool: The project "PLAUTO" in Apulia

Key words: sheep's wool, landscape safeguard, wool sustainable supply chain.

Progetto "PartnerSheep" nell'Area del Parco Nazionale dell'Alta Murgia

N. DIBENEDETTO[1], P. DIRENZO[2], F. MODESTI[3], C. MATTIA[3], A. DIBENEDETTO[1], E. PIERAGOSTINI[4]

[1] Consorzio Murgia Viva; [2] Agronomo - Libero Professionista;
[3] Parco Nazionale dell'Alta Murgia; [4] Università di Bari

Parole chiave: Recupero della lana di pecora, Salvaguardia del paesaggio, Filiera produttiva sostenibile.

INTRODUZIONE - In Italia, gli allevati di ovini e caprini ammontano ad oltre 7,1 milioni di capi (*fonte* ISTAT 2013); il dato nazionale evidenzia un processo di contrazione dei capi allevati con un decremento del 21% rispetto al 1990. Questotrend è riconducibilead alcuni complessi problemi sanitari ed economici, difficilmente risolvibili, nonostante i massicci interventi pubblici. Nel nostro Paese, gli ovini rappresentano poco più dell'88% (6.322.871capi) mentre i caprini quasi il 12% (796.715 capi).

La tabella 1 riporta il numero dei soggetti censiti in Puglia annualmente a partire dal 2002 e ne fotografa il calo che avuto un impatto notevole sulla già fragile e segnata economia pugliese legata alla cultura agro- pastorale.

La lana ovina sucida ha sempre rappresentato per la cultura e tradizione Pugliese un prodotto importante, ed in particolar modo in aree marginali come quella del Parco Nazionale dell'Alta Murgia, arrivandonel secolo scorso, a costituire la voce principale del prodotto lordo vendibile di un gregge. Purtroppo oggi, a causa delle variazioni degli usi, delle abitudini e delle esigenze del mercato rivolto a prodotti di natura sinteticasi è avuto un notevole calo del valore di questo prodotto portandolo a diventare un sottoprodotto di scarsissimo valore commerciale e spesso un rifiuto. La perditadegli allevamenti ovini e/o caprini potrebbe causare la morte di uno dei settori trainanti che da sempre sono di supporto anche al turismo locale ed eno-gastronomico ancora più oggi che le aree marginali dove avviene l'allevamento rientrano in aree naturali ad alta valenza naturalistica e paesaggistica; andando poi indietro con gli anni (inizio secolo scorso) e recuperando la memoria culturale e storica ritroviamo l'uso fondamentale della lana, prodotto della tosatura che dopo oculate fasi di lavaggio, cardatura, filatura diventava un prezioso materiale con cui i nostri avi riuscivano a fare di tutto: dai materassi e cuscini in primis, a calze, coperte, maglie che servivano per proteggersi dai freddi e secchi inverni che segnavano la zona dell'Alta Murgia.

Ad oggi non esiste un mercato per la lana che spesso diventa uno scarto difficile da smaltire. Tuttavia nel 2010, la convinzione che i prezzi di ritiro della lana spuntati dagli allevatori fosse inferiore rispetto al potenziale valore del prodotto e che tale situazione potesse essere invertita solamente se legata ad un processo non solo di miglioramento qualitativo della materia prima, ma anche di partecipazione attiva da parte degli allevatori ha spinto un gruppo nove di allevatori riunitisi in società consortile, il Consorzio "Murgia Viva" a promuovere un'iniziativa di raccolta cui hanno risposto 30 allevatori; i risultati di questa azione hanno messo in evidenza come l'aggregazione abbia consentito di ottenere una massa critica pari a quasi 16 t. di lana con conseguente a recupero di una somma attraverso la vendita del prodotto. La somma ottenuta comunque non ha potuto coprire i costi dovuti all'operazione di tosatura (vedi Tab. 2), ma ha permesso di indicare la strada da seguire per ottenere in futuro, almeno la copertura dei costi. Così l'anno successivo il Consorzio "Murgia Viva" sollecita la collaborazione dell'Ente Parco Nazionale dell'Alta Murgia, l'Università degli Studi di Bari ed il Consorzio "The Wool Company" di Biella. Nasce così il Progetto triennale denominato "PartnerSheep", iniziato nel 2012, il quale mira all'utilizzo del prodotto "lana sucida" senza grosse variazione nella normale attività aziendale e senza grossi contributi finanziari che avrebbero potuto alterare sia il mercato che la volontà seria di partecipare ad un Progetto partecipativo del tipo *bottom-up*. Il progetto mira anche a dare agli allevatori la consapevolezza di essere i principali attori all'interno del Parco Nazionale dell'Alta Murgia, attraverso un approccio necessario a migliorare le politiche di gestione del territorio da parte dell'Ente Parco ed individuare la gestione aziendale ideale dal punto di vista agro-ambientale da realizzarsi al suo interno.

Tabella 1 - Consistenza del bestiame ovino e caprino (N capi) - Puglia.

Anno	Ovini	Caprini
2002	236271	47872
2003	205188	38137
2004	222061	42950
2005	203085	38192
2006	223895	42183
2007	221505	40568
2008	221367	41660
2009	216549	41610
2010	218214	42701
2011	218593	41218
2012	213797	30700
2013	222712	37676

Tabella 2 - Valore economico del costo per la tosa.

Provincia	Comuni	Capi 2011	Q.tà di lana prodotta (media in Kg)	Prezzo medio di mercato (0,30 Euro a Kg)	Costo Operatore (Euro 1,3 a capo)
BAT	Minervino Murge	8.259	14.040	€ 4.212,09	€ 12.388,50
	Spinazzola	6.022	10.237	€ 3.071,22	€ 9.033,00
	Andria	6.225	10.583	€ 3.174,75	€ 9.337,50
BA	Altamura	18.933	32.186	€ 9.655,83	€ 28.399,50
	Toritto	289	491	€ 147,39	€ 433,50
	Poggiorsini	223	379	€ 113,73	€ 334,50
	Corato	1.861	3.164	€ 949,11	€ 2.791,50
	Ruvo di Puglia	6.475	11.008	€ 3.302,25	€ 9.712,50
	Bitonto	2.511	4.269	€ 1.280,61	€ 3.766,50
	Gravina in Puglia	4.619	7.852	€ 2.355,69	€ 6.928,50
	Santeramo in Colle	9.520	16.184	€ 4.855,20	€ 14.280,00
	Cassano delle Murge	1.827	3.106	€ 931,77	€ 2.740,50
	Grumo Appula	1.493	2.538	€ 761,43	€ 2.239,50
TOTALE		68.257	116.037	€ 34.811,07	€ 102.385,50

Soggetto promotore - La **Società Consortile "Murgia Viva" a.r.l.**, costituita da 12 soci, opera e lavora da diversi anni nell'ambito della valorizzazione del patrimonio ovino e caprino nel suo complesso, per il miglioramento dei metodi di allevamento, alimentazione, management aziendale e benessere animale, per la promozione delle risorse storiche, culturali, turistiche, enogastronomiche, ambientali e produttive legate all'identità del territorio e per favorire socialità e partecipazione nel settore agro-zootecnico, realizzando attività di promozione sociale e culturale.

Diverse sono le esperienze maturate nel campo della collaborazione scientifica con diversi Enti Pubblici di ricerca come l'Università degli Studi "Aldo Moro", l'Ente Parco Nazionale dell'Alta Murgia, con la Regione Puglia con l'Assessorato all'Agricoltura, con gli Istituti Zooprofilattici di diverse Regioni (Puglia e Basilicata, Sicilia, Marche ed Abruzzo, Sardegna).

Lo statuto del Consorzio e gli indirizzi dello stesso si pongono come obiettivo principale quello di permettere una crescita degli associati devolvendo parte degli utili ad attività di ricerca, studio e promozione delle attività degli associati oltre a permetterne la crescita dal punto di vista delle competenze e capacità nella gestione aziendale al fine di poter ottenere prodotti con alta qualità e legati alla tradizione del luogo che permettono di aumentarne il valore aggiunto.

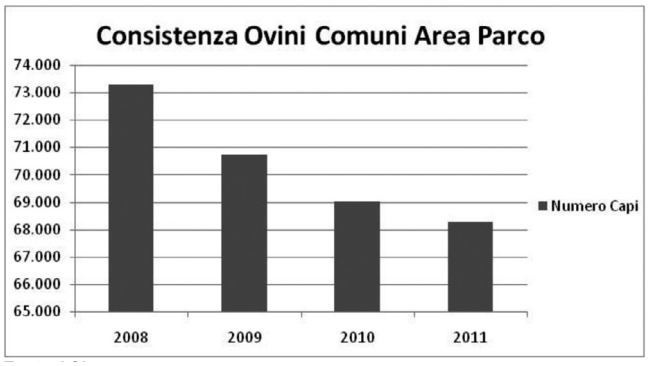
Soggetti partecipanti

1) Il **"Parco nazionale dell'Alta Murgia"**, istituito nel 2004, è una area naturale protetta situata in Puglia, nelle province di Bari e di Barletta-Andria-Trani è il più ampio Parco Rurale d'Italia. Caratterizzato da un paesaggio suggestivo costituito da lievi ondulazioni e da avvallamenti doliniformi, con fenomeni carsici superficiali rappresentati dai puli e dagli inghiottitoi. Il substrato è costituito da calcare creataceo, generalmente ricoperto da calcarenite pleistocenica. È una delle aree substeppiche più vaste d'Italia, con vegetazione erbacea ascrivibile ai Festuco-brometalia. È presente la più numerosa popolazione italiana della specie prioritaria Falco naumanni ed è una delle più numerose dell'Unione Europa. Abbraccia un'area a forte vocazione pastorale ovi-caprina. Purtroppo l'andamento del numero di capi (Tab. 2 e Graf. 1) nei diversi comuni facenti parte del Parco Nazionale dell'Alta Murgia per il quadriennio 2008-2011 sta progressivamente riducendosi, anche se vi sono alcune eccezioni nei comuni di Minervino Murge, Spinazzola e Santeramo in Colle.
2) Il **Consorzio "Biella The Wool Company"**, primo e unico Centro di Raccolta di Lane Sucide autorizzato dal dipartimento sanitario della Regione Piemonte, che riconosce al Consorzio l'idoneità come Impianto di Transito di Categoria 3, di cui all'articolo 10 del Regolamento CE/1774/2002 per il deposito, la cernita e frazionamento di lane sucide. Il progetto Centro Raccolta Lana è stato studiato in collaborazione con la Camera di Commercio di Biella e altri Enti distribuiti sul territorio Italiano. Una gestione completa di un sottoprodotto di categoria 3 – dalla pecora al mercato.

Tabella 3 - Variazione numero capi per Comune - Area Parco.

Provincia	Comuni	Capi 2008	Capi 2009	Capi 2010	Capi 2011
BAT	Minervino Murge	7.949	7.172	8.050	8.259
	Spinazzola	5.117	5.094	5.198	6.022
	Andria	8.778	8.433	8.725	6.225
BA	Altamura	21.498	20.551	19.017	18.933
	Toritto	218	321	310	289
	Poggiorsini	223	223	223	223
	Corato	2.558	2.075	2.157	1.861
	Ruvo di Puglia	6.909	7.293	7.185	6.475
	Bitonto	2.511	2.564	2.794	2.511
	Gravina in Puglia	4.662	4.482	4.462	4.619
	Santeramo in Colle	8.387	8.277	7.545	9.520
	Cassano delle Murge	2.880	2.724	1.944	1.827
	Grumo Appula	1.592	1.516	1.410	1.493
TOTALE		73.282	70.725	69.020	68.257

Fonte ASL



Fonte ASL

Grafico 1 - Variazione consistenza ovini Area Parco.

Obiettivo - L'obiettivo primario del progetto è la valorizzazione del patrimonio ovino nel suo complesso e la promozione delle risorse storiche, culturali, turistiche, enogastronomiche, ambientali e produttive legate alla lana locale e all'identità del territorio; in questo modo il progetto prende forma all'interno di una logica di sviluppo sostenibile e la sua tipicità contribuisce ad identificarlo e renderlo riconoscibile.

MATERIALI E METODI - Le linee di gestione e di sviluppo di un territorio possono essere tracciate secondo processi decisionali ed applicativi di diverso genere, riconducibili, però, a due categorie ideali.

1. Nella prima si collocano i modelli basati su imposizioni dall'alto, in cui le scelte sono demandate esclusivamente al decisore pubblico, che le mette in atto mediante strumenti coercitivi (*command and control*) come regole, controlli e sanzioni a cui sono soggette le popolazioni locali.
2. Nell'altra rientrano i modelli partecipativi, in cui la definizione delle linee d'azione e la loro attuazione si basano sulla fattiva collaborazione dei soggetti locali sui quali queste scelte ricadono.

   Il Progetto si ispira a questa seconda tipologia ed è incentrato su un principio metodologico di carattere generale il cui approccio partecipativo è del tipo bottom-up. Quattro sono gli approcci per la ricerca partecipata presi in considerazione al fine di trovare una disponibilità concreta delle aziende a condividere il Progetto "PartnerSheep":
   a) Contrattuale: I promotori contrattano con gli agricoltori i quali forniscono ad esempio terra, servizi o informazioni;
   b) Consultivo: I promotori consultano gli agricoltori per capire i loro problemi e sviluppare possibili soluzioni;
   c) Collaborativo: I promotori e gli agricoltori collaborano insieme come partner nei processi di realizzazione del Progetto;
   d) Collegiale: I promotori lavorano per rafforzare la ricerca informale degli agricoltori e sistemi di sviluppo in aree rurali.

Lo sviluppo di tale progetto e la sua metodologia sono basati in gran parte sul secondo e terzo approccio ed in minima parte sul quarto. Inoltre nell'ambito delle attività di ricerca partecipata intraprese in tale progetto si è cercato di enfatizzare due aspetti della partecipazione degli agricoltori e precisamente:

- La maggior parte degli allevatori ha notevoli e sviluppate conoscenze del proprio ambiente, delle colture che produce, dei metodi e pratiche produttive, delle caratteristiche agro ambientali del proprio complesso aziendale;
- Gli allevatori si scambiano attivamente informazioni all'interno di un network sociale.

Le informazioni sul Progetto importanti per la sua implementazione sono diffuse attraverso il network sociale. Al fine del raggiungimento degli obiettivi prefissati, il network sociale gioca un ruolo fondamentale nell'adozione di nuove metodologie di gestione aziendale che non possono essere realizzati da un singolo individuo, specialmente se esse richiedono un'azione collettiva, come ad esempio per il Progetto "*PartnerSheep*". Le barriere sociali a questi scambi esistono comunque. La diffusione di informazioni e innovazioni potrebbe essere difficile fuori dal network e lo stesso gruppo potrebbe in alcuni casi creare una barriera. È importante tenere a mente che gli allevatori non sono individui isolati, ma membri di un network sociale, e questo network può avere un ruolo importante nella diffusione delle informazioni.

Descrizione sintetica del Progetto - *Fase 1: Corso di formazione per cernitori ed allevatori* - Per i tre anni di durata del progetto (2012, 2013, 2014), l'Ente Parco in collaborazione con il Consorzio "Murgia Viva",promuove l'organizzazione di un corso (Foto 1) indirizzato prevalentemente agli allevatori e tosatori e teso alla diffusione della cultura della raccolta e della cernita. La formazione ha anche l'obiettivo di sensibilizzare gli ovinicoltori della Murgia circa la necessità di operare insieme e presentarsi sul mercato come un unico interlocutore del territorio murgiano. Tale attività si tiene presso la Sala conferenze dell'Ente Paro Nazionale dell'Alta Murgia a Gravina in Puglia (Ba) prima dell'inizio della "*campagna di tosa*". La formazione viene tenuta dai referenti del Consorzio "Murgia Viva". Durante tale attività si procede all'esplicazione delle seguenti tematiche:

a) Presentazione delle problematiche relative alla fase di tosa e raccolta (tipologia e modalità di raccolta, qualità della lana, presenza di rifiuti nei balloni, ritardi nel trasporto e consegna ai centri di raccolta, scarsa voglia di alcuni allevatori di collaborare etc.); buone prassi di tosatura e raccolta della lana in azienda; modalità di stoccaggio ed invio della lana;
b) gestione, lavorazione e vendita della lana sucida.

Fase 2: Raccolta lana - Nel corso delle due passate stagioni di tosa (2012 e 2013), ogni balloneconsegnato è stato marchiato con il logo del Parco dell'Alta Murgia e del Consorzio e con i dati identificativi dell'allevatore (Foto 2) che derivano dal suo codice aziendale ASL costituito da 10 caratteri alfanumerici che indicano: Provincia, Comune di provenienza e per finire il numero univoco della ditta e che servirà per avere tutte le indicazioni relative al lotto di pertinenza. l prodotto è stato conferito dagli allevatori presso tre centri di raccolta presenti in tre comuni del Parco (Minervino Murge, Altamura e Santeramo in Colle). La raccolta è stata coordinata dai referenti del Consorzio "Murgia Viva", i quali ne hanno curatotutte le fasi: dal carico alla registrazione ed archiviazione di tutti i dati.

Fase 3: La lana, inviata al centro di raccolta di biella - La lana inviata alla "The Wool Company" di Miagliano (Bi) in vari viaggi entro fine settembre è stata selezionata, re-imballata e testata per essere venduta su asta internazionale. L'importo così ottenuto, dedotti i costi di gestione, selezione, analisi e imballaggio è stato reso agli allevatori insieme ad un rapporto personalizzato, detto "pagella" (Fig. 1), con le motivazioni della valutazione ottenuta.

Fase 4: Sensibilizzazione e organizzazione eventi - Durante i due anni di progetto già trascorsi, sono state organizzate manifestazioni ed eventi di animazione territoriale, correlate alle attività legate alla pratica della tosatura ed all'allevamento ovino (festa della tosa, pascolo con pecore lungo i tratturi, etc.) il tutto gestito in collaborazione con i gruppi CEA, con il Consorzio Puglia in Masseria e le Associazioni che lavorano in campo ambientale ed agricolo.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Inizialmente per la prima annualità (2012) si era stimato che si sarebbe potuto ottenere una quantità di lana pari a 16 t. In realtà i risultati sono stati superiori alle aspettative, raggiungendo un valore di circa 32 t. nel 2012 e 40 t. nel 2013 con una crescita dell'80% nel 2012 rispetto al 2011 e di un'ulteriore 20% nel 2013 rispetto al 2012. Anche il numero di aziende è cresciuto negli anni passando dalle iniziali 30 aziende nel 2010 a circa 80 nel 2013 (Graf. 2).

L'iniziale reticenza è venuta meno nel momento in cui l'organizzazione delle attività (corso di formazione, visite aziendali, contatti e gestione della raccolta) e la notevole attività mediatica da parte dell'Ente Parco e dei componenti del Progetto ha mostrato la volontà e la convinzione di procedere nelle attività in maniera seria, professionale e nell'ottica di ottenere un risultato a favore non solo del prodotto lana, ma dell'intera economia dell'azienda.

La coerenza del progetto non solo si è basata sulla valorizzazione economica e sociale della lana sucida, ma in una più ampia volontà di sviluppo socio-economico del Parco, finalizzato alla promozione delle attività agricole tradizionali, dell'agricoltura integrata, dell'allevamento zootecnico, delle attività agro-silvo-pastorali, nel rispetto delle finalità di conservazione del patrimonio naturalistico, ambientale, paesaggistico e culturale.

Importanti sono stati anche i risultati economici raggiunti.Come si può notare dal grafico 3, nei primi due anni di attività, fase non coordinata dagli attori del Progetto e senza alcuna intervento di selezione e distinzione della lana da parte del Consorzio di Biella in base alla qualità e tipologia, il prezzo reso agli allevatori dai commercianti locali era puramente simbolico pari ad € 0,30 nel 2010 e a € 0,35 nel 2011.

Nei due anni di sviluppo del Progetto PartnerSheep, in cui i diversi tipi di la-

LANA SUCIDA SARDA / MOSCIA - FINE

Anno	Data	Cliente	Codice	Batch
2013	21/11/13	Di Gregorio - Cacciapaglia	IT001BA026	

Sucido Ricevuto	Balle Pressate	Balle Normali	Sacchi	Totali
n° colli	0	16	0	16,0
Kg Lordi	0	1297	0	1297,0
Tara riscontrata	0	32	0	32,0
Kg Netti	0	1265	0	1265,0

Selezionato in	Chiaro	Macchiato	Scuro	Totali
Kg Netti	1260	0	3	**1263,0**

CERNITA

Chiara	1	1°	2	2°	3	3°
Kgs		249,0		333,0		436,0 → **1018,0**
	4	Pezzami	5	Feltroni	6	Ordinario
Kgs		153,0		0,0		55,0 → **208,0**
Moretta	7	Fine	8			
Kgs		3,0		0,0		→ **3,0**
					Kgs. Idonei Totali	1229,0

Scarto	9	Caccole	10	Paglioso	11	Scopature
Kgs		0,0		0,0		34,0 → **34,0**

Valutazione	
Grado di imballo	A
Grado di preparazione	A
Grado di selezione	A

A = Buono B = Sufficiente C = Scarso

Note
Lana piuttosto fine,merinizzata,pulita da paglie e caccole. Buono l'aver imballato a parte pezzami,agnelli,scopature,moretta. E' un po' meno fine dell'anno scorso.

Figura 1 - Pagella.

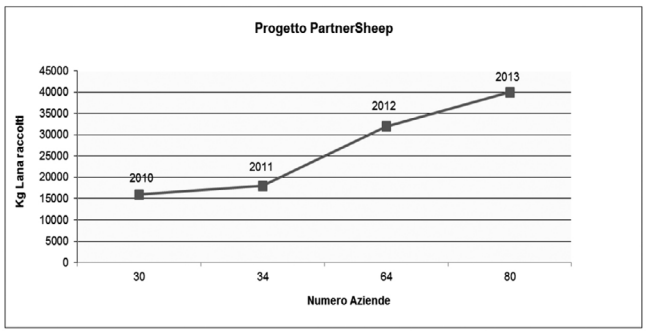


Grafico 2 - Aumento aziende e quantità di lana Progetto.

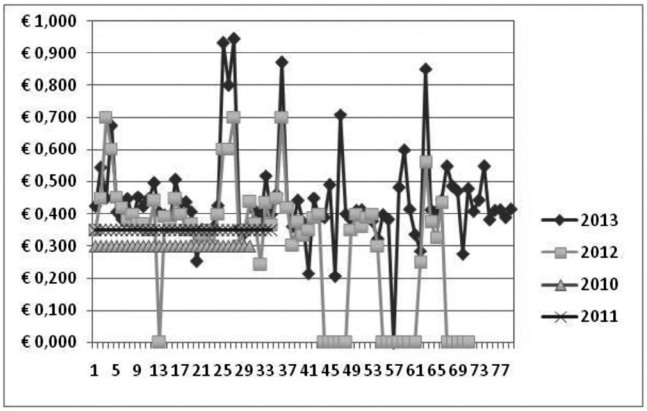


Grafico 3 - Valore corrisposto ad aziende.

na selezionata venivano valutati e venduti separatamente su asta internazionale si è potuto avere una variabilità notevole tra le aziende, incentivando quelle che oltre ad avere lane merinos, lavoravano meglio il prodotto in fase di tosa ed imballo.
I valori corrisposti dal mercato nel 2012 e nel 2013 sono stati differenti e hanno permesso di ottenere guadagni differenti in base alla tipologia di lana raccolta come si può evidenziare nella tabella e dai grafici (Tab. 3 e Graf. 4 e 5) seguente:
Il valore aggiunto prodotto da tale Progetto è stato quello di rendere consapevole l'allevatore dell'importanza della sua lana e delle possibilità di migliorarne la qualità ed il prezzo, ponendosi in modo critico nei confronti del mercato. Grazie a tale progetto Infatti si è potuto dare inizio ad una vera valorizzazione del prodotto con la realizzazione di gomitoli di lana "Made in Alta Murgia" (fig. 2) per poter aprirsi ad un nuovo mercato ed ottenere un valore aggiunto importante, premessa per la creazione di un indotto nuovo ad alto valore non solo economico ma anche culturale.
Risulta inoltre notevole l'interesse manifestatoin generale dal consumatore finale ed in particolare dai visitatori/escursionisti che hanno potuto visionare ed acquistare il filato (gomitoli) all'interno di alcuni agriturismi o aziende, oltre che nelle attività didattiche conoscitive da queste realizzate.
Tale feedback positivo ad oggi necessita di essere incanalato in circuiti commerciali per poter aumentare il valore del prodotto, obiettivo che si auspica verrà centrato dal Progetto Lane Autoctone (PLAUTO) finanziato dalla Regione Puglia che prenderà il via nel 2015.
Accanto ai risultati tangibili, il Progetto ha consentito di realizzare una serie di risultati di carattere maggiormente immateriale di seguito schematizzati:

- Riappropriazione di conoscenze e competenze, procedure e buone pratiche ed implementazione di modelli organizzativi;
- rafforzamento del dialogo interistituzionale e con il mondo produttivo;
- valorizzazione commerciale;

Tabella 4 - Pagamenti per classe di lana al kg.

Tipo	Classe	Anno 2012	Anno 2013
Lane Fine	1° finezza	€ 0,90	€ 1,20
	2° finezza	€ 0,60	€ 1,05
	3° finezza	€ 0,50	€ 0,90
	Pezzami	€ 0,10	€ 0,30
	Feltroni	-	€ 0,25
	Ordinaria	-	€ 0,89
	Paglioso	-	€ 0,45
	Moretta	-	-€ 0,05
Lane Ordinarie	Lunga	€ 0,45	€ 0,57
	Feltroni	€ 0,20	€ 0,30
	Moretta	€ 0,10	€ 0,10
	Pezzami	€ 0,10	€ 0,25
	Pagliosa	€ 0,20	€ 0,13
	Caccole	-€ 0,20	-€ 0,24

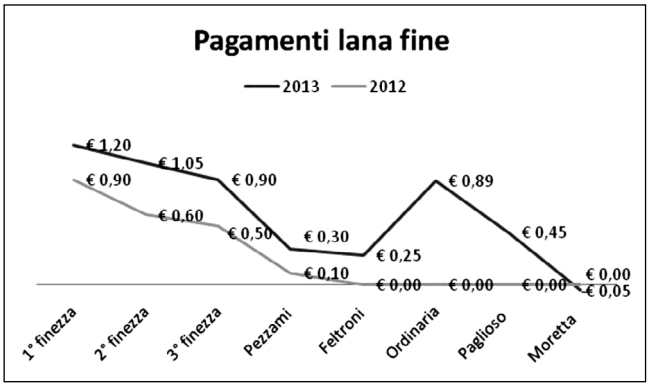


Grafico 4 - Variazione pagamento lana fine nei due anni di progetto.

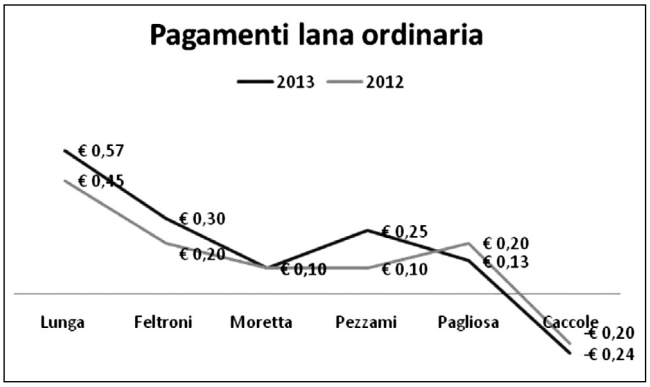


Grafico 5 - Variazione pagamento lana ordinaria nei due anni di progetto.

- conservazione, animazione e promozione territoriale;
- promozione della creazione di nuove opportunità di reddito e di impiego (es. selezionatori lana, responsabile di coordinamento e gestione centro di raccolta lana, tecnici esperti di animazione in agriturismi e masserie didattiche…);
- sensibilizzazionedella società civile sui temi del riconoscimento sociale della figura dell'allevatore, sul ruolo di custode del territorio e dei saperi tradizionali che esso svolge.

The project "PartnerSheep" in the area of Alta Murgia National Park

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

Comunicazioni scientifiche

Aborti da ceppo atipico di Border Disease in un gregge ovino siciliano

B. AMATO[1], M.T. CAPUCCHIO[2], S.A. MIGNACCA[1], S. AGNELLO[1], A. ATANASIO[3], M. SCIUTO[3], G. PURPARI[1], V. DI MARCO LO PRESTI[1], M. VITALE[1], A. GUERCIO[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" - Palermo
[2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (Torino)
[3] A.S.P. n° 4 - Enna

Parole chiave: *Pestivirus*, Border Disease, ovini.

INTRODUZIONE - La Border Disease, è una malattia infettiva degli ovini e raramente dei caprini sostenuta da un virus appartenente al genere *Pestivirus*, della famiglia *Flaviviridae.* I *Pestivirus* dei ruminanti mostrano una bassa specie specificità con frequenti isolamenti delle 2 specie virali (BVDV-1, BVDV-2, BDV) da bovini, ovini e caprini.
L'analisi filogenetica degli 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 (proposti come BVDV-3 o HoBi-*like*), che si differenziano significativamente dalle specie classiche sia di BVDV che BDV.
L'infezione da BDV può risultare asintomatica negli adulti, viceversa quando colpisce animali in gestazione è responsabile di fenomeni di aborto, mortalità neonatale, ipertricosi, tremori muscolari, ridotto accrescimento e malformazioni. Gli autori descrivono un focolaio atipico di Border Disease in un gregge di ovini di razza valle del Belice allevato in Sicilia.
MATERIALI E METODI - Durante la stagione dei parti del 2012, in un gregge di circa 380 ovini di razza Valle del Belice allevato nella provincia di Enna, si osservava la nascita sia di agnelli ben sviluppati che presentavano irsutismo e tremori generalizzati (circa 30 soggetti) che di animali disvitali (Fig. 1) o morti (circa 140 soggetti) su un totale di circa 250 agnelli nati. Sospettata un'infezione da BDV, su 6 carcasse venivano eseguiti esame anatomo-istopatologico, esami virologici e biomolecolari. Si è contestualmente proceduto ad eseguire prelievi ematici per indagini sierologiche sull'intero gregge.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - All'esame anatomo-patologico venivano rilevati moderata enterite catarrale-emorragica, ipoplasia timica e aumento della convessità della volta cranica. I sintomi clinici e le lesioni macroscopiche degli animali deponevano per infezione da *Pestivirus*. L'esame istologico mostrava grave rarefazione dei follicoli linfoidi di timici, irregolare e grave disorganizzazione dello strato granulare e delle cellule del Purkinje (Fig. 2). I successivi isolamenti virali ottenuti dagli organi prelevati (polmone, encefalo, milza e cuore) confermavano la presenza del BDV.
I campioni di sangue prelevati sono stati saggiati mediante un test ELISA specifico per BD rilevando una positività sierologica prossima al 100% (376 animali su 379). Il ceppo riscontrato e tipizzato in questo allevamento non è risultato citopatogeno, tuttavia appartenente al BDV e non al BVDV. Studi biomolecolari hanno messo in evidenza che questi nuovi isolati formano un *cluster* distinto con elevata identità nucleotidica (>82%) con ceppi tunisini.

An unusual strain of BDV causing abortion of sheep in a sicilian flock

Key words: *Pestivirus*, Border Disease, sheep.

Bibliografia

Bottari T., Foti M., Rinaldo D., Fisichella V., Di Pietro S., Buonavoglia D. (2005), Ricerca di Anticorpi per Border Disease Virus (BDV) in ovini siciliani. Atti XIII Congresso Fe.Me.S.P.Rum.
Manuale OIE. 2008, Chapter 2.7.1 Border Disease.
Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., Sciarretta R., Losurdo M., Lorusso E., Buonavoglia C (2011), Atypical Pestivirus and Severe Respiratory Disease in Calves. Europe Emerg. Infect. Dis 17:1549-1552.
Giangaspero M. (2011), Genetic variation of Border disease virus species strains. Veterinaria Italiana, 47(4): 415-435.
Oguzoglu T.C., Tan M.T., Toplu N., Demir A.B., Bilge-Dagalp S., Karaoglu T., Ozkul A., Alkan F., Burgu I., Haas L., Greiser-Wilke I. (2009), Border Disease Virus (BDV), infezioni dei piccoli ruminanti in Turchia: un nuovo sottogruppo BDV? Vet. Microbiol 135: 374-379.
Purpari G., S. Ciulli, A.C. De Aguiar Saldanha Pinheiro, P. Di Marco, S. Di Bella, F. Mira, S. Vullo, A. Guercio. (2012), Analisi filogenetica di ceppi di Pestivirus isolati da ovini e caprini. Atti XX Congresso SIPAOC.
Thabti F., Fronzaroli L., Dlissi E., Guibert J.M., Hammami S., Pepin M., Russo P. (2002), Experimental model of Border Disease Virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia Vet. Res. 33: 35-45.

Figura 1

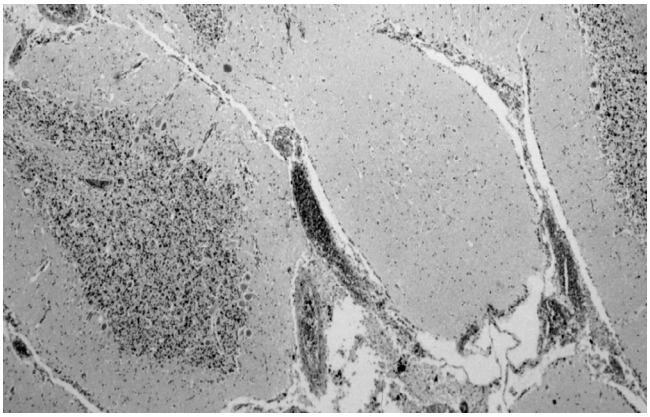


Figura 2

Tre casi di adenocarcinoma intestinale nell'ovino: rilievi clinici e anatomo-istopatologici

B. AMATO[1], M.T. CAPUCCHIO[2], S.A. MIGNACCA[1], V. ARONICA[1], A. LENA[3], G. GUARNERI[1], S. ANTOCI[1], M. FIASCONARO[1], V. DI MARCO LO PRESTI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" - Palermo
[2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (Torino)
[3] ARAS Sicilia

Parole chiave: adenocarcinoma, ovino, intestino.

INTRODUZIONE - Gli adenocarcinomi intestinali in medicina veterinaria non sono molto comuni, eccetto nella pecora. In questa specie infatti è riportata un'alta prevalenza di tumori intestinali in Australia, Nuova Zelanda e Scozia soprattutto negli animali di età superiore a 5 anni che raggiunge anche il 2% (Simpson and Jolly, 1974; Mc Donald e Leaver, 1965, Head, 1967). Negli altri Paesi si tratta di una lesione occasionale forse per la scarsa attenzione che si pone all'esame necroscopico o a causa della macellazione di animali più giovani (Head *et al.*, 2002). In Italia le uniche segnalazioni risalgono a un caso del 1994 ed uno del 2010 (Vitellozzi *et al.*, 1994; Lepri *et al.*, 2010). Si tratta di un tumore maligno che origina dall'epitelio del lume e dei dotti delle numerose ghiandole localizzate nello spessore della parete intestinale. Sono più comuni nel piccolo intestino, soprattutto nel digiuno (Head *et al.*, 2002). Nelle forme più avanzate dà origine ad una sintomatologia gastroenterica caratterizzata da diarrea e dimagrimento. L'eziologia è sicuramente multifattoriale anche se negli ovini si riscontra maggiore prevalenza negli animali più anziani, allevati in modo intensivo che ingeriscono felce aquilina. L'ingestione di felce non pare però essere la causa di insorgenza del tumore, ma forse solo un fattore stimolante la crescita in quanto provoca immunodepressione permettendo alle cellule tumorali di replicare (Head *et al.*, 2002). Può, comunque, coesistere a patologie infiammatorie croniche ampiamente diffuse in questa specie, che potrebbero divenire una causa predisponente per la sua insorgenza. Gli autori descrivono tre casi di adenocarcinoma intestinale in pecore provenienti da tre differenti allevamenti della Sicilia.

MATERIALI E METODI - Il soggetto n° 1, proveniente da un allevamento della provincia di Messina era rappresentato da una pecora adulta meticcia. Il soggetto n° 2, proveniente da un allevamento della provincia di Trapani, era rappresentato da una pecora adulta di razza Valle del Belice. Il soggetto n° 3, proveniente da un allevamento dalla provincia di Agrigento, era rappresentato da una pecora adulta di razza Comisana. In tutti i casi, all'esame clinico, gli animali si presentavano magri, con diarrea cronica intermittente e spesso con un atteggiamento antalgico caratterizzato da falsa cifosi e arti posteriori divaricati. In seguito alla macellazione, è stato eseguito un accurato esame anatomopatologico e campioni di tessuto venivano fissati in formalina tamponata al 10% e processati routinariamente per l'esame istologico.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Durante l'esame anatomopatologico del soggetto n° 1 i vasi linfatici delle anse intestinali apparivano in preda a fenomeni di linfangite e linfagectasia. Veniva, inoltre, rilevata una neoformazione di consistenza sodo- compatta e di colore biancastro, a margini mal definiti che alterava il profilo della parete intestinale in prossimità del digiuno medio conferendogli un aspetto bitorzoluto. Al taglio mostrava un aspetto polipoide, sessile, e protrudeva nel lume inducendone la stenosi. I linfonodi intestinali si presentavano aumentati di volume e al taglio mostravano delle aree lardacee, biancastre, localizzate nella *pars* corticale. L'intestino del soggetto n° 2 mostrava ispessimenti e coalescenze alla sierosa dell'abomaso, piccolo intestino e milza e piccoli e medi granulomi a mesentere e fegato. A livello del digiuno medio, presentava un restringimento di colore biancastro, di aspetto polipoide al taglio, seguito da ispessimenti di varie forme e dimensioni diffusi sull'intera parete. Neoformazioni polipoidi di minori dimensioni si apprezzavano anche in prossimità della valvola ileo-cecale. Anche i linfonodi mesenterici si mostravano interessati da lesioni riconducibili a quelle riscontrate nella pecora meticcia. Le lesioni riscontrate nel soggetto n° 3 erano sovrapponibili a quelle riscontrate nel soggetto n° 1 eccetto che per il coinvolgimento di tratti più estesi del digiuno medio e distale associato ad aree di sfiancamento a monte della lesione. Istologicamente, in tutti e tre i casi si osservavano proliferazioni di cellule epiteliali anaplastiche organizzate in strutture tubulo-acinose che invadevano la mucosa e la sottomucosa. In quest'ultima, spesso i lumi erano poco visibili ed erano presenti numerose cellule caliciformi mucipare. I quadri si accompagnavano con rarefazione linfoide e lievi emorragie ai linfonodi tributari. Nel soggetto n° 1 si osservavano metastasi tubulo acinose presenti nei linfonodi meseraici, nel mesentere e nei vasi sanguigni adiacenti. Nel soggetto n° 2, inoltre, erano evidenti multifocali granulomi con centro calcificato e reazione infiammatoria non purulenta disseminata nel fegato e nel mesentere. Indagini microbiologiche e biomolecolari sono in corso per stabilire l'eziologia delle lesioni.

Three intestinal adenocarcinoma cases in sheep: clinical and anatomopathological aspects

Key words: adenocarcinoma, sheep, intestine.

Bibliografia

Benavides J., C. Garcia-Pariente, J.M. Garrido, I.A. Sevilla, J.F. García-Marín, V. Pérez and M. C. Ferreras. (2013), Coexistence of Granulomatous Enteric Inflammation and Neoplasia in an Adult Sheep.Vet Pathol 50: 1158.

Head W.K., Else RW, Dubielzig R.R (2002), Tumors of the alimentary tract. In: Tumors in domestic animals, ed. Moulton JE, Press Berkeley, Los Angeles-London, USA-UK.

Head, (1967) Breed and geographical variations in the occurrence of tumours in domesticated mammals. In: Shivas AA ed. Racial and Geographical factors in Tumour incidence. Pfizer Med Monograph n. 2, Edimburgh University Press 251-275

Lepri E., Filippini G., Di Matteo I., D'Avino N., Mangili P., Vitellozzi G. (2010), Adenocarcinoma intestinale ovino: descrizione di un caso. Atti XIX SIPAOC.

Mc Donald JW e Leaver DD. (1965), Adenocarcinoma of the small intestine of Merino sheep Aust Vet J (41):269-271.

Simpson BH and Jolly RD, (1974), Carcinoma of the small intestine in sheep. J Pathol (112): 83-92.

Vitellozzi G., Mughetti L., Ciorba A., Mechelli L. (1994), Argomenti di Patologia Veterinaria, Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche. Brescia (36): 201-225.

Effetto della quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) sul profilo aromatico e acidico del latte di pecora

G. ANNICCHIARICO[1], S. CLAPS[1], G. DE SANTIS[2], T. D'AMBROSIO[2], A. BRUNO[1], M.A. DI NAPOLI[1], A.R. CAPUTO[1], L. SEPE[1]

[1] Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in agricoltura, Unità di ricerca per la Zootecnia Estensiva (CRA-ZOE), Muro Lucano (PZ), Italia;
[2] Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in agricoltura, Centro di ricerca per la Cerealicoltura (CRA-CER), Foggia, Italia

Parole chiave: quinoa, pecora, latte, VOC, FAME.

INTRODUZIONE - La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) è uno pseudocereale della famiglia delle Chenopodiacee, originario delle Ande e coltivato in America latina da oltre 5000 anni. È una pianta annuale dalle foglie larghe, chiamata dagli Incas "madre di tutti i grani". Questa specie ha recentemente guadagnato l'attenzione mondiale a causa della sua capacità di crescere in varie condizioni di stress come salinità, acidità, siccità, gelo. La sua granella è una ricca fonte di minerali, vitamine, con un alto livello di PUFA, utili per gli esseri umani, e di proteine (13 - 22%) di alta qualità, che presentano un insieme equilibrato di aminoacidi essenziali (Gonzalez et al., 1989). La letteratura sull'uso in zootecnia è relativamente scarsa. I lavori più recenti riportano uno studio sui conigli e suini (Martens et al., 2012), mentre per gli ovini, riportano uno studio sull'effetto dell'uso di sottoprodotti della quinoa sulla fertilità di arieti (Vargas Benavides, 2007). Considerato il suo valore nutrizionale, nell'ottica di un miglioramento della qualità nutraceutica della produzione zootecnica, è stato condotto uno studio per valutare l'effetto di una dieta a base di quinoa sulla qualità del latte ovino.

MATERIALI E METODI - La ricerca è stata condotta a Foggia (76 s.l.m.) presso il CRA-CER (parte agronomica) e l'azienda sperimentale del CRA-ZOE, utilizzando 20 pecore di razza Sarda, distribuite in due gruppi, omogenei per peso (42±1,92kg) e giorni di lattazione (140±1,92 d). I gruppi sono stati alimentati *ad libitum* con una miscela di fieno Avena-Veccia (gruppo AV) e con quinoa (cv. Regalona baer) (gruppo Q) allo stato fresco (stelo, foglie e semi). Entrambi i gruppi hanno ricevuto il medesimo concentrato commerciale (400g/capo/d). Campioni individuali di latte sono stati prelevati (in duplicato) per 3 giorni consecutivi nella quarta settimana di prova. I composti organici volatili (VOC) del latte sono stati estratti con il metodo dello spazio dinamico di testa secondo il metodo modificato da Ciccioli et al. (2004) (GC/MS Agilent 7890A GC, MSD 5975C) e identificati attraverso la comparazione con gli spettri di massa della libreria Wiley 275. Gli acidi grassi metilici esterificati (FAME) sono stati estratti secondo Bligh and Dyer (1959) e separati mediante GC (Varian 3800) dotato di detector FID. Sono stati calcolati gli indici nutrizionali (Indice Trombogenico) e l'Health Promoting Index (Chen et al., 2004). L'elaborazione statistica è stata eseguita con la procedura GLM (SYSTAT 13) e le medie sono state comparate per mezzo del Duncan multiple range test.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Dopo una fase di adattamento, le pecore hanno appetito la dieta a base di quinoa, i risultati evidenziano che il trattamento alimentare ha influenzato il profilo dei VOC e la composizione di acidi grassi del latte ovino.

Il latte del gruppo Q ha mostrato un contenuto maggiore (P<0,05) per le classi di idrocarburi e terpeni, rispetto al gruppo AV. Ciò può essere in parte dovuto allo stato a cui l'alimento sperimentale è stato distribuito (fresco) rispetto alla dieta di controllo (fieno), e in parte alla qualità aromatica della pianta, per la quale non esistono molti dati in letteratura. Il profilo acidico del latte del gruppo Q ha mostrato differenze altamente significative per quasi tutte le classi di FAME. In particolare, sia gli acidi grassi insaturi sia i polinsaturi sono aumentati significativamente (P<0,001); allo stesso modo il contenuto in CLA, oggetto di crescente interesse per le sue proprietà antitumorali, è quasi raddoppiato, mentre l'EPA ha mostrato solo una tendenza all'aumento. Di conseguenza, gli indici nutrizionali (IT e HPI) sono variati significativamente (P<0,001) nel latte del gruppo Q. I risultati di questa prova hanno evidenziato un miglioramento significativo della qualità nutraceutica del latte ovino. Nell'ottica di una zootecnia sostenibile e considerando la richiesta del consumatore di prodotti zootecnici che contribuiscano al proprio benessere, questi dati risultano interessanti per l'uso di questa specie in zootecnica per la produzione di latte di qualità.

Tabella 1 - Effetto della quinoa sul profilo aromatico (VOC - u.a.) del latte di pecora.

	AV	Q	Effetto quinoa
Aldeidi	4,90	3,60	NS
Idrocarburi	3,66 b	5,11 a	*
Alcoli	5,94 a	2,31 b	*
Terpeni	3,57 b	5,37 a	*
VOC Totali	**14,12**	**15,01**	**NS**

Tabella 2 - Effetto della quinoa sul profilo degli acidi grassi nel latte di pecora (% FAME e indici nutrizionali).

FAME	AV	Q	Effetto quinoa
Saturi	67,65 a	61,07 b	***
Insaturi	31,96 b	38,92 a	***
Monoinsaturi	26,86 b	32,87 a	***
Polinsaturi	5,01 b	6,05 a	***
Omega-3	1,00	0,97	NS
Omega-6	3,71 a	3,29 b	*
ALA	0,48 b	0,56 a	**
CLA	0,38 b	0,58 a	***
EPA	0,18	0,19	NS
DHA	0,22 a	0,15 b	*
Indici nutrizionali			
IT	3,14 a	2,49 b	***
HPI	0,44 b	0,63 a	***

Effetto: NS = non significativo; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.
Lettere diverse sulla stessa riga (a,b) differiscono per P ≤ 0,05.

Key words: quinoa, sheep, milk, VOC, FAME.

Effect of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) on the aromatic and fatty acid composition of sheep milk

Bibliografia

Bligh E., Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemisty and Physiology. 37, pp. 911-917.

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. J. Agric. Food Chem. 52, 3422-3428.

Ciccioli P., Brancaleoni E., Frattoni M., Fedele V., Claps S., Signorelli F. (2004), Quantitative determination of volatile organic compounds (VOC) in milk by multiple dynamic headspace extraction and GC/MS. Annali di Chimica, 94: 669-678.

Martens S.D., Tiemann T.T., Bindelle J., Peters M., E. Lascano C. (2012), Alternative plant protein sources for pigs and chickens in the tropics - nutritional value and constraints: a review. J. of Agri. Rural Dev. Tropics and Subtropics Vol. 113 No. 2, 101-123.

Vargas Benavides A. (2007), Efecto de subproductos de quinua (Chenopodium quinoa Willd) sobre la fertilidad en ovinos (ovis aries) mejorados corriedale. Tesi di laurea, Universidad Tecnica De Oruro, Facultad De Ciencias Agrícolas Pecuarias Y Veterinarias, Carrera De Zootecnia Veterinaria, Bolivia.

Gonzalez J.A., Roland A., Gallardo M., Escudero T., Prado F.E. (1989), Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from Inca crops: Chenopodium quinoa ('quinoa'). Plant Foods for Human Nutrition 39: 331-337.

Sarcocystis sp. e *Toxoplasma gondii*: prevalenza, isolamento in vitro e identificazione con Polymerase Chain Reaction in ovini di razza Cornigliese

C. BACCI[1], A. VISMARRA[1], F. SCIARRONE[2], M. GENCHI[3], M. FABBI[3], E. LANZONI[1], F. BRINDANI[1], L. KRAMER[1]

[1] Dipt. Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma
[2] Azienda Unità Sanitaria Locale, Langhirano (PR)
[3] Isituto Zooprofilattico Sperimentale, Pavia

Parole chiave: *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., Cornigliese, prevalenza, in vitro.

INTRODUZIONE - La pecora Cornigliese (o del Corniglio) è una razza da carne autoctona, originaria dell'alto Appennino parmense (Emilia-Romagna). L'allevamento viene tradizionalmente condotto in greggi transumanti fra le provincie di Parma, Reggio Emilia e Modena. È una razza attualmente considerata a rischio di estinzione e si contano circa 800 capi. *Sarcocystis* sp è agente responsabile di aborti nella pecora e di gravi quadri di miosite e di encefalomielite nell'agnello (Dubey e Rosenthal, 2013). *Toxoplasma gondii*, invece, è un noto agente abortigeno nell'ovino e una fra le zoonosi parassitarie trasmesse con il cibo più frequente (Jones & Dubey, 2012). Entrambi i parassiti possono causare gravi danni all'economia dell'allevamento ovino. Lo scopo del presente studio è di determinare la prevalenza di infezione, l'isolamento *in vitro* e l'identificazione genetica di *Sarcocystis* sp. e *T. gondii* in campioni prelevati in sede di macellazione di pecore di razza cornigliese.

MATERIALI E METODI - I campioni sono rappresentati da n.9 cuori di pecore di razza Cornigliese allevate nella provincia di Parma, sull'Appennino Tosco-Emiliano. Da ogni campione è stato prelevato meat juice, ottenuto congelando a -20°C per 18-24 ore la punta del miocardio, poi utilizzato per il test ELISA (ID SCREEN® TOXOPLASMOSIS INDIRECT MULTI-SPECIES, IDvet). La restante parte del campione è stata conservata sottovuoto a +4°C. Da tutti i campioni, positivi e negativi, è stato estratto il DNA (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit-Invitrogen). Solamente i campioni positivi al test ELISA sono stati seminati su cellule VERO, dopo digestione acido-peptica (Zintl *et al.*, 2009). *T. gondii* è stato identificato mediante PCR utilizzando i primers TOX4 e TOX5 (Homan *et al.*, 2000), mentre per *Sarcocystis* sp. si è utilizzata una PCR-RFLP, che prevede un'amplificazione del gene target 18S rRNA, seguita da una digestione dell'amplificato con l'enzima di restrizione BseD (Ho *et al.*, 1996). In ogni reazione di amplificazione sono stati impiegati opportuni controlli positivi rappresentati da ceppi di campo, genotipizzati e sequenziati, isolati rispettivamente presso il Dipartimento di Sc. Medico-Veterinarie di Parma e l'Istituto Zooprofilattico di Pavia.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Nella tabella 1 sono riportati i risultati delle analisi sierologiche, dell'isolamento in vitro e dell'identificazione molecolare di *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* sp. in pecore cornigliesi. La prevalenza di *Sarcocystis* sp. è stata del 100%. L'identificazione di specie di *Sarcocystis* coinvolta è attualmente in corso. Tuttavia, in assenza di macrocisti nel miocardio all'ispezione visiva, è probabile che si tratti di *S. tenella (ovicanis)*. La prevalenza di *T. gondii* è stata del 55% utilizzando la sierologia e l'isolamento in vitro. I risultati confermano che il meat juice ELISA, come riportato da altri (Dubey, 1998), consente la valutazione della prevalenza di infezione da *T. gondii* in sede di macellazione. L'isolamento in vitro, invece, permette di verificare se il parassita è ancora vitale ed infettante. Tuttavia, la sensibilità dell'identificazione molecolare è risultata superiore ed è stata del 88%.

La tutela delle razze autoctone è necessaria per garantire la continuità dell'allevamento tradizionale e per valorizzare i prodotti derivati. Tuttavia, l'allevamento estensivo, in modo particolare l'allevamento ovino allo stato brado e transumante, è associato a rischi di tipo sanitario e zoonosico. I risultati del nostro studio, anche se effettuato su un numero limitato di animali, indicano che *Sarcocystis* sp. e *T. gondii* sono presenti negli ovini cornigliesi con prevalenze altissime. Pertanto si renderebbero necessari ulteriori studi degli effetti di *Sarcocystis* sp. e *T. gondii* in una razza autoctona a rischio di estinzione, per garantire una corretta gestione sanitaria e produttiva.

Tabella 1 - Risultati per *Sarcocystis* sp. e *T. gondii.*

Campione	Test ELISA*	Isolamento in vitro*	PCR	
			TOX4-TOX5	*18S rRNA*
1 OV	-	/	+	+
2 OV	+	Positivo	+	+
3 OV	+	Positivo	+	+
4 OV	+	Positivo	+	+
5 OV	+	Positivo	+	+
6 OV	-	/	+	+
7 OV	+	Positivo	+	+
8 OV	-	/	+	+
9 OV	-	/	-	+

* Eseguiti solo per T. gondii.

Sarcocystis sp. and *Toxoplasma gondii*: seroprevalence, *in vitro* isolation and pcr identification in the indigenous sheep breed cornigliese

Key words: *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., Cornigliese, prevalence, *in vitro.*

Bibliografia

Dubey JP. (1998). Refinement of pepsin digestion method for isolation of Toxoplasma gondii from infected tissues. Veterinary Parasitology 15; 74(1):75-7.

Dubey JP, Rosenthal BM. Sarcocystis capracanis-associated encephalitis in sheep. (2013). Vet Parasitol., 197(1-2).

Ho MS., Barr BC., Marsh AE., Anderson ML., Rowe JD., Tarantal AF., (1996). Identification of bovine Neospora parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. Journal of Clinical Microbiology 34(5):1203-8.

Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Internal Journal for Parasitology 30(1):69-75.

Jones JL & Dubey JP. (2012) Foodborne toxoplasmosis. Clinical Infectious Diseases 55(6):845-51.

Zintl A, Halova D, Mulcahy G, O'Donovan J, Markey B, DeWaal T. (2009). In vitro culture combined with quantitative TaqMan PCR for the assessment of Toxoplasma gondii tissue cyst viability. Veterinary Parasitology 164(2-4):167-72.

Forma acuta letale da *Cysticercus tenuicollis*: case report in agnelli di razza sarda in Italia

E. BANDINO[1], G. URRAI[2], P. NICOLUSSI[1], M. MULAS[1], L. GODDI[1], G. SANNA[3], A. VARCASIA[3], A. SCALA[3]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari
[2] Veterinario Associazione Regionale Allevatori della Sardegna
[3] Dipartimento di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Sassari

Parole chiave: ovino, *Cysticercus tenuicollis*, praziquantel, Sardegna (Italia).

INTRODUZIONE - Obiettivo del presente studio è quello di segnalare un grave episodio di cisticercosi acuta da *Cysticercus tenuicollis* che ha determinato il decesso di vari agnelli da rimonta in Sardegna. Nell'ambito di questo focolaio è stato inoltre monitorato il quadro di funzionalità epatica e valutata l'efficacia di un trattamento a base di praziquantel.

MATERIALE E METODI - L'episodio di mortalità monitorato il 13 gennaio 2014 ha interessato n°25 agnelli da rimonta di razza sarda di circa 60-70 giorni di età del peso di circa 18-20 kg svezzati a 35-40 giorni. Il 29 dicembre 2013, ossia 15 giorni prima dell'insorgenza dei primi sintomi, gli agnelli sono stati ricoverati in un capannone con una vecchia lettiera. Gli agnelli deceduti sono stati sottoposti ad autopsia.
Al momento dei primi decessi (giorno 0) è stato effettuato un esame clinico degli agnelli sopravvissuti e prelevato da n°13 soggetti sangue venoso, che è stato prelevato nuovamente dopo 30 giorni (giorno 30) su n°20 agnelli. Su tutti gli agnelli sopravvissuti al momento del primo prelievo ematico è stato effettuato un trattamento per via orale a base di praziquantel (Neomansonil® - Bayer S.p.a.), al dosaggio di 15 mg/kg pv, pari a 4 volte quello consigliato per il trattamento nei confronti di *Moniezia* spp.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - In seguito al decesso nell'arco di 48 ore di 4 soggetti, sui restanti 11 di 21 agnelli (52,4%) si sono riscontrati i seguenti sintomi: inappetenza, ipodinamia e adinamia, dolorabilità evidente alla palpazione dell'addome. Dopo due giorni dal primo controllo, un giorno dopo l'attuazione del trattamento antiparassitario, è deceduto un altro agnello. In totale quindi è stata riscontrata una mortalità pari al 20% (5/25) con una morbilità del 64% (16/25). A distanza di 5 giorni dal nostro intervento, tutti gli agnelli sopravvissuti sono stati trasferiti in un nuovo capannone preventivamente ripulito, disinfettato con calce e con lettiera nuova; in questa data è stata registrata una regressione praticamente totale dei sintomi.
Gli esami autoptici attuati sui soggetti deceduti hanno rilevato a livello epatico un aumento del volume dell'organo che si presentava di colorito giallo-brunastro e friabile al tatto e in preda ad una grave epatite e periepatite diffusa acuta di origine parassitaria. Sia in superficie, sia in profondità nel parenchima, sono stati osservati numerosi tragitti emorragici al cui interno era possibile talvolta rilevare, così come anche a livello sottopleurico, forme larvali di *C. tenuicollis* di 8-10 mm. A livello polmonare sono stati rilevati fenomeni di congestione ed edema, con polmonite bilaterale multifocale. L'esame dei parametri biochimici ematici, monitorati all'esordio della malattia, ha permesso di rilevare un aumento, rispetto ai valori normali, delle ALP, della bilirubina totale (BT), GGT, GOT e GPT, mentre risultavano nella norma le albumine (ALB), la creatinina (CRE), le proteine totali (PT) e l'urea (UR). A distanza di 30 giorni dai primi prelievi, dopo il trattamento con il praziquantel, sono state registrate delle variazioni significative, e, in particolare, un aumento delle ALB (P=0,025), delle PT (P= 0,004) e una diminuzione di BT (0,003), CRE (0,002), GGT (P< 0,000) e GOT (P= 0,001).
Il trattamento antielmintico con praziquantel ha determinato una drastica riduzione della mortalità (un solo soggetto è deceduto dopo 24 ore dall'intervento) e una remissione dei sintomi, con ripresa dell'alimentazione e maggior vitalità di tutti i soggetti trattati.
Il focolaio di cisticercosi acuta viscerale letale da *C. tenuicollis* rappresenta il primo segnalato "ufficialmente" nell'ovino in Italia (in precedenza era stato descritto un episodio analogo in 6 capre adulte e 1 capretto allevati in aree del modenese (Manfredi *et al*., 2006) e uno dei pochi riscontrati nella specie ovina nel mondo. Appare evidente che a scatenare questo episodio possa essere stato l'elevato grado di contaminazione ambientale da parte di uova/proglottidi di *Taenia hydatigena* presumibilmente eliminate dai cani aziendali che avevano avuto la possibilità di accedere al capannone nel quale sono stati rinchiusi successivamente gli agnelli.
Le variazioni di alcuni parametri biochimici ematici da noi monitorati, quali gli aumenti significativi di ALP, insieme alla diminuzione di PRO e alla mancata variazione rispetto alla norma di CRE, coincidono con quanto riscontrato da Radfar *et al.* (2014) in un caso di cisticercosi nelle capre e da Manfredi *et al.* (2006) in capre e capretti con cisticercosi acuta. Dopo il trattamento con il praziquantel, il rientro nell'arco di un mese dei parametri biochimici, depone per un'efficacia di questa molecola nel controllo della cisticercosi acuta da *C. tenuicollis* negli agnelli. Tale dato risulta ulteriormente avvalorato dal fatto che la somministrazione del farmaco alle dosi da noi utilizzate (15 mg/Kg pv, cioè 4 volte quella indicata per il trattamento delle infestioni da *Moniezia* spp.), ha determinato una pronta regressione dei sintomi e un arresto praticamente totale degli episodi di mortalità; la morte di un unico soggetto dopo 24 ore dal trattamento è probabilmente da ascrivere alla presenza di lesioni e alterazioni irreversibili.
Con il presente studio si segnala quindi, per la prima volta in Italia, e "ufficialmente", un grave focolaio di cisticercosi acuta da *C. tenuicollis* negli ovini ad esito letale e si conferma il carattere episodico di tali infestioni che ricorrono preferibilmente nel periodo invernale e colpiscono gli agnelli di circa 2 mesi di età, considerati soggetti estremamente recettivi.

Acute and lethal outbreak of visceral cysticercosis by *Taenia hydatigena* in sardinian lambs, Italy

Key words: sheep, *Cysticercus tenuicollis*, praziquantel, Sardinia (Italy).

Bibliografia

Manfredi M.T., Ghirardelli R., Zanzani S. (2006). Cysticercus tenuicollis infection in a goat farm. Parassitologia 48(3): 433-436.

Radfar M.H., Zarandi M.B., Bamorovat M., Kheirandish R., Sharifi I. (2014). Hematological, biochemical and pathological findings in goats naturally infection with Cysticercus tenuicollis. Journal of Parasitic Diseases 38(1): 68-72.

Caratterizzazione molecolare di *Staphylococcus aureus* isolato da prodotti lattiero caseari ovicaprini provenienti dalla provincia di Foggia

M.G. BASANISI[2], G. NOBILI[1], G. LA BELLA[1], R. RUSSO[2], G. SPANO[2], G. NORMANNO[2], G. LA SALANDRA[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata
[2] Università degli Studi di Foggia, Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente

Parole chiave: *Staphylococcus aureus*, PVL, biofilm, sicurezza alimentare.

INTRODUZIONE - *Staphylococcus aureus* è uno dei più importanti patogeni di origine alimentare ed è frequentemente responsabile di casi di intossicazione alimentare. La sua patogenicità è legata alla produzione di enterotossine stafilococciche (*staphyloccocal enterotoxins* -SEs), di natura proteica, stabili al calore e resistenti alle proteasi come tripsina e pepsina. È noto che la patogenicità di alcuni isolati è notevolmente aumentata dalla presenza di altri fattori di virulenza, quali la capacità di sintetizzare biofilm, che porta ad una popolazione di cellule multistratificate racchiuse in matrici polisaccaridiche in grado di sviluppare su superfici inerti o viventi, e la produzione di leucocidina Panton-Valentine (PVL), una tossina che causa la lisi dei leucociti.
L'uso degli antibiotici nelle pratiche veterinarie può determinare la selezione di cloni di *S. aureus* antibiotico resistenti, in particolare *S. aureus* resistenti alla meticillina (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA) che rappresentano un problema di salute pubblica di primaria importanza in termini di morbilità, mortalità, interventi terapeutici e costi sociali.
Considerata l'importanza della produzione e trasformazione di latte ovicaprino per l'economia regionale pugliese ed in particolare per il territorio di Capitanata, obiettivo di questo lavoro è monitorare la popolazione di *S. aureus* in campioni di formaggio ovino e caprino prodotto da aziende site in provincia di Foggia.
MATERIALI E METODI - Nel periodo compreso tra marzo 2013 e aprile 2014 sono stati analizzati 90 campioni di prodotti lattiero caseari di origine ovicaprina (canestrato fresco e semistagionato, cacio ricotta, ricotta) prelevati dal personale veterinario ASL e pervenuti, refrigerati (4°C), all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, sede di Foggia, dove sono stati processati.
L'isolamento dei ceppi è stato eseguito secondo la norma EN ISO 6888 1-2 1999 con l'utilizzo del terreno Baird Parker RPF Agar (Biolife). Per ogni campione sono state individuate 5 colonie dall'aspetto tipico di stafilococchi coagulasi-positivi che sono state sottoposte ad ulteriori caratterizzazioni fenotipiche e molecolari.
I ceppi sono stati identificati come *S. aureus* mediante l'utilizzo del terreno CHROMagar™ (CHROMagar Microbiology, Parigi, Francia) e di sistemi biochimici miniaturizzati (API Staph, bioMérieux).
Gli isolati sono stati successivamente sottoposti a tipizzazione genotipica mediante PCR *end-point*.
Il DNA dei singoli isolati è stato estratto con DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen.
Ciascun ceppo è stato sottoposto a PCR per la rivelazione di 12 geni specifici per le enterotossine stafilococciche (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sem*, *sen* e *seo*) seguendo i protocolli modificati di diversi autori (Boerema *et al.*, 2006; Løvseth *et al.*, 2004; Monday *et al.*, 1999) e del gene *mecA*, responsabile della resistenza alla meticillina (Murakami *et al*, 1991).
Gli isolati sono stati saggiati anche per la ricerca dei geni *lukF-PV* e *lukS-PV*, codificanti la tossina PVL (Hesje *et al*, 2011) e del gene *icaA* (*intercellular adhesion*), responsabile della produzione di biofilm (Zmantar *et al.*, 2008).
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Trentasette (41.1%) dei 90 campioni di prodotti lattiero caseari di origine ovicaprina, sono risultati positivi per la presenza di *S. aureus*. La caratterizzazione molecolare per la rilevazione dei geni codificanti le SEs ha dato i seguenti risultati: dei 37 isolati, il 18.9% possiede uno dei geni codificanti le SEs (7/37); *sec* risulta il gene più frequente (3/7; 42.8%) seguito da *seh* (2/7; 28.6%), *sea* (1/7; 14.3%) e *see* (1/7; 14.3%).
La ricerca del gene *mecA* ha dato esito positivo in un ceppo di *S. aureus* (1/37; 2.7%). Questo ceppo è risultato positivo anche per la presenza del gene *seh*.
Nessun ceppo di *S. aureus* veicolava i geni *lukF-PV* e *lukS-PV*. La prova di PCR per rilevare il gene *icaA* ha dato positività in 35 isolati (35/37; 94.6%), dimostrando una notevole propensione dei ceppi in esame alla formazione di biofilm batterici.
L'isolamento di *S. aureus* enterotossigeni (18.9%) e di un ceppo MRSA (2.7%), rivela la presenza di un potenziale rischio per la salute del consumatore e suggerisce l'adozione di strategie di prevenzione. Ulteriori approfondimenti relativi all'individuazione della fonte di contaminazione dei campioni positivi si rendono necessari.
Il miglioramento delle pratiche igieniche nei punti critici delle diverse fasi di produzione rappresenta un punto chiave per garantire la sicurezza microbiologica di questi prodotti.
L'elevata propensione a produrre biofilm che gli isolati hanno dimostrato di possedere, costituisce un potenziale problema per la filiera lattiero-casearia in quanto il batterio protetto dalla sua stessa matrice può risultare resistente agli usuali trattamenti antibiotici e disinfettanti. Ciò impone una accurata riflessione sull'uso degli antimicrobici nella pratica veterinaria e sulle tecniche di sanificazione usate negli allevamenti ed impianti di trasformazione.
Va sottolineato che il settore ovicaprino in Puglia e nella Capitanata risulta ancora molto legato a tipologie di allevamento semi-brado e a tecniche di mungitura manuale, che predispongono la materia prima alla contaminazione. In quest'ottica, apportare delle innovazioni di processo nella filiera dei prodotti lattiero caseari, potrebbe condurre alla riduzione del rischio microbiologico di questi alimenti.

Molecular characterization of *S. Aureus* Isolated from ovine and goat dairy products in the province of Foggia

Key words: *Staphylococcus aureus*, PVL, biofilm, food safety.

Bibliografia

Boerema JA, Clemens R, Brightwell G. (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of Staphylococcus aureus. International Journal of Food Microbiology; 107(2):192-201.

Hesje CK, Sanfilippo CM, Haas W, Morris TW. (2011). Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus isolated from the eye. Current Eye Research; 36(2): 94-102.

Løvseth A, Loncarevich S, Berdal KG. (2004). Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. Journal of Clinical Microbiology; 42, 3869-3872.

Monday SR, Bohach GA. (1999). Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. Journal of Clinical Microbiology; 37, 3411-3414.

Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. (1991). Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology; 29 (10): 2240-4.

Zmantar T, Chaieb K, Makni H, Miladi H, Abdallah FB, Mahdouani K, Bakhrouf A. (2008). Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical Staphylococcus aureus. Journal of Basic Microbiology; 48(4): 308-14.

Un protocollo per la valutazione del benessere nella capra: risultati della consultazione con le Parti Sociali in Italia

M. BATTINI[1], S. BARBIERI[1], L. FERRARI[1], G. BRUNI[2], G. ZANATTA[2], E. CANALI[1], S. MATTIELLO[1]

[1] Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica
[2] Servizio di Assistenza Tecnica agli Allevamenti (SATA) Sezione Caprini e Ovini, Associazione Regionale Allevatori Lombardia (ARAL)

Parole chiave: benessere, capra, stakeholder, fattibilità.

INTRODUZIONE - Nell'ambito del 7° Programma Quadro dell'Unione Europea (FP7-KBBE-2010-4), il Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET) dell'Università degli Studi di Milano partecipa al progetto europeo "Development, integration and dissemination of animal-based welfare indicators, including pain, in commercially important husbandry species, with special emphasis on small ruminants, equidae and turkeys - AWIN". Il principale obiettivo del progetto è realizzare dei protocolli di valutazione del benessere in campo, attraverso l'uso di indicatori diretti sugli animali, per diverse specie, comprese le capre. Il protocollo dovrà essere valido, ripetibile e, soprattutto, fattibile, ovvero economico e di facile e rapida esecuzione in campo. La fattibilità è una caratteristica particolarmente importante, perché condiziona l'accettazione del protocollo da parte degli allevatori. Per questo motivo, AWIN ha voluto coinvolgere gli stakeholders, ovvero allevatori ed esponentidel mondo operativo (associazioni di allevatori, tecnici, produttori, grande distribuzione e consumatori finali), fin dalle prime fasi di stesura dei protocolli, con l'obiettivo di trovare un consenso tra le parti sociali interessate. Il presente lavoro ha lo scopo di presentare i risultati dell'indagine a livello nazionale.

MATERIALI E METODI - Sono stati utilizzati due strumenti di consultazione. Il primo strumento è stata un'indagine *online* tradotta in 5 lingue, disponibile per 15 mesi sul sito del progetto AWIN e su altri siti istituzionali, con lo scopo di raccogliere le opinioni delle parti sociali circa le necessità delle capre in allevamento e gli indicatori più appropriati per individuarle. Successivamente, durante un seminario SATA Sezione Caprini, è stato sottoposto un questionario ai presenti, per raccogliere informazioni sul potenziale di accettabilità e sulle caratteristiche richieste per un protocollo di valutazione del benessere in campo nelle capre. Tra gli aspetti su cui interrogarsi è stato richiesto quali obiettivi dovrebbe avere tale protocollo e da chi dovrebbe essere utilizzato; quanto tempo è accettabile impiegare in stalla per un'efficace valutazione; quali effetti indesiderati non devono essere causati dall'applicazione del protocollo.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'indagine *online* ha raccolto 21 adesioni in lingua italiana. In risposta alla domanda "Che cosa serve a una capraper essere in buone condizioni di benessere?", le risposte hanno permesso di individuare quattro aree tematiche (che di fatto corrispondono ai quattro Principi adottati da AWIN): 24 risposte hanno riguardato l'alimentazione (alimento solido e acqua), 12 la stabulazione (spazio sufficiente, pulizia della lettiera); 6 la salute (igiene e assenza di malattie) e 17 il comportamento (comportamento normale, tranquillità, accesso al pascolo). Per ciascuna di queste aree è stato chiesto agli intervistati di individuare degli indicatori direttamente rilevabili sugli animali. Le risposte sono riassunte in Tab. 1. I risultati dell'indagine hanno confermato la buona strada intrapresa da AWIN nella selezione degli indicatori più promettenti da inserire nel protocollo. Infatti, la maggior parte degli indicatori indicati corrispondono a quelli già selezionati nel corso del progetto (es.: BCS, condizioni del mantello, zoppie, ascessi, lesioni, condizione degli unghioni, paura, presenza di animali isolati, ecc.; Mattiello et al., 2014). Durante il seminario SATA, hanno compilato il questionario 21 persone su 40 presenti. I risultati hanno evidenziato come un protocollo di valutazione del benessere debba essere principalmente concepito come uno strumento per l'allevatore, utile per il miglioramento della gestione aziendale, e non come un ulteriore strumento ispettivo. La valutazione del benessere delle capre dovrebbe essere gestita dal veterinario o dagli allevatori stessi per autocontrollo. Il protocollo dovrebbe, inoltre, evitare di gravare sull'economia delle aziende, imponendo cambiamenti strutturali o sanzioni agli allevatori e dovrebbe arrecare il minor stress possibile agli animali. Tra gli aspetti pratici, la durata della valutazione in campo è di fondamentale importanza: secondo la maggior parte degli intervistati, il protocollo dovrebbe richiedere una permanenza complessiva in stalla di 1-2 ore, e il controllo individuale degli animali dovrebbe avere una durata massima da 1 a 5 minuti. Le risposte sottolineano, quindi, una particolare attenzione rispetto alla necessità di realizzare protocolli di rapida esecuzione, limitando il disturbo all'allevatore e agli animali stessi. Lo sforzo di AWIN è di prendere in considerazione tutti questi suggerimenti al fine di sviluppare un protocollo che da un lato fornisca informazioni attendibili ed esaurienti sullo stato di benessere delle capre e dall'altro sia realmente operativo e attuabile in tempi accettabili.

Tabella 1 - Numero di risposte ai questionari fornite nell'indagine *online* per ciascun indicatore individuato, suddiviso per aree tematiche.

Secondo la Sua esperienza, cosa valutain una capra per affermare che:		
Area tematica	**Parametro**	**n. risp.**
è alimentata in modo corretto	Condizione corporea	10
	Condizione del mantello	4
	Diarrea	2
	Libero accesso alla mangiatoia	1
l'ambiente in cui vive è confortevole	Comportamento (aggressività, nervosismo)	6
	Pulizia	5
	Lesioni	3
	Zoppie - Condizioni degli unghioni	2
è in buona salute	Comportamento (vivacità, postura)	17
	Condizione del mantello	14
	Condizione corporea	7
	Conformazione della mammella	5
	Diarrea - Ascessi - Lesioni	4
	Zoppie	3
	Condizioni degli unghioni - Scoli	2
	Presenza di animali isolati	1
ha un comportamento normale	Presenza di comportamenti positivi (esplorazione, gioco)	21
	Assenza di comportamenti negativi (irrequietezza, paura)	17
	Buon rapporto con l'uomo	13
	Assenza di animali isolati o apatici	12
	Interazioni sociali	8

RINGRAZIAMENTI - Gli autori ringraziano il 7° Programma Quadro dell'Unione Europea (FP7-KBBE-2010-4) per aver finanziato il progetto "AWIN - Animal Welfare Indicators".

A protocol for welfare assessment in dairy goats: results of stakeholder consultation

Key words: welfare, goat, stakeholders, feasibility.

Bibliografia

Mattiello S., Battini M., Barbieri S., Vieira A., Stilwell G., Canali E., Zanella A. (2014), Un protocollo per la valutazione del benessere nella capra: i risultati del progetto AWIN. Large Animal Review; Suppl.

Risultati preliminari dell'uso di vaccini stabulogeni per il controllo della "malattia degli ascessi" in allevamenti di capre da latte del Nord Italia

F. BENCETTI[1], G. PEDRINI[2], A. GAFFURI[3], N. MARTINELLI[4], G. LOMBARDI[4]

[1] Medico Veterinario SATA (Associazione Provinciale Allevatori di Bergamo, Milano e Lodi)
[2] Medico Veterinario Libero Professionista
[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Sezione di Bergamo)
[4] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Sezione di Brescia)

Parole chiave: capra, linfadenite caseosa, malattia degli ascessi, vaccino.

INTRODUZIONE - La presenza di ascessi superficiali a localizzazione sottocutanea e linfonodale è un evento patologico piuttosto diffuso negli allevamenti di capre. Gli agenti eziologici maggiormente implicati in queste infezioni sono *Corinebacterium pseudotubercolosis,* responsabile della linfadenite caseosa (LC) e *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius,* che causa la malattia di Morel o malattia degli ascessi (Vindel, 2011). Anche altri microrganismi possono essere responsabili di lesioni ascessuali ed essere isolati in purezza o in associazione, quali ad esempio, *Arcanobacter piogenes, S. aureus, Streptococcus sp Pasteurella multocida* e alcuni anaerobi come *Fusobacterium necrophorum* (De La Fuente *et al.*, 2011; Dominguez-Vernali *et al.,* 2011). La LC e la malattia degli ascessi causano ingenti perdite economiche e possono essere contemporaneamente presenti all'interno di un allevamento. Nella capra le malattie sono caratterizzate da un'elevata contagiosità e si manifestano con la formazione di ascessi a livello di linfonodi superficiali, in particolare di quelli mandibolari, parotidei, prescapolari, precrurali, poplitei e sovramammari (Vindel, 2011). La forma viscerale di LC, caratteristica della specie ovina, si presenta invece di rado, causando una progressiva emaciazione del soggetto colpito e, se coinvolti i linfonodi toracici, sintomi respiratori (Baird *et al.,* 2007). Gli animali si infettano principalmente attraverso le ferite cutanee; altre vie di trasmissione sono quella inalatoria e alimentare (con il colostro la patologia si trasmette ai capretti) (Vindel, 2011). Il pus contenuto negli ascessi, solitamente pastoso e di colore giallo-bianco, è altamente infettante. Il trattamento antibiotico sistemico risulta inefficace. La vaccinazione può contribuire a controllare la diffusione della malattia in allevamento, ma, in Italia, non sono commercializzati vaccini per queste patologie (Aiello *et al*., 2012). Abbiamo pertanto allestito vaccini sperimentali con i ceppi isolati da allevamenti problema per verificarne l'efficacia.

MATERIALI E METODI - La prova è stata condotta a partire da giugno 2012 in 3 allevamenti, 2 situati nella Provincia di Bergamo (A con 600 capre, B con 23 capre) e 1 nella Provincia di Verbano-Cusio-Ossola (C, con 60 capre). In ognuno di essi è stato eseguito un prelievo sterile di materiale purulento dagli ascessi e il campione ottenuto è stato inviato all'IZSLER di Bergamo per l'identificazione dell'agente eziologico. Per la produzione dei vaccini stabulogeni, i ceppi isolati sono stati coltivati in purezza in agar BHI con aggiunta di siero e poi inoculati nel biofermentatore da 15 litri (Biostat C plus, Sartorius). Dopo 24 ore a 37°C, la coltura è stata inattivata con formaldeide al 40%, aggiunta in misura dello 0,8% del volume, e lasciata in agitazione per 24 ore prima di essere raccolta e centrifugata a 5000 rpm per 30 minuti. I pellet batterici così ottenuti sono stati risospesi in soluzione fisiologica, associati nel caso di vaccini bivalenti, ed adiuvati con idrossido di alluminio. Durante la fase di produzione sono stati effettuati controlli di purezza sui ceppi inoculati, di inattivazione e di sterilità sul prodotto finito. Il vaccino così prodotto è stato somministrato alla dose di 2ml/capo per via SC in tutti gli animali adulti; a un primo inoculo è seguito un richiamo a 4 settimane di distanza, poi un secondo richiamo dopo 6 mesi. Parallelamente al protocollo vaccinale, le lesioni sono state continuamente pulite e disinfettate con iodio povidone e perossido di idrogeno per limitare la diffusione del materiale purulento nell'ambiente.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Nell'allevamento A sono stati isolati *Corynebacterium pseudotubercolosis* e *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*; in B e C è stato isolato solo *Corinebacterium pseudotubercolosis***.** Per ciascun allevamento è stato allestito un autovaccino con entrambi i ceppi (all. A) e con un solo ceppo (all. B e C). Per ogni dose è stata inoculata una quantità di batteri, stimata in base alla torbidità della soluzione del pellet risospeso, di 3 miliardi per *C. pseudotubercolosis* e 16 per *S. aureus* subsp. *Anaerobius*. Già dopo la prima somministrazione del vaccino è stato osservato in tutti gli allevamenti un miglioramento clinico della patologia; dopo il richiamo vaccinale a 4 settimane di distanza la diffusione degli ascessi fra gli animali e sullo stesso animale si è arrestata, inoltre si è verificato un riassorbimento del pus negli ascessi con notevole riduzione di volume delle lesioni. Per aumentare l'efficacia del vaccino bisognerebbe sottoporre a vaccinazione tutte le caprette novelle a partire dal 3° mese di età, nonché continuare con richiami semestrali nell'intero gregge (Smith *et al.,* 2009). Inoltre i capretti andrebbero separati dalle madri alla nascita e alimentati con colostro artificiale o trattato termicamente. Quest'ultima precauzione, associata all'eliminazione dei soggetti malati, viene infatti adottata negli allevamenti che intendono eradicare la patologia (Medina *et al*., 2011). La corretta diagnosi eziologica permette di allestire il vaccino stabulogeno con il/ i patogeni responsabili delle lesioni. In alcuni paesi europei ed extraeuropei è disponibile un vaccino tossoide (solitamente associato all'anatossina tetanica) che presenta però due limiti principali: va somministrato in animali non infetti e causa spesso, in particolare nella capra, reazioni avverse gravi (Aiello *et al.,* 2012). Contrariamente, il vaccino stabulogeno sperimentato in questo lavoro ha dimostrato un'ampia maneggevolezza e solo in alcuni soggetti si sono riscontrate lievi reazioni da inoculo.

Preliminary results about autogenous vaccines used to control "abscess disease" in dairy goats farms in northern Italy

Key words: goat, caseous lymphadenitis, abscess disease, vaccine.

Bibliografia

Aiello S.E., Mosem. A. editors. (2012). The Merck Veterinary Manual Online. 10th ed.

Baird G.J., Fontaine M. C. (2007), Corynebacterium pseudotuberculosis and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. J. Comp. Path. 137: 179-210.

De La Fuente R., Ballestros C., Bautista V., Medina A., Orden J.A., Dominguez-Vernali G., Vindel A. (2011), Staphylococcus aureus subsp. anaerobius isolates from different countries are clonal in nature. Veterinary Microbiology 150(1-2): 198-202.

Matthews J. G. (2013). Diseases of the Goat. 3rd ed. Wiley-Blackwell. 448 p.

Smith M.C., Sherdan D.M. (2009). Goat Medicine. 2nd ed. Wiley-Blackwel. 888 p.

Windsor P. A. (2011), Control of Caseous Lymphadenitis. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 27(1): 192-202.

Razza ovina Sopravissana: composizione e qualità tecnologica del latte nel corso della lattazione

C. BOSELLI[1], M.C. CAMPAGNA[1], P. DELFINI[2], L. BIANCHI[3], F. FILIPPETTI[1], G. GIACINTI[1], G. GIANGOLINI[1], S. AMATISTE[1], R. ROSATI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, - Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti derivati degli ovini e dei caprini (C.Re.L.D.O.C.)
[2] Libero Professionista
[3] INRA, UMR 1313GABI, équipe LGS, Domaine de Vilvert - 78352 Jouy-en-Josas, Francia

Parole chiave: pecora, Sopravissana, latte, indici reologici.

INTRODUZIONE - La Sopravissana è una razza ovina a triplice attitudine ottenuta nel XIX secolo dall'incrocio fra pecore di razza Vissana con arieti Merino spagnoli e Rambouillet. Nel corso degli ultimi decenni ha subìto una brusca contrazione numerica, (3.840 capi censiti nella Regione Lazio, 2013), e attualmente viene allevata nell'Italia centrale per la produzione di carne e di latte. La produzione di latte è limitata a 100-120 kg per lattazione ed è essenzialmente destinata alla trasformazione casearia. Nel latte di questa razza è stata osservata un'elevata frequenza della caseina α_{s1} D (variante Welsh) (Bianchi et al., 2004) che determina il peggioramento delle caratteristiche reologiche. Il disciplinare di produzione della "Ricotta Romana" D.O.P., prevede, fra l'altro, l'impiego come materia prima di latte proveniente da pecore di razza Sopravissana e suoi incroci (Reg. CE 737; Provv. 20 maggio 2005). Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare l'effetto dello stato di lattazione sulla produzione di latte, sulla composizione chimico-fisica e citologica e sulle caratteristiche reologiche del latte prodotto.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto in un allevamento ovino, ubicato nella provincia di Roma, dove sono presenti oltre 1500 capi di razza Sopravissana. Su 20 animali in diverso ordine di parto, sono stati eseguiti prelievi di latte con cadenza quindicinale dall'entrata in produzione (allontanamento degli abbacchi) fino al termine della lattazione (per circa 80 giorni). Ad ogni prelievo, è stata registrata la produzione di latte individuale (lattometri volumetrici), nella sessione di mungitura meccanica mattutina (6:00) e serale (17:00) e sono stati raccolti campioni di latte per le analisi di laboratorio. Su ciascun campione di latte sono stati determinati i seguenti parametri: grasso (%), proteine (%), lattosio (%), caseine (%), urea (mg/dL) e cellule somatiche **CS** (cells/µL) (Comby-Foss 6000 - Foss Electric). Inoltre sono stati determinati i principali parametri reologici: tempo di coagulazione **r**, velocità di formazione del coagulo **k20** e consistenza del coagulo **a30**, (Formagraph, Foss Electric) secondo la metodica Zannoni ed Annibaldi (1981). L'analisi statistica è stata effettuata con SW Med-Calc versione 9.5.1, utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA ad una via) mentre le correlazioni sono state eseguite con r di Pearson. I risultati sono presentati come valori medi.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'effetto dello stato di lattazione sui parametri studiati è riportato nella tabella 1. La produzione media giornaliera di latte è stata 570 mL/capo, tale valore è simile a quello riscontrato da Bianchi et al. (2004). I valori medi di grasso e lattosio sono comparabili con quanto riportato da Panella et al. (2005), rispettivamente 8,53% vs 8,86% e 4,54% vs 4,47%, mentre i valori medi delle proteine sono risultati inferiori 5,86% vs 6,70%. I valori medi di CS sono risultati pari a 256 cells/µL, superiori al valore di 132 cells/µL riscontrato da Panella et al. (2005) e di 177 cells/µL riscontrato da Bianchi et al. (2004), senza mostrare variazioni significative nel periodo di studio. I valori più elevati sono stati riscontrati in corrispondenza dell'inizio della mungitura meccanica e al termine della lattazione. Relativamente all'analisi reologica l'85,4% dei campioni ha regolarmente coagulato nei 30 minuti di durata della prova. Fra gli indici considerati, **r** (valore medio:18,2 min) decresce dal primo al terzo controllo e cresce col procedere della lattazione, mentre **a30** (valore medio: 45,5mm) mostra un trend crescente, raggiungendo il massimo al 3° controllo, decresce al 4° controllo per aumentare fino al termine della lattazione. Il parametro **k20** (valore medio: 1,71 min) mostra il valore massimo al primo controllo. Per quanto riguarda i parametri reologici, si sono osservate correlazioni positive fra **r** e **k20** (r = 0,16, p<0,05) e negative fra **a30** e gli altri due parametri (r = -0,50, p<0,001; r = -0,29, p<0,01, rispettivamente per **r** e **k20**). Tali valori concordano con quanto evidenziato da numerosi autori (Martini et al., 1999) per il latte ovino. Contrariamente a quanto era atteso, il tempo di coagulazione ha mostrato correlazioni positive, sebbene deboli, sia con le caseine (r = 0,14, p<0,05) sia con le proteine (r = 0,15, p<0,05). In conclusione, il potenziale della razza Sopravissana per la produzione di latte è confermato, dati l'alto contenuto di grasso e proteine ed il ridotto numero di cellule somatiche, durante tutto il periodo di osservazione. In relazione all'elevata frequenza della caseina α_{s1} D si rende necessario ampliare le conoscenze sui parametri reologici e porre attenzione alla selezione dei riproduttori.

Tabella 1 - Valori medi dei principali parametri rilevati nel corso dello studio (Livelli di significatività: $^{a\text{-}b\text{-}c}$ p<0,05).

Parametri	Giorni medi lattazione					
	41 d	56 d	72 d	87 d	102 d	117 d
Latte mL/d	733^{a}	740^{a}	572^{b}	493^{bc}	440^{c}	376^{c}
Grasso %	8,03^{b}	8,30^{b}	8,58^{ab}	8,67^{ab}	8,51^{ab}	9,30^{a}
Proteine %	5,84^{ab}	5,54^{a}	5,65^{a}	6,11^{b}	6,04^{b}	6,01^{b}
Lattosio %	4,66^{a}	4,68^{a}	4,69^{a}	4,37^{b}	4,38^{b}	4,30^{c}
Caseine %	4,64^{ab}	4,54^{a}	4,54^{ab}	4,66^{ab}	4,68^{ab}	4,83^{b}
Urea mg/dL	37,7	36,8	45,7	35,4	37,8	48,1
RSM %	11,28^{a}	10,90^{b}	11,00^{ab}	11,1^{ab}	10,9^{ab}	10,8^{b}
CS cells/	L 336	217	202	197	209	307
r min	19,7^{a}	18,1^{ab}	16,3^{b}	18,0^{ab}	18,2^{ab}	18,4^{ab}
k20 min	2,03^{a}	1,78^{b}	1,49^{b}	1,58^{b}	1,68^{b}	1,67^{b}
a30 mm	43,0^{ab}	47,1^{ab}	47,99^{a}	41,1^{b}	45,6^{ab}	46,7^{ab}

Sopravissana sheep breed: milk composition and technological quality throughout lactation

Key words: sheep, Sopravissana, milk, rheological parameters.

Bibliografia

http://www.assonapa.Com/Consistenze/

Bianchi L., Casoli C., Cecchi F., Chianese L., De Pascale S., Martini M., Pauselli M., Pecchiai M., Salari F., Duranti E. (2004), Preliminary study on sopravissana sheep milk production. Scienza e tecnica Lattiero-Casearia 55: 319-343.

Martini M., Rapaccini S., Giuliotti L., (1999), Coagulation properties of Massese sheep milk: effects of feeding management. Atti XIII Congr. Naz. ASPA, Piacenza.

Panella F., Sarti F.M., Lasagna E., Reieri C., Antonini M. (2006), The old Italian Merino-derived breeds and their role in landscape conservation in typical product and in the maintenance of traditional culture. Livestock farming systems-Product quality based on local resources leading to improved sustainability, EAAP publication No. 118, 2006 Benevento Italy, 247-252.

Provvedimento 20 maggio 2005 pubblicato su: G.U. n. 12 del 01/06.

Reg. (CE) 737 del 13/05/05 pubblicato su: GUCE n. 122 serie L del 14/05/05.

Zannoni M., Annibaldi S. (1981), Standardization of the renneting ability of milk by formagraph. Scienza e tecnica lattiero-casearia 32:79-94.

Studio delle relazioni uomo-animale nella specie caprina

A. BRAGAGLIO[1], M. SERRAPICA[1], F. NAPOLITANO[1], A. GIROLAMI[1], C. PACELLI[1], G. DE ROSA[2], A. BRAGHIERI[1]

[1] Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università della Basilicata
[2] Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Parole chiave: caprini, benessere animale, distanza di fuga, relazione uomo-animale.

INTRODUZIONE - Il rapporto uomo-animale rappresenta un importante aspetto da considerare nello sviluppo di schemi di valutazione del benessere animale a livello aziendale (Hemsworth e Coleman, 2011) ma solo di recente gli studi a riguardo hanno interessato i piccoli ruminanti (Napolitano et al., 2011). La presente indagine è finalizzata alla messa a punto di metodi di valutazione del rapporto uomo - animale da utilizzare per il monitoraggio del benessere delle capre in lattazione. Pertanto, sono state valutate le relazioni esistenti fra il comportamento degli operatori nel corso della mungitura e le reazioni degli animali all'uomo.

MATERIALI E METODI - La prova ha riguardato 14 aziende caprine, ubicate nella provincia di Potenza. Il numero di animali testati per azienda è variato in relazione alla numerosità dell'allevamento (Cochran, 1977). In ogni azienda è stato condotto un test di approccio, che ha permesso di valutare il numero di animali che si lasciano toccare in un periodo di 2 minuti (Touch2min) camminando lentamente (circa 1 m/sec), e due test di avvicinamento (distanza di fuga alla mangiatoia e nel box di allevamento). Questi ultimi consistono nell'avvicinarsi lentamente (circa 1 m/sec) a un animale (rispettivamente alla mangiatoia o nel box di allevamento) con il braccio leggermente sporgente in avanti, fino a quando il soggetto si ritrae (Waiblinger et al., 2006). Nel corso di questi test sono state rilevate le seguenti variabili: distanza di fuga alla mangiatoia (ADM), distanza di fuga nel box (ADP), numero di soggetti che si lasciano toccare alla mangiatoia (DF0M) e numero di soggetti che si lasciano toccare nel box (DF0P). In sala di mungitura sono stati valutati il comportamento del mungitore, in termini di interazioni positive (POS INT), neutre (NEUT INT) e negative (NEG INT), e quello degli animali durante la mungitura come numero di scalci (Kicks). Sono state considerate come interazioni positive il parlare a bassa voce, l'accarezzare e il toccare gentilmente l'animale; sono state classificate come interazioni neutre fischiare, battere le mani, colpire le partizioni con bastoni o oggetti simili, parlare in modo determinato e deciso, spingere con la mano e toccare con bastoni o oggetti simili; mentre sono state considerate negative le seguenti interazioni: gridare, parlare manifestando impazienza, le spinte e i colpi con le mani o con i bastoni. La correlazione tra le variabili è stata valutata mediante il coefficiente r_s di Spearman, calcolato con il software SAS (Cary, NC, USA), e l'analisi delle componenti principali (PCA), condotta per mezzo del software Unscrambler X 10.1. (Camo, Norway).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'analisi delle componenti principali (Fig. 1) illustra le relazioni fra le variabili rilevate nelle 14 aziende durante i test di avvicinamento e di approccio e nel corso della mungitura. Le prime due componenti della PCA hanno spiegato il 66% della variabilità totale (il 50% la prima componente e il 16% la seconda). Appare evidente (Fig. 1) come le variabili che definiscono un comportamento negativo nei confronti degli animali (NEG INT) siano correlate positivamente con la parte destra dell'asse 1 (loading = 0,3) dove si posizionano anche la distanza di fuga dalla mangiatoia e nel box e il numero di scalci, parametri che indicano un maggiore timore da parte delle capre e malessere nelle interazioni con l'uomo. In quest'area della figura si trovano anche le interazioni neutre che pertanto sono state percepite negativamente dagli animali e andrebbero, possibilmente, ridotte al minimo. In questa parte sono anche localizzate alcune aziende per le quali sarebbe consigliabile un'adeguata formazione degli operatori che ordinariamente accudiscono gli animali per migliorare le loro capacità di interagire con i soggetti allevati. L'atteggiamento e il comportamento verso gli animali possono essere acquisiti attraverso l'esperienza e le informazioni e quindi possono migliorare con nuove esperienze e opportune attività formative (Hemsworth e Coleman, 2011). Nella parte negativa dell'asse 1 si trovano, invece, variabili (DF0M, DF0P, Touch2min), che denotano un rapporto uomo-animale più corretto e caratterizzano alcune aziende in cui, probabilmente, gli addetti hanno instaurato un tipo di interazione con gli animali di migliore qualità. Questi risultati sono confermati dalle correlazioni positive evidenziate fra le interazioni neutre, che in ogni caso non comprendono atteggiamenti favorevoli nei confronti degli animali, e il numero di scalci durante la mungitura (r_s=0,477, P>0,05) e fra le interazioni negative e la distanza di fuga nel box (r_s=0,537, P<0,05). Le interazioni neutre, inoltre, risultano correlate negativamente con la DF0P (r_s=-0,613, P<0,05), con la DF0M (r_s=0,697, P<0,05) e con la variabile Touch2min (r_s=0,669, P<0,001). Le correlazioni esistenti tra comportamento del mungitore, reazioni degli animali in sala di mungitura e reazioni degli animali in allevamento (nel box o alla mangiatoia) indicherebbero la validità di queste ultime variabili per la valutazione della qualità del rapporto uomo - animale negli allevamenti caprini.

Tale correlazione, infatti, confermerebbe che comportamenti negativi dell'uomo si traducono in un aumento del grado di timore da parte degli animali, con inevitabili ricadute negative sul benessere animale e sulla produttività (Hemsworth, 2003).

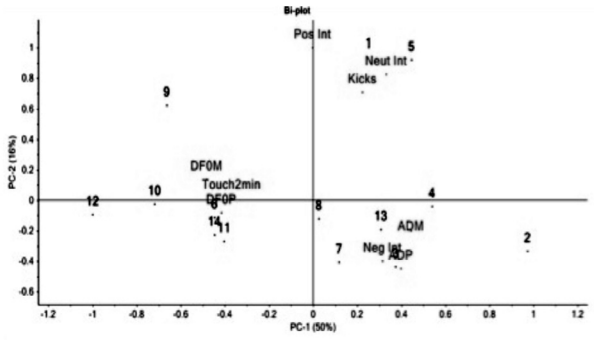


Figura 1 - Analisi delle componenti principali condotta sulle variabili relative al comportamento degli animali nei test di avvicinamento e di approccio e nel corso della mungitura e sul comportamento del mungitore.

Human-animal relationship in dairy goats

Key words: animal welfare, avoidance distance, behaviour, sheep.

Bibliografia

Cochran W.G. (1977), Sampling techniques. Wiley & Sons, New York, USA.
Hemsworth P.H. (2003), Human-animal interactions in livestock production. Appl. Anim. Behav. Sci. 81: 185-198.
Hemsworth P.H., Coleman G.J. (2011), Human-livestock interactions. CAB International ed., Wallingford, UK.
Napolitano F., De Rosa G., Girolami A., Scavone M., Braghieri A. (2011), Avoidance distance in sheep: Test-retest reliability and relationship with stockman attitude. Small Ruminant Research 99: 81-86.
Waiblinger S., Boivin X., Pedersen V., Tosi M.V., Janczak A.M., Visser E.K., Jones R.B. (2006), Assessing the human-animal relationship in farmed species: A critical review. Appl. Anim. Behav. Sci. 101: 185-242.

Metastasi di adenocarcinoma polmonare nelle pecore: esperienze personali

M.T. CAPUCCHIO[1], B. AMATO[2], E. BIASIBETTI[1], A. SAVÌ[2], A. LENA[3], F. GUARDA[1], S.A. MIGNACCA[2], V. DI MARCO LO PRESTI[2]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie - Università degli Studi di Torino
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Area Barcellona P.G. (ME)
[3] ARAS SICILIA

Parole chiave: pecore, adenomatosi, metastasi.

INTRODUZIONE - L'adenomatosi polmonare (APO) degli ovini è una malattia, ad eziologia virale, diffusa in tutto il mondo, con l'eccezione di Australia e Nuova Zelanda (Verwoerd *et al*., 1985). In Piemonte nell'ultimo decennio si è registrata una prevalenza tra i diversi allevamenti, compresa tra 0,8% (Robetto *et al*., 2003) e 1,97% (Lamberti et al., 2006). In Sicilia è stata segnalata recentemente negli ovini (Loria *et al*., 2004; Monteverde *et al.,* 2004), mentre in Sardegna è presente sia negli ovini, sia nei mufloni (Sanna, 2001). Morfologicamente si presenta come un carcinoma bronchiolo-alveolare che origina dalle cellule alveolari di tipo II e dalle cellule di Clara. Se molti aspetti della malattia sono ben noti, ancora poco chiari risultano il grado di malignità e la localizzazione di eventuali metastasi. I linfonodi mediastinici e tracheo-bronchiali sono spesso sede di metastasi; mentre risultano del tutto eccezionali metastasi in altre sedi (pleura parietale, fegato, milza, rene, cuore, mesentere e parete addominale, muscolo, tessuto sottocutaneo). Gli autori riportano lesioni metastatiche ai linfonodi mediastinici in 9 pecore e lesioni metastatiche a muscolo scheletrico, peritoneo, pleura e pericardio, miocardio, fegato e diaframma in 4 ovini affetti da APO.

MATERIALI E METODI - Gli ovini oggetto del presente lavoro sono animali adulti clinicamente silenti provenienti da allevamenti piemontesi e siciliani regolarmente macellati o manifestanti sintomatologia respiratoria in progressivo aggravamento. Durante l'esame *post-mortem* o la necroscopia i polmoni e gli organi coinvolti sono stati inviati al Dipartimento di Scienze Veterinarie di Torino per l'esecuzione dell'esame istopatologico.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Macroscopicamente i polmoni di tutti gli ovini mostravano variabile aumento di peso e disseminati focolai/noduli lardacei, bianco-grigiastri aumentati di consistenza talora protrudenti sulla superficie. Al taglio dell'organo si notava come il parenchima fosse infiltrato da tessuto simil-sarcomatoso. In 9 animali i linfonodi mediastinici apparivano ipertrofici e lardacei, talora con noduli biancastri. In due animali, muscolo scheletrico, fegato e diaframma mostravano numerosi noduli biancastri a margini più o meno sfumati e talvolta con depressione centrale. In 4 soggetti il miocardio presentava noduli simil-lardacei nella parete, nel setto interventricolare o sulla superficie dell'orecchietta sinistra. In un ovino, piccoli noduli ricoprivano la superficie pleurica, il peritoneo, il pericardio e invadevano i linfonodi prescapolari e quelli lombari. Le ricerche istopatologiche sono state effettuate su diversi frammenti di polmone e su campioni dei diversi organi coinvolti. A livello polmonare è stata confermata la diagnosi macroscopica di adenomatosi polmonare in tutti i casi. In tutti i campioni erano presenti proliferazioni di cellule alveolari che formavano strutture acinose papilliformi infiltranti gli alveoli con formazioni digitiformi tali da colmare l'alveolo stesso oppure provocare dilatazioni alveolari molto irregolari. Del tutto simili apparivano le neoformazioni presenti nei linfonodi, nel diaframma, nel fegato e nel muscolo. Nel miocardio si osservavano numerosi lobuli o pseudo-lobuli circondati da cellule cuboidi o cilindriche simili a quelle alveolari. Tutte le neoformazioni erano immerse e circondate da tessuto connettivo fibroso che le separava dal miocardio. In base a quanto riportato in letteratura ed osservato nella presente ricerca, l'APO è una neoplasia a carattere maligno con capacità di metastatizzare. Risulta molto simile all'adenocarcinoma bronchiolo-alveolare dell'uomo, ma al contrario di quest'ultimo le metastasi, benché ci siano dati contrastanti in letteratura, non sembrano molto comuni (Breeze e Wheeldon, 1979). Le metastasi nei linfonodi polmonari sono piuttosto frequenti, mentre negli altri organi sono scarsamente segnalate. Dal punto di vista ispettivo l'APO rientra nella normativa riguardante i tumori, secondo la quale le relative carni sono dichiarate non idonee al consumo umano. In mancanza di tecniche diagnostiche certe *ante-mortem* l'esame istopatologico rappresenta ancora l'indagine indispensabile per la conferma diagnostica, accompagnato dalle tecniche biomolecolari. Secondo gli autori la sua prevalenza, almeno in Italia, è sottostimata negli allevamenti e non viene sufficientemente presa in considerazione alla visita ispettiva al macello. Una maggiore attenzione sarebbe auspicabile in quanto molto spesso l'infezione da retrovirus APO si associa ad altre infezioni respiratorie quali lentivirosi, pseudotubercolosi o polmonite verminosa, senza che sia stato chiarito un suo eventuale ruolo come infezione predisponente o secondaria.

Metastasis of adenomatosis in sheep: personal investigations

Key words: sheep, adenomatosis, metastasis.

Bibliografia

Breeze R.G., Wheeldon E.B. (1979) - Pulmonary adenomatosis. In: Andrews E.J., Ward B.C. e Altman N.H. (Eds) - Spontaneous animal models of human disease. Academic Press N.Y.

Lamberti M., Strola M., Guarda F. (2006). Sulla frequenza delle lentivirosi polmonari degli ovini in Piemonte. Summa Animali da Reddito, 1:35-40.

Loria, G.R., Monteverde, V., Ferrantelli, V., Chetta, M., Di Marco, P., Vazzana, I., Guercio, A. (2004) Small ruminant lentivirus infection (SRLV): un problema dimenticato. Atti del XIII Congresso SIPAOC Siena 29/9-2/10 2004, pag. 173.

Monteverde, V., Vicari D., Di Marco, P., Crucitti D., Ferrantelli V., Loria G.R., Caracappa S. (2004) L'Adenomatosi polmonare degli ovini (APO) in Sicilia: contributo casistico. Atti del XVI Congresso SIPAOC Siena 29/9- 2/10 2004, pag. 185.

Robetto S., Ronchietto F., Pelissero F., Capucchio M.T., Masoero L., Tursi M., Guarda F.(2003) Contributo allo studio sulla frequenza, patologia e sierologia delle lenti virosi polmonari degli ovini in Piemonte. Large Animal Review 9, 53-60.

Sanna M.F. (2001), Sanna E., De las Heras M., Leoni A., Nieddu A.M., Pirino S., Sharp J.M. e Palmarini M. - Jaagziekte sheep retrovirus is associated with ovine pulmonary carcinoma in Sardinian moufflons - J. Comp. Path. 125, 145.

Verwoerd D.W. (1990) - Jaagziekte (Ovine Pulmonary Adenomatosis) Virus. In: Dinter Z., Morein B. (Eds), Virus Infections of Ruminants, Elsevier Science, Amsterdam.

Sorveglianza molecolare di infezioni da *Anaplasma ovis, Babesia ovis* e *Theileria ovis* in ovi-caprini siciliani

S. CARACAPPA, V. BLANDA, C. DI PASQUALE, A. TORINA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Centro Referenza Nazionale Anaplasma, Babesia, Rickettsia e Theileria (C.R.A.Ba.R.T.)

Parole chiave: *Anaplasma*, *Babesia*, *Theileria*, ovi-caprini

INTRODUZIONE - Le Vector-Borne Diseases (VBDs) colpiscono i ruminanti sia nelle regioni tropicali che in quelle subtropicali. Tra esse, particolare rilievo assumono quelle trasmesse da zecche. Tali artropodi ematofagi possono trasmettere virus, batteri e protozoi ai piccoli ruminanti, alcuni dei quali assumono carattere zoonotico. In Italia sono ampiamente descritte le infezioni causate da patogeni appartenenti al genere *Anaplasma*, *Babesia* e *Theileria*. L'agente eziologico dell'anaplasmosi ovina è principalmente *Anaplasma ovis* trasmesso da zecche appartenenti al genere *Rhipicephalus* e *Dermacentor*.La babesiosi, infezione causata dal protozoo *Babesia,* è principalmente ascrivibile al patogeno *Babesia ovis*e si caratterizza per l'elevata patogenicità nelle pecore. La theileriosi negli ovi-caprini è anch'essa una malattia emoprotozoaria causata da *Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis* e *Theileria separata* (Gholamreza *et al*., 2013).

L'identificazione di queste specie si basa sull'aspetto morfologico, la specificità d'ospite, il tipo di trasmissione, la competenza del vettore e i dati epidemiologici rilevati nell'allevamento. Metodi sierologici sono frequentemente impiegati per determinare le infezioni subcliniche, tuttavia la diagnosi differenziale risulta difficoltosa; le indagini di tipo biomolecolare sono dunque preferibili in quanto permettono un'identificazione specie-specifica. Il seguente studio si è focalizzato sull'identificazione molecolare dei suddetti patogeni in ovi-caprini siciliani al fine di valutarne la prevalenza.

MATERIALI E METODI - L'analisi è stata condotta su 92 campioni (sangue intero e milze) di ovi-caprini presenti sul territorio siciliano, pervenuti durante il periodo estivo dell'anno 2013 presso i laboratori del C.R.A.Ba.R.T (Centro Referenza Nazionale per *Anaplasma*, *Babesia*, *Rickettsia* e *Theileria*) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. Il DNA totale è stato estratto dai campioni biologicimediante il kit PureLink Genomic DNA Minikit (Applied Biosystems) seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. Ciascun campione di DNA è stato utilizzato come stampo in un convenzionale saggio di PCR con primers specifici per *Anaplasma ovis* (de la Fuente *et al*., 2003), *Babesia ovis* (Aktas *et al*., 2005) e *Theileria ovis* (Altay *et al.,* 2005). Le reazioni di PCR sono state condotte usando la GoTaq Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), per ciascuna di esse è stato introdotto un controllo positivo, corrispondente al DNA del patogeno, e un controllo negativo in cui il DNA è stato sostituito con acqua. I prodotti di PCR, dopo migrazione elettroforetica in gel di 'agarosio (Sigma) all'1,5%, sono stati visualizzati mediante transilluminatore (BioRad).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La prevalenza biomolecolare totale di *Anaplasma ovis*è risultata del 27% (25/92) e dell'86% (79/92) per *Theileria ovis*; diversamente per *Babesia ovis* non è stata riscontrata alcuna positività (Tab. 1). Al gruppo degli animali saggiati appartenevano 14 caprini, in otto è stata riscontrata la positività ad *A. ovis* e in due la presenza di *T. ovis*. Questi dati confermano quelli ottenuti da un precedente studio (Torina e Caracappa, 2012) condotto nel territorio siciliano, che mostrava una prevalenza biomolecolare per *A. ovis,* valutata tramite analisi di PCR, del 47,3% per gli ovini e del 31,7% per i caprini. Lo stesso studio aveva individuato tramite la tecnica RLB (Reverse Line Blot) una prevalenza dell'1% per *B.ovis* e del 17,7% per *T. ovis*. In questo caso la differenza può essere giustificata dalle differenti tecniche utilizzate. Le malattie trasmesse da zecche, seppur spesso sottovalutate per il loro caratteristico andamento subclinico e la resistenza delle razze autoctone, sono endemiche nel sud Italia e la loro diffusione è legata a numerosi fattori: ambientali, orografici, genetici, ecologici e di gestione degli allevamenti. La Sicilia per le sue condizioni ambientali e climatiche risulta essere un territorio favorevole per la sopravvivenza dei vettori e, le scarse informazioni sullo stato sanitario degli animali selvatici, oltre che la mancanza di trattamenti profilattici contro gli ectoparassiti, favoriscono il mantenimento di animali serbatoio per questi microrganismi, incrementando il rischio di infezione.

La presenza della anaplasmosi e theileriosi evidenziata in questo studio può essere riconducibile alle tipologie di allevamento brado e semi-brado degli ovini e caprini adottato nella regione. Si evince, dunque, il ruolo dei piccoli ruminanti come reservoir di patogeni trasmessi da zecche, e quindi l'importanza dello studio delle relative patologie da un punto di vista scientifico ed epidemiologico e per la promozione della profilassi e del controllo di queste insidiose patologie che possono avere significativi effetti sulle produzioni.

Tabella 1 - Risultati della caratterizzazione biomolecolare di microrganismi causa di VBDs negli ovini e nei caprini siciliani.

	TOTALE Positivi/ Eseguiti (%)	OVINI Positivi/ Eseguiti (%)	CAPRINI Positivi/ Eseguiti (%)
A. ovis	25/92 (27%)	17/78 (22%)	8/14 (57%)
B. ovis	0/92 (0%)	0/78 (0%)	0/14 (0%)
T. ovis	79/92 (86%)	77/78 (99%)	2/14 (14%)

Molecular surveillance of *Anaplasma ovis*, *Babesia ovis* e *Theileria ovis* infection in sicilian sheeps and goats

Key words: *Anaplasma*, *Babesia*, *Theileria*, small ruminants.

Bibliografia

Altay K., Dumanli N., Holman J.P., Aktas M. (2005), Detection of Theileria ovis in naturally infected sheep by nested PCR. Veterinary Parassitology 127: 99-104.

Aktas M., Altay K., Dumanli N. (2005), development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of Babesia ovis infection in sheep and goats. Veterinary Parasitology 113: 277-281.

de la Fuente J., Van Den Bussche R.A., Prado T.M., Kocan K.M. (2003), Anaplasma marginale msp1α Genotypes Envolved under Positive Selection Pressure but Are not Maerkers for Geographic Isolates. Journal of Clinical Microbiology 41:1609-161.

Gholamreza R., Saeed Y. (2013), Molecular surveillance of Theileria ovis, Theileria lestoquardi and Theileria annulata infection in sheep and ixodid ticks in Iran. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 80: 1-5.

Torina A., Caracappa S. (2012), Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. Small Ruminant Research 106S: S6-S11.

Valutazione del piano di selezione per la resistenza alla Scrapie negli ovini da latte di razza Sarda

A. CARTA[1], F. INGRAVALLE[2], A. PERNISA[1], L. CRASTA[1], A. FRAGHÌ[1], C. LIGIOS[3], S. MURRU[4], G. RU[2], S. SALARIS[1]

[1] Unità di ricerca: Genetica e Biotecnologia, DIRPA-AGRIS Sardegna, Sassari, Italia
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italia
[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italia
[4] Associazione Nazionale della Pastorizia - ASSONAPA, Roma, Italia

Parole chiave: schemi di selezione, PrP, caratteri produttivi.

INTRODUZIONE - La Sarda è la più importante razza ovina italiana. Alla razza è applicato uno schema di selezione basato sulla gestione piramidale della popolazione (Carta et al., 2009). Al vertice della piramide si trovano gli allevamenti di elevato merito genetico (HGMF) nei quali si genera il progresso genetico che è successivamente trasferito alla base della piramide, la popolazione commerciale (CF) attraverso il passaggio di riproduttori. Il ritardo con cui CF raggiunge il livello genetico di HGMF dipende dalla dimensione relativa di HGMF e dall'entità del flusso di riproduttori verso CF. La monta naturale controllata è la principale tecnica di riproduzione. Ogni anno si realizza un programma di inseminazione artificiale con due principali obiettivi: creare i legami genetici tra gli allevamenti per una accurata valutazione genetica dei giovani arieti, anche in monta naturale, e realizzare accoppiamenti programmati fra i migliori individui. Il principale obiettivo di selezione nella razza è l'incremento della produzione individuale di latte mentre sono stati inseriti solo di recente come obiettivi, l'incremento della resistenza alla Scrapie e il miglioramento della morfologia mammaria. L'obiettivo di questo studio è presentare i risultati e le prospettive del piano di selezione per la Scrapie con particolare riferimento alle strategie impiegate per ridurre l'effetto dell'introduzione di un ulteriore obiettivo di selezione sul miglioramento della produzione di latte.

MATERIALI E METODI - Il Piano Regionale di Selezione in Sardegna è stato avviato nel 2005 con l'obiettivo di ridurre il rischio Scrapie attraverso l'incremento della frequenza dell'allele ARR. ASSONAPA e le AASSLL con il supporto tecnico e scientifico di AGRIS e IZS hanno collaborato per la realizzazione del Piano che è stato concepito in due fasi. Nella prima la selezione ha interessato solo HGMF al fine di sfruttare il pre-esistente schema di selezione impiegato per i caratteri produttivi. Il principale obiettivo in questa fase è stato di incrementare la disponibilità di arieti resistenti preservando la loro attitudine genetica alla produzione. Per questo è stato stabilito di genotipizzare tutti gli arieti e tutte le pecore con elevato valore genetico per i caratteri produttivi. Sono stati realizzati prelievi di bulbo pilifero da parte delle associazioni allevatori. Al fine di preservare i caratteri produttivi, all'avvio del piano è stato consentito l'impiego come riproduttori anche agli arieti sensibili ma con un elevato valore genetico per i caratteri produttivi. Tali arieti sono stati preferibilmente accoppiati con pecore d'èlite omozigoti resistenti (RR). Contemporaneamente non è stata data alcuna indicazione differente nell'impiego di arieti con uno o due alleli ARR, la cui selezione è avvenuta solo per il loro valore produttivo. Con lo scopo di incrementare la disponibilità di arieti RR è stato consentito l'impiego come "padri di ariete" anche di giovani arieti RR senza prova di progenie ma con elevato indice pedigree. La disponibilità di informazioni dettagliate a livello individuale in HGMF ha consentito di verificare la presenza di associazioni tra il gene PrP e i caratteri produttivi (Salaris et al., 2007). Nel 2009 è stata avviata la seconda fase del piano per favorire il flusso di arieti resistenti e con buona attitudine alla produzione da HGMF a CF. È stata quindi stimata la quantità di arieti RR che HGMF era in grado di produrre utilizzando le frequenze alleliche dei riproduttori nella stagione 2009 per stabilire il termine per l'esclusione degli arieti suscettibili in CF.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I campioni raccolti in totale e le analisi eseguite nel Piano sono stati rispettivamente 39.349 e 39.128 nei maschi e 256.042 e 39.111 nelle femmine. La strategia di campionamento ha previsto la raccolta annuale di campioni biologici di tutta la rimonta femminile all'età di un anno, quando le pecore sono allevate in unico gruppo. La genotipizzazione è avvenuta in un secondo momento, quando al termine della prima lattazione, le pecore sono state impiegate come "madri di ariete" evitando ulteriori visite per la raccolta di campioni negli allevamenti. La frequenza di ARR in HGMF è passata dal 46% negli arieti nati nel 2005 al 74% nel 2013. Nel 2013, la proporzione di animali con almeno un allele ARR è stata del 94%. La frequenza genotipica degli arieti RR impiegati per la riproduzione in HGMF è salita dal 26% nel 2005 al 70% nel 2011. Gli arieti sensibili non sono più utilizzati in HGMF nel 2010 per effetto delle regole del Piano. Annualmente vengono avviati alla monta circa 40.000 arieti con una carriera riproduttiva in media di 3 stagioni. Occorrono dunque circa 13.200 nuovi arieti all'anno. Si è stimato che la percentuale di giovani arieti RR producibili in HGMF nel 2009 era del 37%. Con una dimensione di HGMF di 240.000 pecore, era dunque possibile selezionare il migliore 30% per soddisfare le esigenze di arieti RR di CF. Il termine per l'esclusione degli arieti suscettibili è stato stabilito alla fine del 2011. Questa strategia ha comportato che l'incidenza di arieti resistenti in CF è rimasta stabile fino al 2008 mentre ha mostrato un trend crescente dal 2009 al 2012 (dal 69% al 79%). Per quanto riguarda l'effetto dell'introduzione nello schema di selezione della resistenza alla Scrapie sui caratteri produttivi, nel trend genetico per la produzione di latte non si è registrato alcun calo a partire dal 2005. Negli ultimi 7 anni l'incremento genetico medio annuo è stato di circa 2 litri. In conclusione il piano concepito in due fasi ha ottenuto buoni risultati in HGMF e ha consentito il trasferimento di tali risultati in CF. Tuttavia occorre ancora monitorare il flusso di riproduttori fra le due popolazioni in maniera da stabilire eventuali cambiamenti nelle strategie di genotipizzazione degli animali.

Ringraziamenti - Lavoro finanziato dal Ministero della Salute, progetto "*Studio epidemiologico dell'impatto dell'attività di selezione genetica sulla frequenza della Scrapie ovina in Italia*". L'attività di genotipizzazione e campionamento nello schema di selezione è stata finanziata dal MIPAF.

Appraisal of the breeding plan for scrapie resistance in the sarda dairy sheep breed

Key words: breeding plan, PrP, production traits.

Bibliografia

Carta A., Casu S., and Salaris S. (2009), Invited review: Current state of genetic improvement in dairy sheep. J. Dairy Sci. 92:5814-5833.

Salaris, S., Casu S., and Carta A. (2007), Investigating the relationship between the prion protein locus and udder morphology traits and milk yield in Sardinian sheep. J. Anim. Sci. 2007. 85: 2840-2845.

Indagine sulla presenza di *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA) nel latte di massa di allevamenti ovi-caprini della Puglia e della Basilicata: dati preliminari

M. CARUSO[1], L. LATORRE[1], G. SANTAGADA[1], R. FRACCALVIERI[1], A. MICCOLUPO[2], R. SOTTILI[2], A. PARISI[2]

[1] IZS Puglia e Basilicata, Matera - [2] IZS Puglia e Basilicata, Putignano (BA)

Parole chiave: MRSA, latte ovino e caprino.

INTRODUZIONE - *S. aureus* è un importante agente mastidogeno che nei piccoli ruminanti può causare mastiti contagiose da molto gravi a subcliniche. La mastite da *S. aureus* influisce negativamente sulla produzione di latte, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, e può rappresentare un serio problema di sanità pubblica nel caso di consumo di latte non pasteurizzato o di prodotti lattiero caseari preparati con latte crudo. Negli ultimi 10 anni è emersa la diffusione, sia negli animali da compagnia che negli animali da reddito, di ceppi MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) multiresistenti agli antibiotici, responsabili nell'uomo principalmente di infezioni nosocomiali. Negli allevamenti suini e più recentemente in quelli bovini sono stati isolati ceppi MRSA appartenenti al *Sequence Type* 398, in grado di causare infezione nell'uomo e per questo considerati agenti zoonosici emergenti per alcune categorie professionali quali allevatori, personale dei macelli e veterinari. L'isolamento di MRSA nel latte bovino è stato ampiamente segnalato in numerose nazioni europee inclusa l'Italia. Nelle regioni Puglia e Basilicata, studi effettuati su latte di massa bovino hanno dimostrato la presenza di MRSA con una prevalenza rispettivamente del 2 e del 6%. In considerazione dei risultati ottenuti nei bovini e della scarsità di dati sulla contaminazione da MRSA nel latte ovi-caprino in Italia, si è deciso di estendere l'indagine anche al latte dei piccoli ruminanti, che rappresentano una realtà zootecnica significativa nelle suddette regioni. Il presente lavoro descrive l'isolamento e la caratterizzazione molecolare di MRSA nel latte di massa di allevamenti ovi-caprini della Puglia e della Basilicata.

MATERIALI E METODI - **Campionamento** - Sono stati analizzati 110 campioni di latte di massa ovi-caprino provenienti da 30 allevamenti della regione Puglia (campioni di latte: 22 ovino, 4 caprino, 4 misto ovi-caprino) e da 80 allevamenti della regione Basilicata (campioni di latte: 45 ovino, 29 caprino, 6 misto ovi-caprino). **Ricerca e identificazione di MRSA** - Ciascun campione di latte è stato arricchito in Mueller-Hinton (MH) Broth contenente NaCl al 6,5% (W/v) (1 ml di latte + 9 ml di brodo salato) per 24 h a 37°C; in seguito 20 µl di brodo coltura sono stati seminati su MRSASelect™ BIORAD (terreno selettivo cromogeno per l'isolamento e l'identificazione di MRSA). Dopo 24-48-72h di incubazione a 37°C, le colonie sospette MRSA (rosa) sono state sub-coltivate su Agar Sangue per la purificazione e sottoposte a prove di conferma per la meticillino resistenza mediante analisi microbiologiche e molecolari. **Conferma microbiologica: a)** Test di sensibilità con dischetti di oxacillina (1 µg) e cefoxitina (30 µg) secondo Kirby-Bauer (le dimensioni degli aloni di inibizione sono state interpretate secondo i seguenti breakpoints: oxacillina, resistente ≤10 mm, intermedio 11-12 mm, sensibile ≥13 mm; cefoxitina, resistente ≤21 mm, sensibile ≥22 mm); **b)** Agar screening test per oxacillina (la crescita anche di una sola colonia su Oxacillin - Salt Screen Agar Biolife indicava resistenza del ceppo all'oxacillina); **c)** ETEST per oxacillina (la minima concentrazione inibente veniva interpretata secondo i seguenti breakpoints: resistente ≥ 4 µg/ml, sensibile ≤ 2 µg/ml). **Conferma molecolare:** il DNA genomico di ciascuna colonia sospetta è stato estratto con kit GenomicPrep®, GE Healthcare e sottoposto a PCR Real-Time utilizzando primers per il gene mecA riportati in letteratura. **Genotipizzazione degli isolati MRSA** - I ceppi MRSA sono stati caratterizzati per spa-typing e MLST (Multilocus Sequence Typing) secondo quanto riportato in letteratura.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Dai 30 campioni di latte prelevati nella regione Puglia non sono stati isolati MRSA. Degli 80 campioni prelevati in Basilicata è risultato positivo per MRSA solo un campione di latte caprino della provincia di Potenza (Tab.1). La meticillino-resistenza del ceppo isolato è stata confermata dalle analisi microbiologiche e le indagini molecolari hanno rilevato la presenza del gene *mec*A nel DNA. La genotipizzazione con *spa*-typing e MLST ha evidenziato che il ceppo appartiene allo *spa*-type t1255 incluso nel ST398. In accordo con quanto già descritto da altri autori in studi analoghi è emersa, anche in queste due regioni, una bassissima prevalenza di MRSA nel latte ovi-caprino (Puglia 0%; Basilicata 1,25%), inferiore a quella riscontrata nel latte bovino (Puglia 2%; Basilicata 6%). Il ceppo MRSA da latte caprino è stato identificato come ST398, genotipo prevalente nella specie suina, ma circolante anche negli equini, nei bovini e negli ovi-caprini ed in grado di causare infezione anche nell'uomo. In considerazione di ciò, nell'allevamento lucano in cui è stato isolato il ceppo saranno effettuate indagini per la ricerca di MRSA mediante prelievo di tamponi nasali sul personale a contatto con gli animali. La presenza sia pure sporadica di MRSA nel latte ovi-caprino conferma l'importanza di migliorare l'igiene di mungitura e di adottare misure di contenimento delle mastiti da *S. aureus*, soprattutto in considerazione delle possibili ripercussioni sulla salute pubblica conseguenti al diffuso consumo di prodotti lattiero-caseari ottenuti da latte ovi-caprino crudo.

Tabella 1 - MRSA in latte ovi-caprino della Puglia e della Basilicata.

	PUGLIA		BASILICATA	
	n	MRSA +	n	MRSA +
Latte ovino	22	0	45	0
Latte caprino	4	0	29	1
Latte ovino+caprino	4	0	6	0
Totale	30	0	80	1 (1,25%)

Ringraziamenti - Si ringraziano per la preziosa collaborazione i medici veterinari dott.ri Ferrulli D., Natile Martino V., Picerno M., Soldo E., Trotta Bruno V.; i medici veterinari dell'ARA di Basilicata; il tecnico di laboratorio Sig.ra Filazzola L.A.

Meticillin resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) isolated from ovine and caprine bulk milk in Apulia and Basilicata

Key words: MRSA, ovine and caprine milk.

Bibliografia

Autori vari. (2009), Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in animals and foods. The EFSA Journal 993: 1-73.

Benedetti V., Cremonesi P., Ferrari S., Castiglioni B., Fabbi M., Vicari N., Garbarino C., Battisti A., Franco A., Feltrin F., Luini M. (2010), Staphylococcus aureus meticillino-resistenti (MRSA) da campioni di latte bovino. Large Animal Review 16: 67-70.

Cortimiglia C., Franco A., Battisti A., Colombo L., Stradiotto K., Vezzoli F., Luini M. (2013), Indagine sulla presenza di Staphylococcus aureus e di MRSA nel latte di massa di allevamenti caprini della Lombardia. Atti XV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.: 201-203.

Dati personali. RC2011: IZSPB 002/11 Isolamento e caratterizzazione molecolare di Staphylococcus aureus e MRSA in latte bovino in Puglia e Basilicata.

Foti M., Fisichella V., Conte F., Passantino A., Giacopello C. (2012), Indagine sulla presenza di Staphylococcus aureus meticillino resistenti (MRSA) in animali da reddito e in personale addetto agli allevamento in Sicilia. Large Animal Review 18: 177-182.

Eriksson J., Espinosa-Gangora C., Stampoj I., Larsen A.R., Guardabassi L. (2013), Carriage frequency, diversity and methicillin resistance of Staphylococcus aureus in Danish small ruminants. Vet. Microbiol. 163: 110-115.

Programma di avvio di un piano di conservazione della popolazione ovina Altamurana: II. Alleli alfa e beta globinici quali marcatori di variabilità genetica

A. CASSONE[1], P. LOIZZO[1], E. CIANI[2], E. PIERAGOSTINI[1]

[1] DETO-Sez. Cliniche veterinarie e Produzioni Animali - Università degli studi di Bari "Aldo Moro
[2] Bioscienze, Biotecnologie e Farmaceutiche - Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

Parole chiave: salvaguardia delle razze autoctone, gestione genetica, marcatori proteici.

INTRODUZIONE - Uno delle azioni principali del "Programma di avvio di un piano di conservazione della popolazione ovina Altamurana (INCIPIT)" realizzato dall'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" e finanziato dall'Ente Parco Nazionale dell'Alta Murgia era la gestione genetica del nucleo residuo, che è ripartito in otto realtà aziendali e per il quale andrebbe perseguito l'obiettivo di programmare accoppiamenti tra individui non parenti. Non avendo, però, alcuna certezza anagrafica dei vari soggetti, per i quali da tempo non vengono effettuati gruppi di monta e registrazione delle nascite, una valutazione di massima del rapporto di parentela tra gli individui può essere effettuata sia con l'analisi storica degli otto greggi che attualmente costituiscono il nucleo residuo, sia avvalendosi dell'elevato polimorfismo del sistema emoglobinico che caratterizza la razza Altamurana. Questo lavoro riporta i risultati della caratterizzazione del polimorfismo proteico di tutti i soggetti relativamente ai loci alfa e beta globinici.

MATERIALI E METODI - Animali. Dopo un secolare periodo di fulgore, la razza Altamurana ha seguito il destino di gran parte delle razze autoctone che hanno ceduto il passo alle razze specializzate a seguito di perdita di competitività; così, dagli oltre 100.000 capi allevati in purezza in Puglia fino a metà degli anni '70, nel giro di un ventennio si è arrivati al rischio di estinzione. Per tutti gli anni '80 e '90, caposaldi del mantenimento dell'ultimo nucleo erano: a) un anziano allevatore di Cerignola-FG, il sig. D'Errico; b) l'amministrazione provinciale di Bari che aveva in affitto l'azienda silvo-pastorale Cavone, di proprietà della Regione Puglia, e presso la quale manteneva diverse razze ovine tra cui un nucleo di Altamurane in purezza. Sul finire degli anni '90, un nuovo attore si affaccia nella scena, il signor Nicola Viti il quale si attiva per istituire un gregge di ovini di razza Altamurana nella storica masseria Viti-De Angelis, in agro di Altamura. All'uopo vengono acquistati agnelli dall'Azienda Cavone e da D'Errico. Purtroppo nella prima decade del terzo millennio, travagliato è il destino sia del gregge "D'Errico", che a seguito del decesso del proprietario viene dato in carico all'Istituto Sperimentale per la Zootecnia di Segezia, sia del gregge dell'azienda Cavone il quale, per una serie di vicissitudini politico-amministrative, viene sparpagliato ed infine fortunatamente ripartito presso due allevatori custodi (aziende D ed H, Tabella 1). Anche il gregge dell'azienda Viti (Azienda C, Tabella 1) viene successivamente suddiviso e circa la metà dei capi viene acquistata da un altro allevatore (Azienda E, Tabella 1). Accanto alle summenzionate aziende C, D, E ed H, si aggiungono altre piccole realtà di allevatori convertiti di recente ad un ritorno alle antiche tradizioni per il fiorire delle masserie didattiche e di un nuovo interesse per la lana e la rusticità della razza, cui però certo non è alieno il sostegno previsto dalla Regione Puglia agli allevatori pugliesi che hanno fatto la scelta delle razze autoctone (misura 214/7 "Tutela della biodiversità" del PSR Puglia 2007-2013). Caratterizzazione del polimorfismo alfa e beta globinico. I soggetti sono fenotipizzati, analizzando i singoli emolisati mediante focalizzazione isoelettrica (PAGIF) e cromatografia in fase liquida ad alta prestazione (HPLC) (Pieragostini et al., 2010). Le frequenze alleliche e genotipiche sono state calcolate mediante il metodo per conta diretta.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'analisi delle frequenze alleliche al locus beta nonché quelle relative agli aplotipi al sistema alfa ha confermato la presenza di tutti i varianti segnalati negli studi fatti in anni passati (Pieragostini et al., 2003), segno che durante le vicissitudini della popolazione e della sua frammentazione non si sono avuti fenomeni di deriva tali da portare alla perdita di alleli rari; variabilità confermata anche dal fatto che detti varianti sono abbastanza ben distribuiti nell'ambito delle diverse aziende. A titolo esemplificativo la Tabella 2 riporta la distribuzione dei fenogruppi relativi al locus beta nelle diverse aziende. Il dato più confortante è proprio quello relativo alla distribuzione degli alleli rari in base ai quali effettuare accoppiamenti assistiti. Ciò potrebbe comportare un aumento della frequenza di detti alleli, ma questo evento se controllato, non dovrebbe portare alcun nocumento, dal momento che precedenti lavori hanno evidenziato che nessuno dei varianti globinici considerati è correlato ad effetti patologici ed i valori ematologici registrati per i diversi fenogruppi, rientrano nell'intervallo di normalità della specie; anzi, a questo riguardo va sottolineata l'associazione degli alleli rari alfa e beta con valori di ematocrito *minus* varianti, caratteristica di valore adattativo positivo in ambienti aridi e con presenza di parassiti emotropici come quelli nei quali questa razza si è evoluta (Pieragostini et al., 2010).

A conservation effort for the Altamurana local sheep breed: II. Alpha and beta globin variants as indicator of variability

Key words: sheep, native breeds, hemoglobin polymorphism.

Bibliografia

Pieragostini, E., Petazzi, F., Di Luccia, A. (2003), The relationship between the presence of extra alpha-globin genes and blood cell traits in Altamurana sheep. Genetics Selection Evolution 35: S121-133.

Pieragostini, E., Alloggio I., Petazzi F. (2010) Insights into hemoglobin polymorphism and related functional effects on hematological pattern in Mediterranean cattle, goat and sheep. Review. Diversity 2(4): 679-700.

Tabella 1 - Codice, origine e numerosità degli otto greggi di razza Altamurana in purezza che aderiscono al progetto.

Codice	Origine del gregge	n° capi
A	Azienda Cavone	30
B	D'Errico	31
C	Viti (Cavone - D'Errico)	80
D	Azienda Cavone	54
E	Viti	109
F	D'Errico	13
G	Azienda Cavone/D'Errico	47
H	Azienda Cavone	145

Tabella 2 - Distribuzione dei fenogruppi corrispondenti ai genotipi al locus beta osservati nelle singole aziende progetto.

Fenogruppi	Aziende								
	A	B	C	D	E	F	G	H	TOT
AA	0	0	1	0	0	2	0	1	4
AB	2	6	14	6	22	3	7	20	80
AI	0	0	0	1	0	1	0	4	6
BI	18	2	22	21	23	4	2	63	155
BB	6	22	35	23	57	3	37	40	223
II	4	0	8	3	4	0	1	17	37
TOT	30	30	80	54	106	13	47	145	505

Gli elminti in capre di razza Nicastrese nella Provincia di Catanzaro

F. CASTAGNA[1], S. RUSSO[1], F. DE NARDO[2], V.M. MORITTU[1], V. MUSELLA[1], D. BRITTI[1]

[1] Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro, Centro Interdipartimentale Servizi Veterinari
[2] RARE - Associazione Italiana Razze Autoctone a Rischio di Estinzione

Parole chiave: elminti, capre, Nicastrese, Calabria.

INTRODUZIONE - Il settore caprino è un'importante realtà per la Regione Calabria, che è al secondo posto in Italia come consistenza per questa specie (147.779 capi, *dati BDN Anagrafe Zootecnica, 2013). In particolare, hanno rilievo regionale le razze di Tipo Genetico Autoctono (T.G.A.), quali la Nicastrese, la Capra dell'Aspromonte e la Rustica di Calabria. La capra Nicastrese, presente ed allevata in tutta la Provincia di Catanzaro (4.159 capi) è molto apprezzata dagli allevatori per le sue caratteristiche produttive (latte: primipare 180 lt in 150 gg; secondipare 220 lt in 210 gg; pluripare 260 lt 210 gg). Nel tempo si è diffusa anche nelle Provincie limitrofe, raggiungendo in tutta la Regione una consistenza di razza di circa 5000 capi. Il latte è utilizzato nella maggior parte dei casi per prodotti caseari tradizionali come il caprino Nicastrese, la giuncata Nicastrese, i formaggi misti come la cacioricotta, il canestrato, il pecorino con il pepe, la caciotta e le varie ricotte fresche, infornate, salate e affumicate. La trasformazione del latte garantisce importanti introiti economici per una filiera locale basata sulla pastorizia a conduzione familiare. Poiché le conoscenze sulla diffusione degli elminti nella capra Nicastrese sono molto limitate se non del tutto assenti, obiettivo di questo lavoro è stato quello di acquisire dati recenti sulla prevalenza di questo gruppo di parassiti in questa razza nella Provincia di Catanzaro.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto nel periodo febbraio-maggio 2014, su un gruppo di 200 capre di razza Nicastrese, omogeneo per età, stato fisiologico e stagione di pascolo e non sottoposto a profilassi antiparassitaria da almeno sei mesi. I capi oggetto di studio provengono da 4 allevamenti di tipo estensivo, a conduzione familiare diretta, ubicati nella Provincia di Catanzaro. In ciascuna azienda sono state sottoposte ad indagine parassitologica 50 capre. Per gli esami copromicroscopici è stata utilizzata la FLOTAC *dual technique* con sensibilità pari a 2 uova per grammo feci (upg), utilizzando due soluzioni flottanti, una a base di sodio cloruro (peso specifico = 1,200) per la ricerca e la conta delle uova dei nematodi (strongili gastrointestinali, *Nematodirus* spp.) e dei cestodi (*Moniezia* spp.) ed una a base di zinco solfato (peso specifico = 1,350) per la ricerca delle uova dei trematodi (*Fasciola hepatica*, *Calicophoron daubneyi*e, *Dicrocoelium dendriticum*) e dei nematodi del genere *Trichuris* spp.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I risultati dell'indagine sono riassunti nella seguente tabella (Tab. 1) dove riportiamo, per ciascuna specie e/o gruppo di elminti, il numero di capi positivi, le rispettive prevalenze (Fig. 1) con intervallo di confidenza e la media dell'intensità parassitaria media espressa in upg. Gli strongili gastrointestinali, presenti nel 100% degli animali controllati, sono risultati gli elminti più diffusi, seguiti dal genere *Trichuris* (41,4%) e *Nematodirus* (26,2%). I cestodi del genere *Moniezia* sono state rilevati in oltre il 30% degli animali. Degli elminti a localizzazione epatica, *D. dendriticum* è risultato il più diffuso, presente in oltre il 47% delle capre, mentre *F. hepatica* non è stato riscontrato. Da segnalare la significativa diffusione dei paramfistomi (*C. daubneyi),* elminti a localizzazione ruminale troppo spesso sottovalutati, riscontrati nel 65,6% degli animali. I nostri risultati evidenziano una notevole diffusione degli elminti nelle capre di razza Nicastrese. Considerando che la sanità degli allevamenti rappresenta il presupposto di base per il raggiungimento di buone *performances* produttive e riproduttive, l'impatto economico di questo quadro parassitario, anche se non quantificato in questo studio, è certamente notevole. Poter disporre di conoscenze locali circa la presenza e la diffusione delle infezioni parassitarie, è il requisito di base per programmare ed attuare protocolli di profilassi adeguati e terapie mirate per meglio salvaguardare questa razza autoctona tradizionalmente allevata allo stato brado, minacciata di erosione genetica.

Tabella 1 - Elminti, relative prevalenze ed intensità media (upg).

Elminti e/o gruppi di elminti	(N° animali esaminati = 200)		
	N° positivi	Prevalenza % (IC 95%)	upg
SGI	200	100 (97,6-100)	558,17
Nematodirus spp.	52	26,2 (20,2-32,7)	9,89
Trichuris spp.	82	41,4 (34,2-48,2)	46,42
SBP	139	70,2 (62,5-75,7)	-
C. daubneyi	130	65,6 (57,9-71,5)	237,47
D. dendriticum	94	47,4 (39,9-54,2)	19,09
F. hepatica	0	0	0
Cestodi (Moniezia spp.)	60	30,3 (23,8-36,9)	-

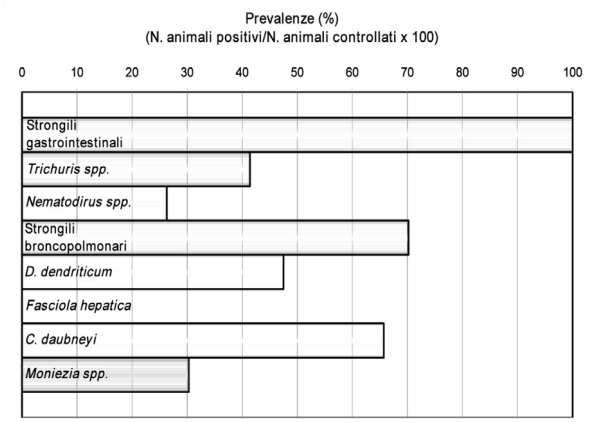


Figura 1 - Prevalenze parassitarie.

Helminths in goats of nicastrese breed in the Catanzaro province

Key words: helminths, goats, Nicastrese, Calabria.

Bibliografia

Asso.Na.Pa - Banca Dati. Consistenze della razza Nicastrese (Q2) in provincia di Catanzaro Anno 2013.

Bigi Daniele e Zanon Alessio, "Atlante delle razze autoctone". Edagricole - Edizioni Agricole Il Sole 24 ORE Business Media S.r.l. - Milano, 2008. ISBN: 978-88-506-5259-4.

Cringoli G. (2006). Parassitologia, 48(3):381-4.

Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J. (2010). NatProtoc., 5(3):503-15.

De Nardo F., 2011 Razze zootecniche in pericolo di estinzione: capra Nicastrese: Vita in campagna n. 12 pag 53 ISSN 1120-3005.

De Nardo F. (2006). Allevamento ovi-caprino in Calabria. La Settimana Veterinaria, Le Point Vétérinaire Italie - Edizioni veterinarie e agrozootecniche Milano, 537:II - IV.

* Dati forniti dalla BDN dell'Anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto "G. Caporale" di Teramo.

Cofinanziato POR FE SR 2007-2013 Linea intervento 8.2.1.6

Identificazione di regioni del genoma ovino che modulano la variabilità della composizione acidica del grasso del latte nella razza Sarda

S. CASU, M.G. USAI, S. MIARI, T. SECHI, S. SECHI, A. CARTA

Settore Genetica e Biotecnologie, AGRIS Sardegna, Italy

Parole chiave: SNP, QTL, IBD, LDLA, acidi grassi.

INTRODUZIONE - Il profilo acidico del grasso del latte influenza le proprietà tecnologiche ed il valore nutrizionale dei prodotti caseari. Numerosi studi hanno evidenziato relazioni sfavorevoli tra alcuni acidi grassi saturi (laurico, miristico, palmitico) e malattie cardiovascolari, diabete e obesità, mentre sono noti i positivi effetti di CLA e ω 3 sulla salute umana.

Il formaggio ovino, apprezzato per la sua sapidità, è talvolta sgradito al consumatore per il suo elevato contenuto in grassi. Sarebbe pertanto opportuno modificare la composizione del grasso del latte ovino per migliorare il valore dietetico e nutrizionale del formaggio senza alterarne il gusto e l'aroma. Ricerche recenti hanno dimostrato come la variabilità del profilo acido del grasso dei ruminanti sia in parte determinata geneticamente (Soyeurt et al., 2007; Carta et al., 2008; Maroteau et al., 2014) e possa quindi essere modificata attraverso la selezione. Il presente lavoro si propone di identificare le regioni del genoma che modulano la variabilità del contenuto in acidi grassi del latte di ovini di razza Sarda.

MATERIALI E METODI - I dati sono stati raccolti tra il 2001 e il 2010 su una popolazione costituita da 963 pecore backcross (G0) SardaXLacaune e da 3 generazioni di discendenti (G1-G3), ottenute dall'accoppiamento con 33 arieti del Centro Arieti della razza Sarda. La popolazione è stata genotipizzata con l'OvineSNP50 Beadchip (Illumina Inc). I prelievi per la determinazione del profilo acidico del grasso sono stati realizzati in primavera durante la 2° e 3° lattazione per 727 G0 e nel corso di una lattazione adulta, per 1498 G1-G3. I tenori dei principali acidi grassi (AG) sul grasso totale, determinati per gascromatografia, e i valori di alcune loro combinazioni sono stati corretti per i principali fattori di variazione. I fenotipi corretti sono stati analizzati con un approccio che combina le informazioni di linkage entro famiglia e quelle di linkage disequilibrium a livello di popolazione. Inoltre, l'analisi delle componenti principali è stata utilizzata per sintetizzare la probabilità di identità per discendenza (IBD) tra gli aplotipi fondatori (Usai et al., 2014). Per ogni posizione analizzata, è stata applicata una regressione multipla sulle componenti principali estratte dalla matrice di IBD tra i 76 aplotipi sardi derivati dagli arieti utilizzati.

Le soglie di significatività a livello del cromosoma (CW) e del genoma (GW) sono state calcolate applicando la correzione di Bonferroni al Pvalue nominale del test F per ogni posizione. Gli SNP risultati significativi entro l'intervallo di 1 Mb sono stati considerati un unico QTL. Quando in zone adiacenti di 1 MB (sino a 6 Mb in totale) erano presenti QTL per lo stesso carattere e le correlazioni tra effetti degli aplotipi erano superiori a 0,50 abbiamo riportato in tabella la posizione del picco più significativo. Analogamente quando i QTL influenzavano AG diversi.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Nel complesso, su 29 caratteri, sono stati identificati 143 SNP significativi alla soglia 1%CW, dei quali 36 alla soglia 1%GW. Tutti i cromosomi, ad eccezione del 4, 21, 23 portavano almeno un'associazione significativa. Nessun QTL è stato identificato per C17, CLA, c18:3. Anche per le somme di AG a catena media, lunga, insaturi (ufa), polinsaturi (pufa) non sono stai identificati QTL. Ciò può essere attribuito al fatto che tali somme sono costituite da precursori e prodotti della stessa reazione enzimatica per cui all'incremento di un addendo corrisponde una proporzionale riduzione del precursore.

Tra le 40 posizioni significative identificate sono di particolare interesse quelle in OAR11 che influenza C14 e C16; OAR17 che influenza C4 e C6, e OAR 22 che influenza i rapporti tra acidi grassi insaturi e i loro precursori (CLAVC, R14, R16, R18) nelle quali si trovano 3 forti geni canditati (FASN, AACS e SCD rispettivamente).

Tabella 1 - Posizioni* significativamente associate con i tenori in AG del grasso del latte.

Ch	Loc. Mb	Carattere	Ch	Loc. Mb	Carattere
1	11	Tot	12	42	C16
1	240	C8,C10,corta	12	66	C4
2	205	C15	13	10	C14:1
3	194	C16:1	14	10*	C4, C6, C12, corta
5	22	C18:2	14	62*	C6, C16
6	58*	C14:1, R_{14}, R_{16}	15	65	C4
6	88*	C8, C10	16	20*	C10, C12, C15, sfa
7	26*	C14:1, R_{14}, C16:1	16	32	R_{14}
7	29	R16	17	51*	C4, C6
7	87	C14	18	65	tot
8	1	C14:1, C18	19	3	C8
9	11	C4	19	13	C18, R18
10	25	C16:1, R_{16}	20	10	C14:1,R_{14} C16:1,R_{16}
10	41	C15	20	50	C10, C12, corta
10	68	Vc	22	20*	C14:1, C16:1 R_{14}, R_{16}, R_{18}, CLAVC
11	21	Sfa	22	48*	C18:1, mufa,tot
11	29*	C6, C8, C10, corta	24	29	C12
11	50*	C4, C8, C10, C14, C16, corta	24	39	R_{16}
11	57*	C18,R_{14}, R_{16}	25	43	C18:2
12	11	C14:1,R_{14}	26	1	C16

*più di un picco entro 6Mb. Vc = ac. vaccenico, CLAVC = CLA/vaccenico, R14 = 100*C14:1/C14, R16 = 100*C16:1/C16, R18 = 100*C18:1/C18, corta = c4+c6+c8+c10, Sfa = somma AG saturi, tot: somma AG.

Genomic regions affecting fatty acid content of milk fat in sarda sheep

Key words: SNP, QTL, IBD, LDLA, fatty acids.

Bibliografia

Carta, A., Casu S.,Usai M.G., Addis M., et al. (2008), Investigating the genetic component of fatty acid content in sheep milk. Small Rumin. Res. 79:22-28.

Maroteau C., Palhière I., Larroque H., et al. (2014). Genetic parameter estimation for major milk fatty acids in Alpine and Saanen primiparous goats. J. Dairy Sci. J. Dairy Sci. 97 3142-55

Soyeurt, H., Gillon A., Vanderick S., et al. (2007), Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk. J. Dairy Sci. 90:4435-4442.

Usai MG, Casu S., Sechi T. et al. (2014), Genome wide association study on milk production traits in a nucleus flock of Sarda breed sheep using a novel method combining linkage and linkage disequilibrium mapping, Accepted ORAL presentation at the 10th WCGALP. Vancouver, BC, Canada August 17-22, 2014.

Regolazione del sistema endocrino ed immunitario in pecore in lattazione soggette a stress termico supplementate con acidi grassi polinsaturi

M.G. CILIBERTI, G. ANNICCHIARICO[2], M. ALBENZIO, A. SANTILLO, R. MARINO, A. SEVI[1], M. CAROPRESE[1]

[1] Dipartimento SAFE, Università di Foggia - [2] CRA; Istituto Sperimentale per la Zootecnia, Segezia - Foggia

Parole chiave: citochine, pecore, PUFA, stress termico.

INTRODUZIONE - Lo stress termico determina l'attivazione dell'espressione di alcuni pathways delle risposte immunitarie orchestrate dalla secrezione delle citochine. La produzione delle citochine, infatti, attiva e promuove la risposta cellulare T helper (Th)1 (Interferone-IFN-γ e IL-12) e Th2 (IL-10, IL-13, IL-4). La risposta di tipo Th1 controlla le risposte di tipo cellulo-mediate, esprimendo un profilo infiammatorio, mentre la risposta Th2 attiva la risposta umorale, a favore di un profilo antiinfiammatorio. In condizioni di stress termico, le citochine della risposta Th1 vengono down regolate, causando uno spostamento della risposta immunitaria a favore della secrezione delle citochine della risposta Th2, sopprimendo in tal modo l'immunità cellulo-mediata (Webster et al., 2002). In pecore stressate termicamente dopo una supplementazione nella dieta a base di semi di lino, ricchi dell'n-3 PUFA acido α-linolenico (C18:3, ALA), è stato registrato un aumento delle risposte immunitarie umorali e del cortisolo (Caroprese et al. 2012). Al contrario, in agnelli sottoposti a stress termico, una supplementazione a base della macroalga bruna *Ascophyllum nodosum* (Tasco), ricca dell'acido eicosapentaenoico n-3 PUFA (C20:5, EPA) è stato osservato un miglioramento del sistema immunitario e dello stress ossidativo (Saker et al., 2004). L'obiettivo del presente lavoro è stato la valutazione dell'effetto della supplementazione della dieta con semi di lino, alga, e la loro combinazione sul sistema immunitario in termini di: (i) immunità cellulare e umorale, (ii) attivazione dell'asse ipotalamico pituitario (HPA) con produzione di cortisolo, nelle pecore in lattazione, in condizioni di stress termico.

MATERIALI E METODI - La prova ha avuto una durata di 30 giorni: 32 pecore di razza Comisana, allevate presso il CRA di Segezia (Foggia), sono state divise in quattro gruppi sperimentali, supplementati rispettivamente con *A. nodosum* (AG), con semi di lino (FS), e con una combinazione di semi di lino e *A. nodosum* (FS+AG); il gruppo controllo (C) non ha ricevuto alcuna supplementazione. La risposta cellulo-mediata delle pecore è stata valutata attraverso skin-test condotto su tutti gli animali a 0, 15, e 30 giorni dell'esperimento, dopo iniezione sottocutanea di fitoemoagglutinina (1 mg in 1mL di soluzione salina sterile) su ciascuna spalla di ogni animale e relativa misura dell'ispessimento cutaneo medio, dopo 24h. Per determinare la risposta umorale delle pecore, gli animali sono stati sottoposti ad iniezione intradermica di un antigene, OVA (6mg per soggetto in 1mL di soluzione salina sterile e 1mL di adiuvante di Freund), all'inizio della prova e con un richiamo successivo senza adiuvante al giorno 7 della prova. Per la determinazione del cortisolo nel siero delle pecore, è stata effettuata un'iniezione di intradermica di ACTH al giorno 22 della prova, e i campioni di siero sono stati ottenuti immediatamente e dopo 60, 120, 240 minuti dall'iniezione. Campioni di sangue sono stati prelevati a 0, 15, e 30 giorni della prova e i sieri di ciascuna pecora sono stati analizzati mediante test ELISA per determinare la concentrazione di IgG anti-OVA, IL10 e IL-13 e cortisolo. Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica GLM con il pacchetto statistico SAS (1999).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - In condizione di stress termico, le pecore supplementate con semi di lino hanno presentato una maggiore secrezione di cortisolo, come già riscontrato in Caroprese et al. (2012), rispetto al gruppo FS+AG, in cui la presenza simultanea di semi di lino e alga potrebbe aver causato una ridotta attivazione del sistema endocrino (Fig. 1). L'immunità cellulo-mediata è rimasta inviariata nel gruppo FS mentre negli altri gruppi sperimentali si è ridotta nel tempo ($P<0,001$). La produzione di IL-10 è aumentata in tutti i gruppi sperimentali al giorno 15 della prova. I glucocorticoidi hanno un'azione diretta nella up-regolazione della produzione dell'IL-10, dimostrando un possibile legame nei valori di cortisolo e di IL-10 che sono stati registrati nei gruppi sperimentali; inoltre nel gruppo FS i risultati dello skin test, hanno permesso di ipotizzare un ruolo dei semi di lino nel promuovere la risposta Th1 rispetto alla Th2 che normalmente prevale in condizione di stress termico (Caroprese et al., 2009). Il livello delle IgG anti-OVA ematiche è aumentato in tutti i gruppi sperimentali ($P<0,001$), mentre al giorno 15 il gruppo FS+AG ha registrato il valore più basso ($P<0,05$). La produzione dell'IL-13 è stata più bassa nel gruppo FS+AG rispetto agli altri gruppi sperimentali. L'IL-13 ha un ruolo diretto nella risposta Th2 e nello sviluppo dell'immunità umorale (Zurawski and de Vries, 1994), è stato, dunque, possibile trovare una correlazione tra i più bassi livelli di IL-13 presenti nel gruppo FS+AG e i ridotti livelli di IgG anti-OVA osservati nello stesso gruppo.

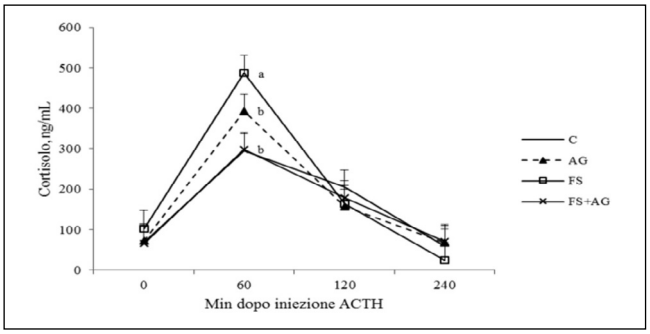


Figura 1 - Produzione di cortisolo nel plasma (Medie ± SEM) di pecore alimentate con la dieta controllo (C), e supplementate con *A. nodosum* (AG), semi di lino (FS), e una combinazione *A. nodosum* e semi di lino (FS+AG).

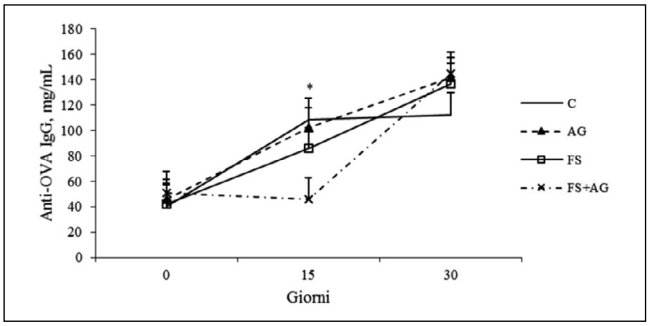


Figura 2 - Produzione di IgG anti-OVA (Medie ± SEM) in pecore alimentate con dieta controllo (C), e supplementate con *A. nodosum* (AG), semi di lino (FS), e una combinazione *A. nodosum* e semi di lino (FS+AG).

Pufa and ewe immune responses during heat stress

Key words: cytokine, sheep, PUFA, heat stress.

Bibliografia

Caroprese M., Marzano A., Entrican G., Wattegedera S., Albenzio M., Sevi A. (2009), Immune response of cows fed polyunsaturated fatty acids under high ambient temperatures. J. Dairy Sci. 92: 2794-2803.

Caroprese, M., Albenzio M., Bruno A., Annichiarico G., Marino R., Sevi A. (2012), Effects of shade and flaxseed supplementation on welfare of lactating ewes under high ambient temperatures. Small Rumin. Res. 102:177-185.

Saker, K. E., Fike J. H., Veit H., Ward D. L. (2004), Brown seaweed-(Tasco TM) treated conserved forage enhances antioxidant status and immune function in heat-stressed wether lambs. J. Anim. Physiol. 88: 258-271.

SAS Institute. (1999), SAS user's Guide: Statistics. Version 8.1 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Webster J. J., L. Tonelli, E.M. Sternberg. (2002), Neuroendocrine regulation of immunity. Annu. Rev. Immunol. 20:125-163.

Zurawski G., and J. E. de Vries. (1994), Interleukin-13, an interleukin-4 like cytokine that acts on monocytes and B-cells, but not on T cell. Immunol. Today.15: 19-26.

Performance di accrescimento e caratteristiche della carne in capretti alimentati con una dieta integrata con polifenoli

R. CIMMINO[1,2], C.M.A. BARONE[3], R. DI MATTEO[3], F. RUSSO[2], A. BALESTRIERI[1], E. VARRICCHIO[2], F. IANNACCONE[1], G. NEGLIA[1]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italia
[2] Dipartimento di Scienze e Tecnologie - Università degli Studi del Sannio, Benevento, Italia
[3] Dipartimento di Agraria - Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia

Parole chiave: capretti, polifenoli, caratteristiche carne.

INTRODUZIONE - I polifenoli sono una famiglia di sostanze largamente rappresentate nel mondo vegetale, caratterizzate dalla presenza di molteplici gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse di alto peso molecolare. Sono considerati degli antiossidanti naturali, agendo da "scavengers" dei radicali liberi, soprattutto perossilici, rompendone la catena di formazione e legandosi ad essi per neutralizzarli. Inoltre agiscono da "quenchers" nei confronti dei ROS e dei RNS e da chelanti di metalli (Rice-Evans et al., 1997). Presentano numerose funzioni biologiche, tra cui proprietà anti-infiammatorie, anti-aterogene, anti-virali e anti-carcinogeniche (Obied et al., 2005). Negli ultimi anni, le industrie alimentari si stanno indirizzando verso l'impiego di antiossidanti naturali nelle formulazioni alimentari, allo scopo di ritardare l'ossidazione lipidica e migliorare la qualità e il valore nutrizionale dei prodotti finiti (Fasseas et al., 2007). Per la carne è possibile migliorarne la qualità e la shelf-life attraverso l'impiego degli antiossidanti nella fase di pre-macellazione, incorporandoli nella dieta degli animali. Scopo del presente studio è stato di valutare l'effetto dei polifenoli nella fase di post-svezzamento in termini di incremento ponderale giornaliero (IPG), peso alla macellazione, caratteristiche istologiche del tratto gastroenterico e caratteristiche della carne.

MATERIALI E METODI - La prova è stata condotta su 9 capretti maschi di razza Saanen, ed ha avuto una durata di 90 gg. I capretti sono stati suddivisi in 3 gruppi omogenei per peso ed età al momento dello svezzamento (40 gg): Gruppo A (n=3), alimentato con una razione standard; Gruppo B (n=3), alimentato con la razione standard e integrazione di polifenoli in polvere; Gruppo C (n=3), alimentato con la razione standard e integrazione di polifenoli in capsule. I polifenoli sono stati ottenuti da un trattamento effettuato su acque di vegetazione provenienti da frantoio, con sistema di estrazione continuo a tre fasi. Gli animali sono stati pesati ogni 10 giorni e sono stati calcolati i diversi IPG (Tab. 1). Al momento della macellazione si è valutata la resa al macello e sono stati prelevati campioni di *longissimus dorsi* per l'analisi delle caratteristiche chimiche e reologiche della carne. I dati sono stati analizzati mediante il SAS.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Non sono emerse differenze in termini di peso alla macellazione e IPG tra i tre gruppi, sebbene valori più elevati siano stati osservati nei gruppi trattati con polifenoli (Tab. 1). La resa alla macellazione è stata mediamente del 48,6% senza differenze tra i gruppi. Anche le caratteristiche chimiche della carne sono risultate simili (Tab. 2), sebbene i soggetti dei gruppi B e C abbiano mostrato una maggior (P<0,05) quantità di ceneri e, tendenzialmente (P<0,10), di grassi rispetto ai soggetti del gruppo A.

Tabella 1 - Incrementi ponderali e peso alla macellazione medio nei 3 gruppi di capretti.

	Peso Nas. (kg)	Peso Svez. (kg)	Peso Macel. (kg)	IPG nas-svez (gr)	IPG svez-macel (gr)	IPG totale (gr)
A	2,23	6,73	10,83	70	40	90
B	2,27	6,67	15,57	70	90	140
C	2,27	6,83	14,60	70	80	130

Tabella 2 - Analisi chimica dei campioni di *Longissimus dorsi* nei Gruppi A, B e C.

	Umidità	Grassi	Proteine	Collagene	Ceneri	pH
A	76,0	2,7^{c}	20,7	2,3	0,4^{a}	6,0
B	74,4	4,1^{d}	21,2	2,4	1,2^{b}	5,7
C	73,9	3,9^{d}	21,3	2,5	1,1^{b}	5,7

Valori con lettere differenti sono statisticamente differenti (^{a,b}, P<0,05; ^{c,d}, P<0,10).

Non sono emerse differenze significative tra i gruppi per la forza di taglio (WBS), anche se i soggetti del gruppo B hanno fornito i valori medi tendenzialmente (P<0,10) più bassi. I capretti dei gruppi B e C hanno evidenziato valori di L*, indice del rosso (a*) e croma significativamente più elevati (P<0,05-0,001) rispetto al gruppo A. La conservazione del campione in frigorifero per 5 giorni ha determinato una differenza di colore che già al giorno 3 diventa percepibile all'occhio umano e in misura maggiore nei due gruppi trattati, rispetto al controllo (valori 5.87, 7,74 e 7,86). La stima della quantità di mioglobina (Mb) e delle sue forme (ossimioglobina, MbO2 e metamioglobina, MMb+) ha evidenziato un maggiore contenuto di Mb e MbO2 nel gruppo C (P<0,05) e una non diversa percentuale di MMb+. L'analisi istologica del tratto gastroenterico ha messo in evidenza alcune differenze nell'organizzazione ultrastrutturale, in particolare per lo spessore della mucosa e del suo epitelio di rivestimento, per un maggior sviluppo del sistema immunitario associato all'apparato gastrointestinale. Il test di valutazione del burst ossidativo leucocitario ha messo in evidenza una maggior produzione di anione superossido e quindi una maggiore attivazione leucocitaria, verosimilmente collegata ad un aumento dell'attività fagocitaria, negli animali alimentati con l'aggiunta di polifenoli. Ulteriori studi su un maggior numero di soggetti sono necessari per valutare le funzioni dei polifenoli nella fase di post-svezzamento nei capretti.

Growth performance and meat characteristics in kids fed a diet supplemente with polyphenols

Key words: kids, polyphenols, meat characteristics.

Bibliografia

Fasseas, M.K., K.C. Mountzouris, P.A. Tarantilis, M. Polissiou, Zervas G. (2007), Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. Food Chemistry 106:1188-1194.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Pagagna G. (1997), Antioxidants properties of Phenolic compounds. Plant Science 2 (4):152-157.

Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R. (2005), Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. J. Agric. Food Chem., 53:823-837.

Valutazione dell'effetto degli oli di *Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis* e *Cynara cardunculus* sulla produzione di gas ruminali in sistemi *in vitro*

G. COBELLIS[1], A. PETROZZI[2], C. FORTE[1], A. AQUINO[2], F. COTANA[2], M. TRABALZA MARINUCCI[1]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria - [2] Dipartimento di Ingegneria

Parole chiave: oli essenziali, metano, fermentazioni ruminali, degradabilità ruminale.

INTRODUZIONE - L'utilizzo degli estratti di origine vegetale e degli oli essenziali, volto ad influenzare le fermentazioni a livello ruminale, è oggetto di ricerca frequente negli ultimi anni (Patra et al., 2011; Patra e Yu, 2012). Gli oli essenziali sono composti aromatici naturali costituiti da complesse miscele di metaboliti secondari prodotte da numerose piante dalle riconosciute proprietà antimicrobiche (Benchaar et al., 2008). L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare le variazioni nella produzione di metano ed altri gas ruminali di fermentazione in un sistema *in vitro* in cui era previsto l'impiego di estratti diversi di origine vegetale.

MATERIALI E METODI - Le fermentazioni sono state condotte in bottiglie da siero da 100 mL. In ciascuna bottiglia è stato posto un substrato (300 mg; granulometria: 1 mm) composto da fieno di erba medica e farina di granoturco (50:50). Al substrato, ad eccezione delle bottiglie controllo, sono stati aggiunti 15 mg di uno dei seguenti oli: a) origano (*Origanum vulgare L.*); b) rosmarino *(Rosmarinus officinalis L.*); c) cardo (*Cynara cardunculus L.*). Sono state preparate 4 bottiglie per ciascun trattamento (compreso il controllo). Il buffer medium è stato preparato secondo la procedura di Menke e Steingass (1988). Il succo ruminale è stato raccolto da una pecora di razza Bergamasca x Appenninica provvista di cannula ruminale ed è stato aggiunto al buffer in rapporto 1:2. La soluzione così ottenuta è stata distribuita (30 mL) in tutte le bottiglie, che sono state chiuse e poste in incubazione a 39°C per 24 h sotto agitazione. Un ulteriore gruppo di 4 bottiglie, contenenti soltanto la soluzione, è stato sottoposto alle stesse condizioni di incubazione degli altri gruppi sperimentali ed è stato utilizzato come bianco (correzione dei risultati per la produzione del gas risultante dalla sola attività del succo ruminale). Alla fine delle 24 h di incubazione, è stata valutata la pressione sviluppatasi all'interno di ciascuna bottiglia ed è stata rilevata la composizione relativa dei singoli prodotti di fermentazione (CO_2, CH_4, O_2, NH_3, H_2S). Lo strumento utilizzato è stato un analizzatore portatile ad infrarossi ABE_1500, impiegato dal Centro Nazionale per le Ricerche sulle Biomasse per la valutazione della concentrazione delle componenti gassose del biogas prodotto dall'impianto anaerobico a biocelle (Cotana et al., 2013). Lo strumento è dotato di sensori a celle elettrochimiche e ad infrarossi ad elevata sensibilità e consente di rilevare il contenuto percentuale in CH_4, CO_2, O_2 e le parti per milione di CO, H_2S ed NH_3. Il contenuto di ciascuna bottiglia è stato filtrato attraverso *filter bags* (porosità: 50 µm; Ankom Technology, Macedon, NY, USA) per la determinazione del substrato residuo ed il calcolo della degradabilità, previa essiccamento in stufa delle stesse a 105 °C per 24 h. I dati sono stati analizzati mediante procedura GLM del software SAS (2010) utilizzando un modello di analisi della varianza.

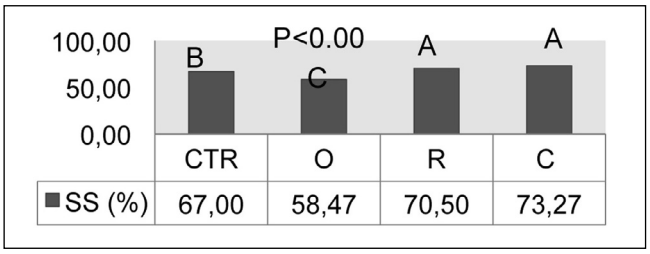


Figura 1 - Degradabilità percentuale della sostanza secca (SS) registrata per i diversi trattamenti.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I dati in Tabella 1 evidenziano una riduzione della pressione sviluppata, e quindi del gas prodotto, in presenza di tutti e tre gli oli utilizzati ma in maggior misura in presenza di olio di cardo ed origano (P<0,01). La produzione di CH_4 non viene influenzata dall'aggiunta in coltura degli oli essenziali.

Rilevante è invece l'effetto inibitorio sulla produzione di NH_3 (Tab. 1) e sulla degradabilità della sostanza secca operata dall'olio di origano (P<0,001) (Fig. 1). Gli effetti osservati potrebbero essere riconducibili ad un azione selettiva degli oli utilizzati su alcuni microorganismi ruminali, determinando una riduzione della degradazione di alcune componenti del substrato (proteine ed aminoacidi) (Patra et al., 2011). Sostanze naturali quali gli estratti vegetali possono trovare un impiego nelle diete dei ruminanti al fine di migliorare l'efficienza energetica della razione e il benessere e la produttività dell'animale. Nel contempo, il loro impiego consente di ridurre l'impatto ambientale degli allevamenti. Sono tuttavia necessari ulteriori studi volti a stabilire con maggiore precisione gli effetti di tali sostanze sia a livello ruminale che sistemico.

Tabella 1 - Effetto degli oli essenziali di origano (O), rosmarino (R) e cardo (C) sulla produzione di gas in vitro.

	CTR	O	R	C	ES	*P*
Pressione (mbar)	1014,9^{a}	1012,84^{bc}	1013,3^{b}	1012,42^{c}	0,21	***
Gas (mL)	71,36^{a}	71,10^{bc}	71,17^{b}	71,04^{c}	0,02	***
CH_4 (mL)	11,80	12,23	12,13	12,35	0,14	NS
CO_2 (mL)	52,49^{a}	50,61^{b}	51,08^{b}	50,04^{c}	0,12	***
O_2 (mL)	0,13	0,01	0,02	0,00	0,04	NS
H_2S (ppm)	467,60^{a}	466,60^{bc}	467,00^{ab}	466,00^{c}	0,17	***
NH_3 (ppm)	957,80^{a}	479,60^{b}	810,50^{ab}	724,80^{ab}	82,29	**

** P<0,01; *** P<0,001; NS: non significativo.
^{abc} Medie all'interno della stessa riga differiscono significativamente.

Effect of essential oils of origanum vulgare, rosmarinus officinalis and cynara cardunculus on rumen in vitro fermentation

Key words: essential oils, methane, rumen fermentations, ruminal degradability.

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. D. Sci. Technol. 145:209-228.

Cotana F., Petrozzi A., Pisello A.L., Cavalaglio G., Coccia V., Moretti E. (2013), An innovative small sized anaerobic digester integrated in historic building. Energy Procedia 45:333-341.

Menke K.H., Steingass H. (1988), Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 28:7-55.

Patra A.K. (2011), Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. Asian J. Anim. Vet. Adv. 6:416-428.

Patra A.K. e Yu Z. (2012), Effects of essential oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 78:4271-4280.

SAS Institute Inc. (2010), version 8.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

EMIDA ERA-NET: la ricerca europea a supporto dell'allevamento caprino

S. COLUSSI[1], G. VACCARI[2], B. CHIAPPINI[2], R. NONNO[2], M.A. DI BARI[2], C. LIGIOS[3], C. MAESTRALE[3], C. SOLINAS[3], M. VITALE[4], S. MIGLIORE[4], S. TRISORIO[1], P. MODESTO[1], I. PERNAZZA[5], M.G. PERROTTA[6], P.L. ACUTIS[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
[2] Istituto Superiore di Sanità
[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna
[4] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia
[5] Associazione Nazionale della Pastorizia
[6] Ministero della Salute

Parole chiave: caprini, scrapie, selezione genetica.

INTRODUZIONE - La scrapie è un'encefalopatia spongiforme trasmissibile (EST) che colpisce gli ovi-caprini. L'unico strumento di controllo della scrapie nella capra si basa sull'individuazione dei capi positivi e sul conseguente abbattimento totale dell'effettivo presente in sede di focolaio, con notevoli ripercussioni negative sul settore dell'allevamento caprino. Studi di campo e sperimentali hanno messo in luce l'associazione tra resistenza alla scrapie e la mutazione del gene *PRNP* 222K. Il progetto Europeo EMIDA ERA-NET "Towards breeding of goats for genetically determined TSEs resistance" si propone di apportare le informazioni mancanti e necessarie all'attuazione di un piano di selezione nei caprini (WP1) e di coinvolgere attivamente gli allevatori (WP2). Questo abstract descrive il lavoro svolto nell'ambito di tale progetto dal consorzio italiano, costituito dai tre Istituti Zooprofilattici Sperimentali di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV), Sicilia (IZSSI) e Sardegna (IZSSA) e dall'Istituto Superiore di Sanità.

MATERIALI E METODI - WP1: IZSPLV ha contribuito a fornire agli altri partner europei, tra cui ISS, campioni derivanti da 4 capre Q/K e 2 Q/Q infettate sperimentalmente, da utilizzare quale inoculo in arvicole (13-17 per inoculo). ISS ha effettuato prove di conversione *in vitro* mediante PMCA per indagare la diversa resistenza del polimorfismo 222K; a tale scopo sono stati utilizzati substrati di topi transgenici wild-type (Tg 501) e topi transgenici con K al codone 222 (Tg 516). IZSSA ha in corso lo studio di linee famigliari suscettibili e resistenti alla scrapie nell'ambito di un focolaio ottenuto mediante inoculo sperimentale di 35 capre successivamente sottoposte ad accoppiamento; il focolaio comprende, infatti, i capi appartenenti a prima e seconda generazione. WP2: tutti gli IIZZSS sono impegnati nella genotipizzazione delle razze presenti sul proprio territorio di competenza, al fine di valutare la frequenza delle mutazioni associate a resistenza e l'ubicazione degli animali portatori di 222K. Inoltre partecipano alla sensibilizzazione e divulgazione di informazioni agli allevatori mediante creazione di materiale informativo. La genotipizzazione è in corso di estensione a tutto il territorio nazionale, grazie alla collaborazione di ASSONAPA che invierà campioni di becchi controllati e utilizzati come riproduttori. Al momento lo stato delle attività è il seguente:
IZSPLV: sono pervenuti 577 campioni, provenienti da 10 allevamenti: 505 sono stati genotipizzati al codone 222 mediante la tecnica ad alta resa del pirosequenziamento.
IZSSA: 201 becchi provenienti da 13 allevamenti sono stati genotipizzati mediante sequenziamento diretto.
IZSSI: 252 campioni provenienti da differenze razze tipiche della Sicilia (Girgentana, Rossa Mediterranea, Maltese e incroci) sono state genotipizzate mediante sequenziamento diretto.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Le prove svolte dall'ISS hanno confermato in vitro l'assenza di amplificazione nel caso nel substrato sia presente il polimorfismo K222. Gli inoculi in arvicola sono al momento in corso.
Per coinvolgere gli allevatori è stata prodotta una brochure divulgativa, distribuita attraverso la partecipazione ad eventi zootecnici, convegni e attraverso il canale ASSONAPA e ASL.
Lo studio svolto da IZSPLV ha mostrato che l'allele 222K presenta nel campione analizzato una frequenza pari all'11% (57 capre portatrici della mutazione di cui 53 eterozigoti e 4 omozigoti).
IZSSA ha rilevato una frequenza di 222K, nel campione analizzato, pari all'8%, e inoltre un'elevata frequenza (25%) di una mutazione presente solo nella razza Sarda: 145D. In vivo è stata confermata la resistenza associata a 222K ed è stato evidenziato un ruolo protettivo anche di 145D, pur se il follow-up è ancora in corso.
IZSSI ha rilevato una frequenza di 222K pari al 29% nella razza Girgentana, 10% nella Rossa Mediterranea, 0% nella razza Maltese e 8% negli incroci.
Il progetto avrà termine nel mese di aprile 2015: gli studi di inoculo e genotipizzazione sono pertanto ancora in corso. I primi risultati ottenuti sono molto promettenti: sia in vivo sia in vitro si sono raccolte ulteriori evidenze scientifiche a riprova della resistenza conferita da 222K e quindi della possibilità di utilizzare questo allele come target di selezione genetica per eradicare la scrapie nei caprini. Le analisi di frequenza hanno confermato quanto già riportato da Acutis *et al.*, (2008), ossia che la frequenza di 222K è maggiore nelle razze meridionali rispetto alle settentrionali; nonostante ciò, il progetto sta consentendo di individuare gli allevamenti in cui sono presenti gli animali resistenti, che potranno essere utilizzati come nuclei di partenza per la disseminazione dell'allele di resistenza nella popolazione generale. I campioni che a breve verranno raccolti da ASSONAPA in tutta Italia consentiranno di avere una mappa nazionale della distribuzione dei riproduttori portatori del carattere di resistenza. Il grande interesse mostrato dagli allevatori è un elemento molto positivo, indicativo di una buona probabilità di successo dell'azione di incremento di 222K nelle razze caprine italiane e, nel futuro, di una buona adesione e applicazione di un eventuale piano di selezione genetica.

EMIDA ERA-NET: european research to sustain goat breeding

Key words: goats, scrapie, genetic selection.

Bibliografia

Acutis P.L., Colussi S., Santagada G., Laurenza C., Maniaci M.G., Riina M.V., Peletto S., Goldmann W., Bossers A., Caramelli M., Cristoferi I., Maione S., Sacchi P., Rasero R. (2008) Genetic variability of the PRNP gene in goat breeds from Northern and Southern Italy. J Appl Microbiol. 104(6): 1782-9.

EFSA Scientific Opinion: Genetic TSE resistance in goats (2009) The EFSA Journal 995:1-25.

Studio preliminare del microbiota ruminale caprino mediante tecnologia *Next Generation Sequencing*

P. CREMONESI[1], E. CAPRA[1], F. TURRI[1], S. CHESSA[1], S. COLOMBINI[2], L. RAPETTI[2], B. CASTIGLIONI[1]

[1] Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, U.O.S di Lodi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, c/o Parco Tecnologico Padano, Lodi
[2] Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, Milano

Parole chiave: capra, microbiota ruminale, batteri, archea.

INTRODUZIONE - Le comunità microbiche presenti nel tratto gastrointestinale dei ruminanti influenzano l'efficienza dell'utilizzo di nutrienti quali amido, proteine e fibre vegetali, che diventano la principale fonte di carbonio ed energia per l'ospite. L'idrolisi dei polisaccaridi e delle proteine presenti nella biomassa vegetale ad opera di tali comunità microbiche porta alla produzione di CO_2, CH_4, acidi grassi volatili e H_2. Alcuni studi riportano gli effetti dell'ospite, della dieta, delle condizioni ambientali su un elevato numero di specie e comunità microbiche del rumine. Questi studi sono stati condotti su diversi ruminanti quali la vacca, la renna, le pecore, il bufalo, lo yak (Ross et al., 2013; Kittelmann et al., 2013), mentre solo pochi lavori (Cunha et al., 2011; Lee et al., 2012) descrivono la diversità microbica del rumine caprino attraverso le tecniche di sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS). Scopo del presente lavoro è stato quello di compiere uno studio preliminare, sulla variabilità individuale del microbiota ruminale nella specie caprina, mediante l'utilizzo della tecnologia NGS.

MATERIALI E METODI - È stato prelevato il fluido ruminale da tre capre di razza Camosciata delle Alpi, a digiuno prima della somministrazione della dieta. Il fluido ruminale è stato immediatamente refrigerato e conservato a -80°C fino alla successiva liofilizzazione. Il DNA è stato estratto utilizzando il protocollo descritto da Yu e Morrison (2004), partendo da 25 g di campione liofilizzato. L'analisi quali-quantitativa del DNA estratto è stata effettuata sia mediante Nanodrop sia su gel di agarosio 1%. Il gene 16S rRNA è stato utilizzato per la caratterizzazione dei batteri e degli archea, con le due coppie di primer descritte in letteratura (Kittelmann et al., 2013). Tutti i primer contenevano alle due estremità sequenze adattori per il sequenziamento su piattaforma MiSeq Illumina. Il protocollo prevede una prima fase di amplificazione con i primer specificati, seguita da una secondo step di arricchimento con un breve ciclo di amplificazione in presenza di primer complementari alle sequenze degli adattatori (Nextera dual index barcodes, Illumina). La classificazione dei microrganismi è stata effettuata utilizzando il software MiSeq Reporter (Illumina), che effettua un'analisi tassonomica utilizzando il database Greengenes.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Sono stati analizzati un totale di 1.037.457 reads per i batteri e un totale di 1.294.339, reads per gli archea. I batteri identificati provengono da 19 phyla comprendenti una media di 87 famiglie e 135 genera, mentre gli archea da una media di 7 phyla, 12 famiglie e 15 genera nei tre individui analizzati. Come già riportato in altri lavori pubblicati (Kittelman et al., 2013; Cunha et al., 2011), la famiglia di batteri più rappresentata nel rumine delle tre capre è quella delle *Prevotellaceae* (44,9 ± 4,4%), seguita dalla famiglia delle *Porphyromonadaceae* (7 ± 1,6%). Questi batteri apparentemente giocano il ruolo maggiore nella degradazione della dieta a livello del rumine. Altri gruppi di batteri appartengono alle famiglie *Veillonellaceae* (4,3 ± 0,4%), *Lachnospiraceae* (3,7 ± 0,3%), *Fibrobacteriaceae* (2,2 ± 1,1%), *Flavobacteriaceae* (3,8 ± 0,9%) e *Ruminococcaceae* (2,5 ± 0,5%). Circa il Il 28% dei batteri analizzati è risultato non classificato. La composizione della comunità degli archea è risultata simile in due delle tre capre analizzate per la famiglia delle *Picrophilaceae* (79,7 ± 9,2%) e *Methanobacteriaceae* (13,4 ± 5,6%) e per contro, una delle tre capre, a fronte di un 4% di archea non identificati, ha mostrato la presenza nel rumine del 43,4% di archea appartenenti alla famiglia delle *Picrophilaceae,* del 9,6% di *Methanobacteriaceae* e del 42,7% di *Methanomicrobiaceae*. Il completamento dello studio delle altre popolazioni presenti nel liquido ruminale quali i protozoi, che vivono in stretta simbiosi con i metanogeni, potrebbe consentire di capire meglio la variabilità riscontrata per gli archea negli animali analizzati. I protocolli sviluppati e la tecnologia utilizzata in questo approccio sperimentale hanno mostrato di essere un ottimo strumento per lo studio e la definizione delle popolazioni microbiche presenti nel rumine.

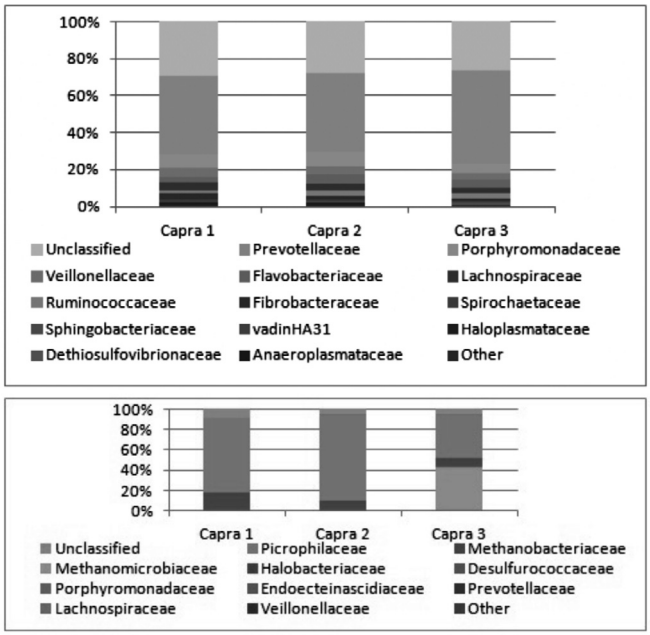


Figura 1 - Composizione delle comunità microbiche (Batteri, Archea) presenti nel rumine delle tre capre camosciate.

Preliminary study of goat rumen microbiome by *Next Generation Sequencing*

Key words: goat, rumen microbiome, bacteria, archea.

Bibliografia

Cunha I.S., Barreto C.C., Costa O.Y., Bomfim M.A., Castro A.P., Kruger R.H., Quirino B.F. (2011), Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (Capra hircus) from the semiarid region of Brazil. Anaerobe 17(3):118-124.

Kittelmann S., Seedorf H., Walters W.A., Clemente J.C., Knight R., Gordon J.I., Janssen P.H. (2013), Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. PLoS One 8(2):e47879.

Lee H.J., Jung J.Y., Oh Y.K., Lee S.S., Madsen E.L., Jeon C.O. (2012), Comparative survey of rumen microbial communities and metabolites across one caprine and three bovine groups, using bar-coded pyrosequencing and ^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol. 78(17):5983-5993.

Ross E.M., Moate P.J., Marett L., Cocks B.G., Hayes B.J. (2013), Investigating the effect of two methane-mitigating diets on the rumen microbiome using massively parallel sequencing. J. Dairy Sci 96(9):6030-6046.

Yu Z., Morrison M. (2004), Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Biotechniques 36(5):808-812.

Variabilità del DNA mitocondriale nella popolazione ovina "Rocche del Crasto"

A. CRISCIONE[1], V. MOLTISANTI[1], L. CHIES[2], M. AVONDO[1], D. MARLETTA[1], S. BORDONARO[1]

[1] Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agricole e Alimentari (DISPA), Università di Catania, Italia
[2] Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie, Università Mediterranea di Reggio Calabria, Italia

Parole chiave: biodiversità, ovini delle Rocche del Crasto, DNAmt.

INTRODUZIONE - Le Rocche del Crasto costituiscono una grande formazione rocciosa situata a ridosso dei comuni di Longi e Alcara Li Fusi nel Parco dei Nebrodi. Il "Progetto Biodiversità Ovini Rocche del Crasto", voluto dalla Regione Sicilia, è finalizzato al recupero delle forme di allevamento tradizionali siciliane per lo sviluppo del territorio rurale e la gestione sostenibile della risorse naturali. Questo obiettivo è compreso fra gli indirizzi comunitari di tutela, conservazione e gestione del patrimonio genetico animale, attraverso il recupero del patrimonio ovino siciliano allevato in aree difficili e svantaggiate. Nell'ambito di questo più ampio progetto, è stata condotta l'analisi della variabilità del DNA mitocondriale (DNAmt) nella popolazione ovina allevata nel territorio delle Rocche del Crasto.

MATERIALI E METODI - All'interno del Parco dei Nebrodi, sono stati prelevati 89 campioni di sangue in 9 aziende distribuite nell'areale delle Rocche del Crasto (RC). Nello studio sono stati inclusi anche 16 campioni appartenenti alle 4 razze ovine autoctone siciliane: Comisana (CO, 3), Barbaresca (BA, 5), Pinzirita (PI, 5) e Valle del Belice (VB, 3). Il DNA è stato estratto utilizzando il kit EuroGOLD Blood. Un sotto campione di 39 capi di ovini Rocche del Crasto, non parenti in linea femminile e rappresentativo delle aziende, e i 16 campioni delle razze siciliane sono stati sequenziati nella regione del *D-loop* compresa fra i nucleotidi 16132 e 16479 utilizzando un sequenziatore automatico Applied Biosystems 3130. Le sequenze sono state allineate alla sequenza mitocondriale completa di Ovis Aries (GenBank AF010406), con l'ausilio del software MEGA v5.2 (Tamura et al., 2011). DNAsp v5.10 (Librado e Rozas, 2009) è stato utilizzato per evidenziare i siti polimorfi e definire gli aplotipi. Le sequenze aplotipiche sono state poi editate in ARLEQUIN v3.1 (Excoffier et al., 2006) allo scopo di calcolare i principali parametri di diversità genetica. L'albero filogenetico degli aplotipi è stato costruito mediante l'algoritmo di raggruppamento Neighbor-Joining utilizzando il metodo Kimura 2-parameter (K2-p), basato sul numero di differenziazione tra gli aplotipi individuati.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'analisi della regione del *D-loop* di 347 bp ha permesso di individuare 18 siti polimorfi (5,5%), per un totale di 19 aplotipi (Tab. 1) nell'intero campione di 55 ovini siciliani. Nella popolazione Rocche del Crasto sono stati identificati 16 aplotipi, di cui 5 sono in comune con le altre razze siciliane. Le sostituzioni nucleotidiche sono tutte delle transizioni, ad eccezione della trasversione G>T[16427], che caratterizza l'aplotipo 4. Tutte le sequenze hanno l'inserzione (16342_16343insC). Molto frequente è anche la sostituzione T>C in posizione 16344 che si osserva nell'89% dei campioni; pertanto risulta notevolmente diffuso il motivo CC ai nt16343/16344. L'aplotipo di gran lunga più frequente (Hap 1, 0,51 nelle RC e 0,47 nell'intero campione) è presente in tutte le aziende di RC analizzate. Di contro, ben 11 aplotipi sono stati identificati in un singolo capo di RC. Per i parametri relativi alla diversità genetica, gli ovini RC hanno rivelato una discreta e intermedia variabilità genetica (h=0,737; π_n=0,005) a livello di questa regione del *D-loop* rispetto alla PI (h=1,00; π_n=0,007) e VB (h=1,00; π_n=0,010) e alla CO (h=0,667; π_n=0,026) e BA (h=0,700; π_n=0,001). L'albero NJ mostra le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi osservati nelle popolazioni siciliane (Fig. 1). Il DNAmt non permette la tracciabilità né delle razze né delle aziende di RC, tuttavia le sue peculiari caratteristiche, come l'eredità materna, e l'alto tasso di mutazione della regione del *D-loop*, lo rendono particolarmente utile per studi filogenetici. In questo studio preliminare il sequenziamento di una regione di 346 bp ha permesso di definire le relazioni genetiche in linea materna in un campione di 55 ovini siciliani appartenenti a 5 razze e popolazioni, con particolare riferimento alla popolazione delle Rocche del Crasto.

Lavoro finanziato da Regione Sicilia Gli autori ringraziano il dott. Giuseppe Spartà e il dott. Vincenzo Pruiti della Regione Sicilia.

Variability of mitochondrial DNA in Rocche del Crasto sheep population

Key words: biodiversity, Rocche del Crasto sheep, mtDNA.

Bibliografia

Excoffier L., Smouse P., Quattro J. (1992), Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479-491.

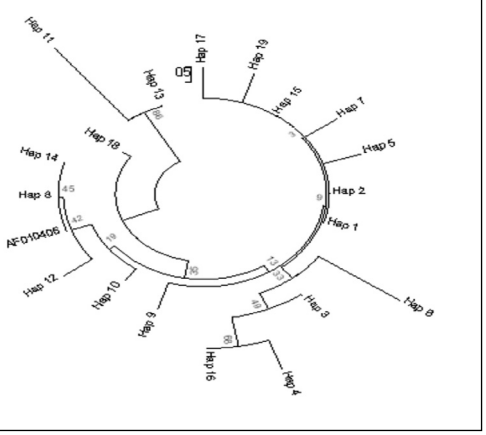
Librado P. and Rozas J. (2009), DnaSP v5: A software for comprensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011), MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Tabella 1 - Distribuzione degli aplotipi nelle razze/popolazioni (Rocche del Crasto RC, Barbaresca BA, Comisana CO, Pinzirita PI, Valle del Belice VB).

Aplotipo	Posizione delle sostituzioni nucleotidiche relative a GeneBank AF010406																	n.	Distribuzione degli aplotipi per razza
	16144	16156	16209	16217	16244	16277	16343	16344	16357	16393	16401	16411	16427	16430	16441	16447	16454	16473	
AF010406	C	C	C	C	A	G	-	T	G	T	G	G	G	C	T	G	G	T	1	
Hap_1	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	26	$RC_{(22)}$; $BA_{(3)}$; $CO_{(2)}$;$PI_{(1)}$
Hap_2	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	2	$RC_{(1)}$; $BA_{(1)}$
Hap_3	.	.	.	.	G	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	1	$BA_{(1)}$
Hap_4	.	.	.	.	G	.	C	C	.	.	A	.	T	.	.	.	.	-	1	$RC_{(1)}$
Hap_5	.	.	.	.	.	A	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	1	$RC_{(1)}$
Hap_6	.	.	.	T	.	.	C	C	.	.	A	A	.	.	.	.	.	-	4	$RC_{(2)}$; $PI_{(1)}$; $VB_{(1)}$
Hap_7	.	.	.	.	.	.	C	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	4	$RC_{(1)}$; $CO_{(1)}$; $PI_{(1)}$; $VB_{(1)}$
Hap_8	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	4	$RC_{(3)}$; $PI_{(1)}$
Hap_9	.	.	.	.	.	.	C	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	-	1	$PI_{(1)}$
Hap_10	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	2	$RC_{(2)}$
Hap_11	T	.	T	T	.	.	C	C	A	.	.	.	.	.	C	A	A	-	1	$RC_{(1)}$
Hap_12	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	1	$RC_{(1)}$
Hap_13	.	.	T	T	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	C	.	A	-	1	$RC_{(1)}$
Hap_14	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	1	$RC_{(1)}$
Hap_15	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	1	$RC_{(1)}$
Hap_16	.	.	.	.	G	.	C	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	-	1	$RC_{(1)}$
Hap_17	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	1	$RC_{(1)}$
Hap_18	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	1	$RC_{(1)}$
Hap_19	.	T	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	1	$VB_{(1)}$

Figura 1 - Albero NJ degli aplotipi costruito secondo Kimura (K2-p).



Identificazione di larve di nematodi broncopolmonari in ovini e caprini siciliani

V. CURRÒ, D. VICARI, R. DISCLAFANI, S. MARINEO, A. PIAZZA, E. LA CAVERA, S. CARACAPPA

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

Parole chiave: nematodi broncopolmonari, ovi-caprini siciliani, *Dictyocaulus filaria, Muellerius capillaris.*

INTRODUZIONE - La realtà siciliana vanta più di 800.000 capi (732 809 ovini e 117 347 caprini) che, anche se in riduzione rispetto ai dati Istat del 2000, rappresentano ancora oggi la tipologia di allevamento più rappresentata nell'isola (Istat, 2010). Inoltre, il carattere prettamente estensivo degli allevamenti siciliani favorisce la contaminazione dell'alimento con le deiezioni così come il contatto con tutta quella serie di parassiti che necessitano di un ospite intermedio al fine di completare il proprio ciclo biologico come avviene per i Piccoli Strongili Bronco-Polmonari (PSBP). I piccoli ruminanti, diversamente dalla specie bovina, possono essere parassitati sia da *Dictyocaulus filaria* che dai PSBP (*Muellerius capillaris*, *Neostrongylus linearis*, *Protostrongylus rufescens* e *Cystocaulus ocreatus*). Queste infestazioni spesso sono sotto diagnosticate a causa della sintomatologia non sempre evidente. Tuttavia, le ripercussioni sulla produttività dell'allevamento possono essere notevoli sia da un punto di vista economico che di benessere animale. Segnalazioni di nematodi broncopolmonari nei piccoli ruminanti sono risultate frequenti nell'Italia Centrale, soprattutto per quanto riguarda i PSBP (Zannutto, 2008) così come in Europa (Nocture *et al*., 1998) e recentemente in Oriente (Regassa *et al*., 2010; Borji, *et al*., 2012; Alemu, 2006). Una correlazione è stata individuata da diversi studi tra il tasso di infestazione da parassiti broncopolmonari e la concomitante presenza di fattori intrinseci (età, sesso, peso corporeo) ed estrinseci (temperatura, piovosità, umidità, altitudine e disponibilità di foraggio) e hanno dimostrato come una maggiore altitudine, l'età adulta e il sesso femminile sembrano incidere in modo significativo sul tasso di infestazione (Regassa *et al.,* 2010; Borji *et al*., 2012; Alemu *et al.,* 2006; Torina *et al*., 2004). Tuttavia, in relazione alla specie di nematode identificata, esistono differenze significative tra i diversi fattori coinvolti (Regassa *et al*., 2010; Borji *et al*., 2012; Torina *et al*., 2004). I nematodi broncopolmonari rimangono ancora una problematica di grande interesse nonostante i trattamenti di profilassi attuati con antiparassitari e in alcune aree con vaccino vivo attenuato (Zanutto, 2008). Lo scopo del presente studio è quello di valutare il tasso di infestazione da parte di nematodi broncopolmonari negli ovi-caprini siciliani e di identificare le specie più rappresentate sul territorio.

MATERIALI E METODI - Il campionamento prevedeva la raccolta di campioni fecali individuali in allevamenti bradi di ovini e caprini della Sicilia Nord-occidentale nel corso del 2013. Le larve sono state messe in evidenza seguendo la metodica di sedimentazione con apparato di Baermann (Euzeby, 1958). L'identificazione delle larve è stata eseguita tramite le chiavi analitiche descritte da Euzeby (1958) e da Whitlock (1960).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I risultati dell'identificazione di specie sono riportati in Tabella 1. Su un campione di 294 feci di ovino prelevate da 8 allevamenti ovini e 7 misti, in seguito ad analisi l'88.4% è risultato positivo ad almeno un nematode broncopolmonare. In particolare, 188 larve (72.3%) sono state identificate come *Dictyocaulus filaria* mentre 86 (33%) come *Muellerius capillaris* e in 28 (10.7%) campioni erano presenti larve di entrambe le specie citate. Diversamente, in campioni prelevati da 5 allevamenti della specie caprina, ben il 92.8% dei campioni analizzati sono risultati positivi ad almeno un nematode in cui *Muellerius capillaris* era maggiormente rappresentato rispetto a *Dictyocaulus filaria*. Tuttavia, in 48 campioni caprini erano presenti larve di entrambe le specie di nematodi identificate. Confermiamo quindi la presenza ed un alto tasso di prevalenza di nematodi broncopolmonari negli allevamenti di piccoli ruminanti siciliani con una maggiore infestazione da parte di *Dictyocaulus filaria* negli ovini e di *Muellerius capillaris* nei caprini. Così come riportato dal gruppo di Alemu nel 2006, questo studio suggerisce come la tipologia di allevamento siciliano con il suo carattere prettamente estensivo (Alemu *et al*., 2006), e quindi anche la vicinanza con specie selvatiche parassitate quali camosci (Nocture *et al.,* 1998) e cervi (Panadero *et al*., 2001), favoriscono l'instaurarsi di questa parassitosi e la sua permanenza nel territorio. Inoltre, la profilassi contro questi parassiti attualmente non è efficace. Infatti, mentre in altre aree vengono messi in atto programmi di controllo e monitoraggio (Lopez *et al*., 2010) contro questi agenti, molto spesso in Sicilia l'applicazione dei trattamenti antiparassitari viene eseguita senza protocolli standardizzati e periodici e talvolta i soggetti non vengono trattati affatto, forse per via dell'elevato costo del farmaco. Rimane quindi la necessità di monitorare la situazione epidemiologica sul territorio, di sensibilizzare l'allevatore su questa problematica a salvaguardia delle produzioni e di aumentare l'attenzione del settore veterinario su queste malattie che ancora oggi vengono troppo spesso sottovalutate.

Tabella 1 - Risultati dell'identificazione delle larve di nematodi broncopolmonari negli capi ovini e caprini siciliani.

	Ovini (%)	Caprini (%)
Positivi / Eseguiti	260/294 (88.4)	104/112 (92.8)
Dictyocaulus filaria	188 (72.3)	52 (50)
Muellerius capillaris	86 (33)	94 (90.4)
Co-presenza	28 (10.7)	48 (46.2)

Bronchopulmonary nematodes identification in sheep and goats from Sicily

Key words: bronchopulmonary nematodes, sicilian sheep and goats, *Dictyocaulus filaria, Muellerius capillaris.*

Bibliografia

Alemu S., Leykun E. G., Ayelet G., Zeleke A. (2006) - Study on small ruminant lungworms in northeastern Ethiopia - Veterinary Parasitology 142, 330-335.

Borji H., Azizzadeh M., Ebrahimi M., Asadpour M. (2012) - Study on small ruminant lungworms and associated risk factors in northeastern Iran - Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 853-856.

Euzeby J. (1958) - Diagnostic experimental des Helminthoses animals - Vigot Freres, Editeures: pp. 66-67 e 88-92.

López C.M., Cienfuegos S., Dacal V., Vázquez L., Panadero R., Fernández G., Díaz P., Lago N., Díez-Baños P., Morrondo M.P. (2010) - Efficacy of anthelminthic control programs against natural Muellerius capillaris infection in sheep in the north-west of Spain. Effect on blood gases and pH in venous blood samples. - Parasite. 17(2):167-71.

Nocture M., Cabaret J., Hugonnet-Chapelle L. (1998) - Protostrongylid nematode infection of chamois (Rupicapra rupicapra) at the Bauges massif (French Alps) - Veterinary Parasitology 77, 153-161.

Panadero R., Carrillo E.B., López C., Dìez-Baños N., Dìez-Baños P., Morrondo M.P. (2001) - Bronchopulmonary helminths of roe deer (Capreolus capreolus) in the northwest of Spain - Veterinary Parasitology 99, 221-229.

Regassa A., Toyeb M., Abebe R., Megersa B., Mekibib B., Mekuria S., Debela E., Abunna F. (2010) - Lungworm infection in small ruminants: Prevalence and associated risk factors in Dessie and Kombolcha districts, northeastern Ethiopia - Veterinary Parasitology 169, 144-148.

Torina A., Ferrantelli V., Sparagano O.A., Reale S., Vitale F., Caracappa S. (2004) - Climatic conditions and gastrointestinal nematode egg production: observations in breeding sheep and goats. - Ann N Y Acad Sci.1026:203-9.

Whitlock Y.H. (1960) - Diagnosis of Veterinary Parasitisms, Philadelphia, Lea & Febiger, p.182.

Zanutto S. (2008) - Malattie parassitarie in ruminanti allevati con metodo biologico in Veneto - Tesi Dottorale Unipd.

Monitoraggio delle variazioni del β-idrossibutirrato ematico durante la gravidanza in ovini da latte

G.L. D'ALTERIO[1], E. SCOCCIA[2], G. FILIPPINI[2], L. MOSCATI[2], C. MARESCA[2]

[1] Ambulatorio Veterinario Farnese, Farnese, VT
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche

Parole chiave: ovini da latte, tossiemia gravidica, β-idrossibutirrato.

INTRODUZIONE - L'impatto delle patologie metaboliche nella pecora da latte durante la gravidanza e nel periodo del peri-parto trova sempre più riscontro a livello bibliografico e nella pratica di campo (Karagiannis *et al.,* 2011; Fhtenakis *et al.,* 2012). A seguito di un bilancio energetico negativo, dovuto ad un aumentato fabbisogno energetico del feto/i in rapido accrescimento e/o ad un piano alimentare carente nella sua quota energetica, le pecore in gravidanza avanzata sono a rischio di sviluppare la tossiemia gravidica (Sargison, 2007). Al fine di prevenire la comparsa di segni clinici ad esito spesso mortale, soprattutto attraverso l'introduzione tempestiva di modifiche alla razione alimentare, viene posta particolare attenzione al rilevamento precoce della tossiemia gravidica in forma sub-clinica.
La misurazione del β-idrossibutirrato ematico (BHB), sia in laboratorio che in stalla tramite apposito apparecchio portatile (Panousis *et al.,* 2012), rappresenta il metodo diagnostico più affidabile. Attualmente viene consigliato di sottoporre un campione di pecore gravide, idealmente campionando quelle con gravidanza multipla, a monitoraggio del BHB a partire dalle sei settimane prima della data presunta del parto (Fhtenakis *et al.,* 2012. L'obbiettivo di questo studio è stato quello di definire in quale fase del periodo gestazionale sia possibile iniziare a rilevare variazioni significative del BHB, mettendo a confronto i dati ottenuti da due razze italiane di pecore da latte, ma anche in relazione alla gravidanza singola *vs* gravidanza multipla.
MATERIALI E METODI - In un allevamento intensivo, sono state campionate un totale di 45 pecore gravide selezionate (22 di razza Massese e 23 Comisane). Gli animali appartenevano a gruppi di monta in cui la diagnosi ecografica trans- addominale di gravidanza veniva effettuata 30 giorni circa dopo la rimozione dei montoni, i quali venivano mantenuti con le pecore per 45 giorni. I criteri d'inclusione degli animali nel campione erano una diagnosi ecografica di gravidanza gemellare ed il buono stato di salute riscontrato all'esame clinico generale. Delle pecore incluse nello studio, si registrava inoltre: a) la data di nascita; b) se primipare o pluripare; c) la data del parto; d) il numero di agnelli effettivamente nati da ciascuna di esse. Il BHB sierico è stato determinato mediante l'utilizzo di un analizzatore di chimica clinica Konelab 200 e reagenti dedicati. A partire dalla data del parto e procedendo a ritroso nel tempo, gli animali sono stati divisi in tre gruppi sulla base del periodo gestazionale: gruppo 1 (28-59 giorni), gruppo 2 (59-89 giorni) e gruppo 3 (oltre 90 giorni di gravidanza). Altre variabili considerate sono state il numero di feti (uno o più) e la razza. Il test t di Student è stato utilizzato per valutare eventuali differenze significative ($p<0,05$) tra i livelli di BHB ed i tre gruppi gestazionali, tra i livelli di BHB ed il numero di feti (uno o più), e tra i livelli di BHB e la razza.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Tra le 45 pecore individuate per via ecografica con gravidanza gemellare, solo il 62% (n.28) ha effettivamente partorito una coppia di agnelli. Nel nostro contesto produttivo solo in una minoranza degli allevamenti ovini si utilizza la diagnosi ecografica di gravidanza, e quando utilizzata, lo si fa al solo fine di confermare lo stato gravidico o meno. Variazioni significative dei livelli di BHB si osservavano già nel gruppo gestazionale 2, dove i valori di BHB erano superiori nelle pecore con gravidanza multipla rispetto a quelle con agnello singolo ($p=0,0067$), mentre sia nel gruppo 1 ($p=0,0003$) che nel gruppo 2 ($p=0,0018$) le pecore massesi con gravidanza gemellare avevano livelli di BHB significativamente superiori alle omologhe Comisane. Da notare che già nel gruppo 2 si riscontrava la presenza di 5 pecore con valori di BHB superiori a 0,8 mmol/L, quest'ultimo considerato un valore soglia per il rischio di sviluppo di tossiemia gravidica sub-clinica. Si suggerisce quindi che anticipare l'inizio del monitoraggio del BHB al periodo gestazionale compresso tra i due ed i tre mesi di gravidanza possa essere vantaggioso al fine preventivo, e che tra i fattori di rischio legati all'insorgenza di tossiemia gravidica possa essere annoverata anche la razza. Infine si è osservato che nelle pecore campionate durante tutte le sessioni di prelievo (n.29), circa il 50% di esse (n.15) mostrava addirittura un calo dei valori di BHB dal 90° giorno di gravidanza in poi, da cui il riproporsi dell'annoso problema che affligge il veterinario in campo: che percentuale di pecore in fase tardiva di gravidanza devo includere in un campione significativo al fine di monitorare il BHB, prevenire l'insorgenza di tossiemia gravidica, ed evitare un risultato negativamente falsato?

Monitoring significant variations of blood β-hydroxybutyric acid during pregnancy in dairy ewes

Key words: dairy sheep, pregnancy toxemia, β-hydroxybutyric acid.

Bibliografia

Fhtenakis G.C., Arsenos G., Brozos C., Fragkou I.A., Giadinis N.D., Giannenas I., Mavrogianni V.S., Papadopoulos E., Valasi I. (2012), Health management of ewes during pregnancy. Animal Reproduction Science 130: 198-212.

Karagiannis I., Panousis N., Kiossi E., Lafi S., Brozos C. (2011), Effects of subclinical pregnancy toxaemia on milk yield and health of intensively managed dairy ewes during the subsequent lactation. In: Fhtenakis G. (Ed.), Proceedings of the European Conference on Small Ruminant Health Management, 29-30 October 2011, Athens, Greece.

Panousis N., Brozos Ch., Karagiannis I., Giadinis N.D., Lafi S., Kritsepi-Konstantinou M. (2012), Evaluation of Precision Xceed® meter for on-site monitoring of blood ß-hydroxybutyric acid and glucose concentration in dairy sheep. Research in Veterinary Science 93: 435-439.

Sargison N.D. (2007), Pregnancy toxaemia. In: Aitken I.D. (Ed.), Diseases of Sheep, 4th edn. Blackwell, Oxford, 359-363.

Valutazione dei livelli contaminazione da radionuclidi beta emettitori (^{90}Sr) in campioni di latte e prodotti lattiero-caseari di origine ovina e caprina

D. DELL'ORO, M. IAMMARINO, N. BORTONE, M. MANGIACOTTI, A.E. CHIARAVALLE

Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Parole chiave: radioattività, stronzio 90, latte, prodotti lattiero-caseari.

INTRODUZIONE - I radionuclidi rappresentano una categoria di contaminanti inorganici largamente studiati, in virtù della loro propensione ad accumularsi nelle derrate alimentari, soprattutto in situazioni di emergenza radiologica come il recente incidente nucleare di Fukushima. Lo ^{90}Sr segue lo stesso metabolismo del calcio e l'ingestione accidentale di alimenti contaminati comporta un rapido assorbimento nell'organismo con conseguente accumulo nelle ossa dove causa irradiazione interna con comparsa di alterazioni genetiche e/o di malattie oncologiche. Tra i vari prodotti alimentari di origine animale, la categoria che può risultare maggiormente contaminata è senza dubbio quella del latte e dei prodotti lattiero-caseari. Tali prodotti, infatti, essendo caratterizzati da elevati livelli endogeni di Calcio, possono presentare elevate concentrazioni di alcuni radionuclidi, tra i quali lo ^{90}Sr. Alcuni studi, effettuati su terreni contaminati, hanno dimostrato che i livelli di ^{90}Sr escreto nel latte possono raggiungere lo 0,15%, indipendentemente dalla tipologia di foraggio (Annenkov et al., 2011).
In particolare, un'indagine preliminare ha messo in evidenza una contaminazione media da ^{90}Sr statisticamente più elevata nel latte di origine ovina e caprina rispetto a quella relativa al latte vaccino (dell'Oro et al., 2012). In questo lavoro viene presentata la recente attività di monitoraggio svolta presso il Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario sulla contaminazione da ^{90}Sr in 134 campioni di latte e prodotti lattiero-caseari, di origine vaccina, ovina e caprina.
MATERIALI E METODI - Per l'esecuzione del monitoraggio sono state impiegate due metodiche radiochimiche, validate ed accreditate, sia per le matrici liquide (latte) che per quelle solide (prodotti lattiero-caseari). Tali metodi sfruttano la scintillazione liquida ad ultra basso fondo con misurazione indiretta dell'attività dell'^{90}Y dopo il raggiungimento dell'equilibrio secolare ^{90}Sr/^{90}Y (UNI 9882:1991). Lo ^{90}Sr eventualmente presente nei campioni di latte (1,0 l) viene estratto mediante una resina a scambio cationico Dowex® 50WX-8 (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germania), dalla quale viene eluito con acido nitrico 3M, dopo ripetuti lavaggi per consentire l'eliminazione degli interferenti. I prodotti lattiero-caseari vengono, invece, inceneriti e dopo una fase di lisciviazione acida si precipita selettivamente lo stronzio come ossalato a pH 4,5, eliminando gli interferenti radiometrici (^{210}Pb e ^{210}Bi) come solfuri. Sia per le matrici solide che liquide si attende il raggiungimento dell'equilibrio secolare (min. 15 gg.) e si procede con la separazione dell'^{90}Y mediante complessazione con l'acido bis-2-etilesilortofosforico (HDEHP). La determinazione finale viene effettuata, dopo aggiunta di cocktail di scintillazione (Ultima Gold AB, Perkin Elmer), mediante conteggio in scintillatore liquido ad ultra basso fondo (Wallac 1220 Quantuls - Perkin Elmer), impostando un tempo di conteggio di 1000 minuti. I metodi accreditati sono stati utilizzati nell'ambito dei controlli ufficiali, conducendo un monitoraggio su 102 campioni di latte e 32 campioni di formaggi e prodotti lattiero caseari, di diversa specie e tipologia, pervenuti nei nostri laboratori.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - In tutti i prodotti lattiero-caseari é stata riscontrata la presenza di ^{90}Sr a livelli di concentrazione di attivitá superiori del Decision Threshold (0,003 Bq/kg), mentre un campione di latte caprino e 3 campioni di latte vaccino presentano concentrazioni di attivitá inferiori. I risultati del monitoraggio sono riportati di seguito in tabella.

Tabella 1 - Contenuto di ^{90}Sr in campioni di latte e prodotti lattiero-caseari.

Latte	N. di campioni	^{90}Sr concentrazione media (Bq/l)	^{90}Sr range (Bq/l)
Vaccino	25	0,05	0,003 - 0,12
Caprino	36	0,16	0,003 - 0,36
Ovino	41	0,28	0,2 - 1,10
Prodotti lattiero-caseari	**N. di campioni**	**^{90}Sr concentrazione media (Bq/kg)**	**^{90}Sr range (Bq/kg)**
Vaccini	15	0,11	0,02 - 0,35
Caprini	10	0,56	0,32 - 1,88
Ovini	7	1,24	0,40 - 1,88

Tali valori risultano di due ordini di grandezza piú bassi dei limiti di legge stabiliti nei casi di emergenza radioattiva (Reg. Euratom n. 2218/89) e confermano che lo ^{90}Sr si concentra maggiormante nel latte di origine caprina ed ovina rispetto al latte vaccino, nel caso di alimentazione con mangimi contaminati (Kruk e Solecki, 2011).
La stessa caratteristica è stata confermata nei prodotti lattiero-caseari, in relazione al fattore di concentrazione proprio della tecnologia di trasformazione. L'utilizzo di metodiche analitiche sensibili ed affidabili consente di estendere i controlli di radiocontaminazione a livelli molto bassi con particolare attenzione per tutte le matrici in cui i radiocontaminanti tendono maggiormente a concentrarsi come il latte di origine ovina e caprina.

Survey on the contamination level of β-emitter radionuclides (^{90}sr) in goat and sheep milk samples and dairy products

Key words: radioactivity, radiostrontium, milk, cheese.

Bibliografia

Annenkov B.N,, Averin V.S. (2011), Gestione dell'agricoltura nelle zone della contaminazione radioattiva. Veterinaria Italiana, 22.
dell'Oro D., Iammarino M., Bortone N., Chiaravalle A.E. (2012), Survey on the presence of ^{90}Sr in milk samples by a validated ultra low level liquid scintillation counting (LSC) method. E3S Web of Conferences (1) 39005 1-4.
Kruk M. Solecki J., (2011), Studies of ^{90}Sr in milk and commercial dairy products. J Radianal Nucl Chem 290:325-332.
Regolamento (Euratom) n. 2218/89.
UNI 9882:1991, Determinazione dei principali radionuclidi nel latte.

Correlazione tra età di macellazione, qualità nutrizionale ed organolettica in carne di agnelli di razza Altamurana

A. DELLA MALVA[1], M. ALBENZIO[1], G. ANNICCHIARICO[2], M. CAROPRESE[1], A. MUSCIO[1], A. SANTILLO[1], R. MARINO[1]

[1] Dipartimento SAFE, Università degli Studi di Foggia
[2] CRA - Istituto Sperimentale per la Zootecnia, Segezia - Foggia

Parole chiave: agnelli, acidi grassi, omega 3, tenerezza.

INTRODUZIONE - La composizione in acidi grassi gioca un ruolo rilevante nella definizione di una carne di qualità in quanto ne influenza le proprietà nutrizionali e le caratteristiche organolettiche, in particolare il flavour (Wood and Enser, 1997). Nella produzione di carne di agnello, più che nelle altre specie, ciascun paese o regione ha il proprio peso/età specifico e il proprio tipo di criterio sulla selezione delle carcasse, a seconda del proprio sistema di produzione, ma anche a seconda della cultura e delle abitudini della gente. Precedenti studi (Banskalieva, 1997; Santos-Silva et al., 2002) hanno evidenziato come l'effetto dell'età e del peso alla macellazione ha dato risultati molto variabili sul profilo lipidico della carne di agnello. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto della diversa età di macellazione (40 *vs* 75) sulla qualità nutrizionale ed organolettica nella carne di agnelli di razza Altamurana.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto su 24 agnelli di razza Altamurana mantenuti con le madri per tutto il periodo di prova e svezzati a circa 35 giorni. 12 agnelli sono stati macellati a 40 giorni e i restanti 12 a 75 giorni. Dopo 24h dalla macellazione da ciascuna carcassa è stato prelevato il muscolo *Longissimus dorsi* per la determinazione del profilo nutrizionale ed organolettico. Il profilo acidico è stato determinato mediante gas-cromatografia capillare impiegando un gas-cromatografo Agilent 6890N e una colonna capillare CP-Sil 88 (100 m x 0,25 mm, film 0,25 μ) dopo estrazione dei grassi con il metodo O'Fallon et al. (2007). I parametri colorimetrici sono stati determinati usando un colorimetro Minolta Chroma-meter CR 200. Il Warner Bratzler share force (WBSF) è stato determinato utilizzando un texturometro Instron 3343. Per l'analisi sensoriale ci si è avvalsi di un panel costituito da 10 giudici, precedentemente addestrati per valutare l'intensità di diversi attributi: dolce, acido, amaro, grasso, masticabilità, succosità, tenerezza, odore e flavour. I panelisti sono stati invitati a valutare i diversi attributi sulla base di una scala lineare, non strutturata (0: assenza della sensazione; 100: massima intensità della sensazione). Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza con procedura GLM (SAS, 2012).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'aumento dell'età di macellazione ha causato un incremento significativo (P<0,01) nelle carni della quantità totale di acidi grassi saturi (SFA) e una diminuzione (P>0,05) del contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFA) come si evidenzia dalla tabella 1. Inoltre, la carne degli agnelli più giovani ha mostrato un più alto contenuto di acidi grassi ω3 (P<0,05) rispetto alla carne di quelli macellati a 75 giorni di età. Ciò potrebbe essere correlato all'alimentazione di questi agnelli, quasi esclusivamente a base di latte materno, proveniente da pecore che andavano al pascolo. Infatti, è nota la predominanza dell'acido linolenico (C18:3ω3), precursore degli acidi grassi ω3, nel profilo acidico di molte delle essenze vegetali pabulate, in tal modo gli agnelli macellati a 40 giorni hanno potuto beneficiare quasi esclusivamente di un latte naturalmente arricchito di ω3. Infine, la carne degli agnelli macellati a 40 giorni ha mostrato, anche, un minore indice trombogenico (P<0,05) confermandone, quindi, il migliore profilo dietetico nutrizionale. Il profilo sensoriale, illustrato nella figura 1, ha messo in evidenza che la carne degli agnelli macellati a 40 giorni è risultata più tenera, più masticabile (P<0,01) e con minor aroma di grasso (P<0,05) rispetto alla carne degli agnelli macellati a 75 giorni che, invece, è risultata più succosa (P<0,001). Mentre l'aumento dell'età di macellazione non ha fatto percepire differenze di flavour nelle diverse carni. I risultati del WBSF non hanno evidenziato differenze significative tra le carni provenienti dalle diverse età di macellazione, invece, con l'aumentare dell'età di macellazione, la carne è risultata più scura e ha mostrato un minor indice del giallo (dati non mostrati). Pertanto è possibile affermare che la macellazione degli agnelli in età precoce potrebbe essere utile agli allevatori, in quanto da una parte potrebbero sfruttare il latte materno per la produzione di formaggio e dall'altra otterrebbero una carne con una migliore qualità dietetico-nutrizionale.

Tab.1 - Effetto della diversa età di macellazione (40 *vs* 75 giorni) sul profilo acidico della carne di agnelli di razza Altamurana(medie ± SEM).

	Età (d)			Effetto,P
	40	75	SEM	
SFA	44,79	50,47	1,22	**
MUFA	36,98	35,11	0,62	NS
PUFA	17,92	14,72	0,98	*
ω6	13,81	11,93	0,68	NS
ω3	4,11	2,80	0,36	*
AI	0,96	1,21	0,11	NS
TI	1,11	1,49	0,11	*

NS = non significativo; * = P< 0.05; **= P< 0.01.

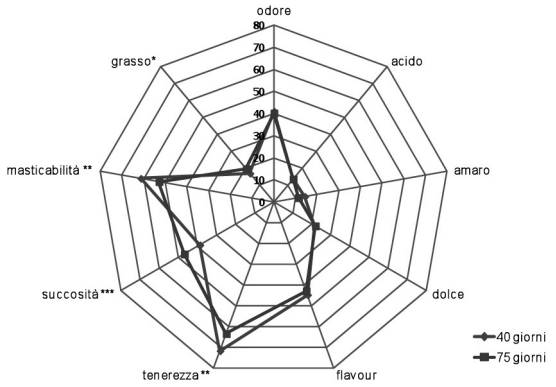


Figura 1 - Profilo sensoriale della carne di agnelli di razza Altamurana macellati a 40 e 75 giorni di età.

Relationship between slaughtering age, nutritional and organoleptic properties in meat from lambs of Altamurana breed

Key words: lambs, fatty acids, omega 3, tenderness.

Bibliografia

Banskalieva, V. (1997). Effect of age, physiological state and nutrition on fatty acid composition in depot fat and ruminal volatile fatty acids in sheep. Small Rumin. Res. 24, 37-42.

O'Fallon J.V., Busboom, J.R., Nelson, M.L., Gaskins, C.T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. J. Anim. Sci, 85, 1511-1521.

Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B., Santos-Silva, F., (2002). Effect of geno- type, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. Livest. Prod. Sci. 77, 187-194.

SAS (2012). SAS/STAT User's Guide (Version 8.1). Statistical Analysis System Inst, Cary, NC.

Wood, J. D., and M. Enser (1997). Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. Br. J. Nutr. 78(Suppl1): S49-S60.

Health management of ewes during pregnancy

G.C. FTHENAKIS[1], G. ARSENOS[2], C. BROZOS[1], I.A. FRAGKOU[3], N.D. GIADINIS[2], I. GIANNENAS[2], V.S. MAVROGIANNI[1], E. PAPADOPOULOS[2], I. VALASI[1]

[1] Veterinary Faculty, University of Thessaly, Karditsa, Greece
[2] School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece
[3] Greek Agricultural Organization DIMITRA, Athens, Greece

Key words: anthelmintic treatments, pregnancy diagnosis, sheep, vaccinations.

The objectives of health management of ewes during pregnancy are as follows: i) successful completion of pregnancy at term, ii) birth of healthy and viable lambs, with optimal birth and potential weaning bodyweight, iii) optimum milk production during the subsequent lactation and iv) improved management in relation to drug residues in animal products.
Knowledge of the physiological background of pregnancy in ewes: changes, mechanisms and interactions, during pregnancy is important for the overall health management of ewes during pregnancy. Health management of pregnant ewes includes diagnosis of pregnancy and evaluation of the number of foetuses borne, which will support strategies for subsequent management of the flock. Nutritional management of ewes depends upon the stage of lactation and specifically aims to: i) prevention of pregnancy toxaemia and other metabolic diseases during the *peri-partum* period, ii) formation of colostrum in appropriate quantity and quality, iii) production of lambs with normal future birth bodyweight and iv) support of increased milk yield during the subsequent lactation. At the end of lactation, udder management of pregnant ewes includes its clinical examination, culling of ewes considered unsuitable for lactation and, possibly, the intramammary administration of antibiotics; objectives of that procedure are: i) to cure infections which have occurred during the previous lactation and ii) to prevent development of new mammary infection during the dry period. Management of abortions includes the correct and timely diagnosis of the causative agent of the disorder, as well as the strategic administrations of chemotherapeutic agents, aiming to prevent abortions in flocks with confirmed infection with an abortifacient agent, especially if no appropriate vaccinations had been carried out before the mating season. During the final stage of pregnancy, health management of ewes includes administration of appropriate anthelmintic drugs, aiming to eliminate gastrointestinal helminthes (thus, increasing production output of ewes) and preventing the built-up of parasitic burdens in the environment (thus, reducing infection of lambs during their neonatal period). Vaccinations of pregnant ewes aim to protect these animals, as well as their offspring, especially against diseases which are a frequent cause of neonatal mortality (e.g., clostridial infections).
Health management also aims to prevent the main metabolic disorders of pregnant ewes (i.e., pregnancy toxaemia and hypocalcaemia), as well as to monitor flocks for development of these disorders. Health management of pregnant ewes is completed with application of husbandry practices before the start of the lambing season. Finally, in some cases, health management may include induction and synchronisation of lambings, which is a management or therapeutic procedure. The presentation provides a detailed account of health management of pregnant ewes, which is a multi-faceted, very significant task for successful management of the flock within the annual production cycle. Also, it provides guidelines for health management of pregnant ewes around the world. Fine-tuning of the procedures will need to be carried out in individual flocks, after taking into account their specific requirements.

Dinamica dell'infestazione da *Przhevalskiana silenus* (Diptera: Oestridae) in caprini della provincia di Messina

G. GAGLIO[1], M.C. FERRARA[2], L. FALSONE[1], E. NAPOLI[1], C. BARTOLONE[4], A. SCALA[3], S. GIANNETTO[1]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina
[2] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari
[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale "A. Mirri", sezione di Barcellona Pozzo di Gotto (ME)
[4] ASP 5 Messina

Parole chiave: capra, miasi cutanea, *Przhevalskiana silenus.*

INTRODUZIONE - La miasi sottocutanea dei caprini è una infestazione causata da larve di *Przhevalskiana silenus* Brauer, 1858 (Diptera, Oestridae) e caratterizzata dalla presenza di noduli sottocutanei sul dorso e sui fianchi degli animali. Questa parassitosi, diffusa nelle aree tropicali e sub-tropicali di molti paesi asiatici ed europei (Giangaspero e Lia, 1997), è causa di notevoli danni economici all'allevamento caprino (Liakos, 1986; Scala *et al.*, 1999). Gli studi effettuati in Italia su *P.silenus* riguardano soprattutto la tassonomia, la biologia e la diagnosi (Tassi *et al.*, 1986; Otranto e Puccini, 2000; Faliero *et al.*, 2001). Scopo del presente lavoro è stato quello di effettuare uno studio sulla dinamica dell'infestazione da *P. silenus* in caprini allevati nella provincia di Messina al fine di definire appropriate strategie di controllo.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto presso il mattatoio Carpelli (Barcellona P.G., ME). Da gennaio 2011 a dicembre 2012 sono state ispezionate, dopo lo scuoiamento, carcasse caprine provenienti da varie aziende presenti in provincia di Messina per la ricerca di larve di *P. silenus.* Le larve, una volta isolate e misurate, sono state fissate in alcool a 70°C e classificate secondo le chiavi morfometriche proposte da Zumpt (1965). I dati individuali e aziendali di ciascun animale ispezionato, congiuntamente con il numero e lo stadio delle eventuali larve rinvenute, sono stati registrati su un foglio di calcolo elettronico per le successive analisi statistiche. In particolare sono state ispezionate per *P. silenus* un totale di 580 carcasse (304 nel 2011 e 276 nel 2012) provenienti da 48 aziende localizzate in 22 comuni della provincia di Messina. I capi esaminati avevano un'età compresa tra 1 e 13 anni con un'età media di 4,5 anni.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Delle 580 carcasse, 285 (49,1%) erano infestate da *P. silenus*. la parassitosi è stata rilevata in 42 delle 48 aziende campionate (87,5%). Tra gli animali infestati, 86 capre albergavano larve di I stadio (L1), 75 larve di secondo stadio (L2); 77 larve di III stadio (L3) mentre in 52 carcasse sono stati rinvenuti noduli contenenti materiale necrotico, misto a residui larvali non stadiabili. Fra questi ultimi soggetti, in 4 erano riconoscibili larve L1. In totale sono state isolate e stadiate 1209 larve (385 L1, 394 L2 e 430 L3). Relativamente alle classi di età, la più alta frequenza di infestazione, 70/120 (58,3%), è stata registrata negli animali giovani (1-3 anni, classe 1), minori le prevalenze osservate nelle altre classi d'età: 109/249 (43,8%) negli animali compresi tra 4-6 anni (classe 2); e 106/211 (50,2%) in quelli con età superiore a 6 anni (classe 3). Tuttavia, l'analisi delle frequenze d'infestazione per classi di età ha restituito valori significativi solo tra classe 1 e classe 2 ($p = 0{,}012$). Nei 2 anni di studio le L1 sono state rinvenute in maggior numero nel mese di agosto, le L2 nel mese di dicembre e le L3 a marzo. Questo studio rappresenta la prima indagine sulla dinamica dell'infestazione da *P. silenus* in caprini allevati nella provincia di Messina. I dati di prevalenza ottenuti, sia per capo (49,1%) sia a livello di azienda (87,5%), suggeriscono un'ampia diffusione della parassitosi nella provincia investigata e sono simili a quanto già riportato per altre aree dell'Italia meridionale e insulare (Pugliese e Zanchi, 1984; Niutta *et al.*, 1994; Giangaspero e Lia, 1997; Scala *et al.*, 1999). Sebbene nella presente indagine sia stata osservata una maggiore frequenza d'infestazione negli animali giovani (58,3%), gli elevati livelli di prevalenza osservati anche nelle altre due classi (43,8% e 50,2%) suggeriscono un limitato controllo dell'infestazione al crescere dell'età. La dinamica stagionale di infestazione evidenzia una maggiore presenza di L1 nel mese di agosto, dato che ci permette di individuare il periodo ideale per trattamenti antiparassitari mirati. Sulla base dei risultati ottenuti si può affermare che l'infestazione da *P. silenus* è molto diffusa nel territorio messinese dove ai fattori favorenti, come quelli climatici, si somma la scarsa conoscenza da parte di allevatori e addetti ai lavori delle modalità di trasmissione di questa parassitosi capace di incidere negativamente sulle produzioni zootecniche. Consideriamo questa nostra esperienza un valido contributo per un intervento di lotta razionale nei confronti della parassitosi consigliando nell'area di studio la somministrazione di farmaci antiparassitari come ad esempio i lattoni macrociclici (Yadav *et al.*, 2014) in autunno, quando terminato il periodo di ovodeposizione, sono presenti le L1, prevenendo così il danno ben più grave creato dai successivi stadi di sviluppo.

Dynamics of *Przhevalskiana Silenus* (diptera: oestridae) infestation in goats in Messina Province (Italy)

Key words: goat, skin myiasis, *Przhevalskiana silenus.*

Bibliografia

Faliero S.M., Otranto D., Traversa D., Giangaspero A., Santagada G., Lia R., Puccini V. (2001), Goat warble fly infestation by Przhevalskiana silenus (Diptera: Oestridae): immunoepidemiologic survey in the Basilicata region (southern Italy). Parassitologia 43: 131-134.

Giangaspero A., Lia R. (1997), Mapping goat warble fly distribution and related problems. Parassitologia, 39: 423-426.

Liakos B.D. (1986), Consequences of hypodermosis to the body weight of young goat. Bull. Hell Vet Soc 37: 8-12.

Niutta P.P., Pugliese A., Giannetto S., Catarsini O. (1994), Ipodermosi da Przhevalskiana silenus nei caprini della Calabria. Atti XI Congresso SIPAOC, Perugia: 303-306.

Otranto D, Puccini V. (2000), Further evidence on the internal life cycle of Przhevalskiana silenus (Diptera, Oestridae). Vet Parasitol 88: 321-328.

Pugliese A., Zanchi R. (1984), L'ipodermosi della capra. Il Vergaro 84,: 4-8.

Scala A., Otrando D., Pintori, A., Falchi, B., Espa, A., (1999), Goatwarble fly infestation in Italy: a report in Sardinia. Proceeding Congr. Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Santarem, Portugal: 458-460.

Tassi P., Giangaspero A., Mattiucci S., Nascetti G., Puccini V. (1986), Sulla sistematica di Przhevalskiana silenus spp.: Morfologia e tassonomia biochimica. Parassitologia 28: 369-370.

Yadav A., Katoch R., Godara R., Sood S., Katoch M., Ahamed I. (2014), Field efficacy of minidosed pour-on ivermectin and eprinomectin against goat warble fly infestation by Przhevalskiana silenus. Trop Anim Health Prod.46: 537-539.

Zumpt F. (1965), Myiasis in Man and Animal in the Old World. Butterworths, London.

Casi di mastite da *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in allevamenti caprini siciliani

L. GALUPPO, M.C. EMANULE, M.F. PERSICHETTI, D. GAMBINO, G. CARACAPPA, R.C. LELLI

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

Parole chiave: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, latte, capre, mastite

INTRODUZIONE - L'allevamento caprino rappresenta in Sicilia un'importante risorsa dal punto di vista zootecnico ed economico grazie alla produzione di latte e suoi derivati. Il latte di capra, apprezzato per la sua elevata digeribilità rispetto al latte vaccino e per il suo valore nutritivo, risulta ideale come fonte nutrizionale per neonati e bambini; tuttavia viene anche usato come alimento medicinale. In Sicilia, il settore caprino è rappresentato prioritariamente da razze a prevalente attitudine per il latte: la derivata di Siria, la Maltese, l'Argentata dell'Etna e l'Indigena. La quantità di latte prodotto e le percentuali delle varie componenti nutrizionali presenti in esso variano secondo la razza e l'alimentazione ma soprattutto in relazione allo stato di benessere dell'animale. La maggior parte delle infezioni mammarie è da attribuirsi alle classiche infezioni sostenute da agenti mastidogeni che si sono via via ridotte grazie all'adozione di appropriati protocolli terapeutici e di profilassi immunizzante. Tuttavia altre sono state associate ai principali microrganismi opportunisti ambientali che invece sono in continua crescita. Di solito le forme subcliniche sono subdole, si ha difficoltà nell'identificarle e spesso non si riesce ad intervenire se non quando i controlli qualitativi del latte mettono in evidenza delle anomalie e la necessità di un intervento sanitario. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* è un cocco gram positivo β-emolitico, commensale delle vie respiratorie superiori, della pelle e del tratto urogenitale del cavallo ed è responsabile di malattia sia negli animali che nell'uomo. Nell'uomo, infezioni causate da *S. zooepidemicus* rappresentano un evento raro, con conseguente meningite, batteriemia, nefrite acuta, artrite settica, polmonite, e in alcuni casi, morte. Negli animali il controllo e la prevenzione passano attraverso interventi igienico-sanitari e terapeutici. A tal fine è stata messa a punto una preparazione sperimentale di vaccino stabulogeno con un ceppo di *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolato da latte di capra con la finalità di limitare l'uso dei farmaci e, contemporaneamente, di arginare le forme patologiche.

MATERIALI E METODI - La ricerca di *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* è stata effettuata presso i nostri laboratori. I campioni di latte, prelevati sterilmente e pervenuti in laboratorio a temperatura controllata (+ 4°C), sono stati sottoposti ad esame batteriologico per la ricerca di agenti mastidogeni. Per ogni campione è stata eseguita oltre alla normale semina, anche una semina su agar sangue (5% sangue defibrinato di montone) per ricercare la presenza di ceppi di *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Dopo 24 h di incubazione a 37°C in presenza del 5% di CO_2, le colonie si presentavano mucose, trasparenti e β-emolitiche. L'identificazione degli isolati è stata effettuata tramite morfologia della colonia, colorazione di Gram (2), test biochimici-enzimatici (catalasi e ossidasi) e infine gallerie API® (bioMérieux API). Una volta tipizzato il ceppo, sono state testate diverse molecole *"in vitro"* con la metodica della diffusione in agar (Kirby-Bauer) tra cui Marbofloxacina, Tilosina, Tiamfenicolo, Ceftiofur, Ampicillina, Amoxicillina + Ac. Clavulanico, Cefapirina, Enrofloxacina al fine di mettere in atto una terapia mirata nei capi con infezione in corso. Inoltre, i ceppi in questione sono stati utilizzati per la preparazione di un vaccino sperimentale.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Nel 2013 sono stati individuati tre focolai di mastite clinica dovuta all'agente patogeno zoonosico *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* in tre allevamenti di capre delle zone montuose della catena dell'Appennino tirrenico siciliano dove non tutti i capi affetti mostravano segni clinici di mastite. L'esame batteriologico è stato eseguito su campioni di latte e tamponi vaginali prelevati da capre con e senza sintomatologia in atto. I ceppi sono stati isolati da entrambe le matrici nel caso di sintomatologia in atto mentre solo dal latte nei capi senza sintomatologia clinica. L'impiego di antibiotici appropriati come profilassi della malattia e l'uso del vaccino come prevenzione hanno impedito la diffusione dell'infezione ad altri animali e all'uomo, ma soprattutto hanno evitato l'abbattimento dei capi infetti. Questo studio suggerisce come un piano di controllo possa essere utile per risanare gli allevamenti dalle infezioni mammarie intervenendo sul miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie, sulle modalità di mungitura e quindi sulla carica microbiologica iniziale. Inoltre, questo monitoraggio permette di individuare la presenza di ceppi zoonotici in campioni di origine animale. Attualmente si pensa che l'isolamento degli Streptococchi sia condizionato dall'utilizzo della mungitura meccanica e/o dalla coabitazione di capre con altre specie animali (equidi) considerate portatrici sane di *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*. Esistono in letteratura poche segnalazioni sull'isolamento di questo patogeno come agente eziologico di mastite nelle capre, malgrado l'evidente capacità di questo batterio di causare forme di infezioni responsabili di rilevanti danni economici al comparto lattiero-caseario oltre che alla salute dell'Uomo.

Tabella 1 - Sensibilità agli antibiotici testati (n.3 ceppi).

ANTIBIOTICO	Ceppo 1	Ceppi 2	Ceppo 3
Marbofloxacina	I	I	S
Tylosina	S	S	S
Tiamphenicolo	I	S	S
Ceftiofur	S	S	S
Ampicillina	S	S	S
Amox+Ac. Clavul.	S	S	S
Cefapirina	S	S	S
Enrofloxacina	I	I	I

Sensibilità: I: intermedia, S: sensibile.

Cases of mastitis by *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* goat farms in Sicily

Key words: *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus,* milk, goats, mastitis.

Bibliografia

Abbott Y., Acke E., Khan S., Markey B.K., Leonard F.C., Muldoon E.G., Pinilla, M., Steward K. and Waller A. (2010), Zoonotic transmission of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus from a dog to a handler. 18 Journal of Medical Microbiology (59):120-123.

Locatelli C., Moroni P., Pisoni G., Vimercati C., Zadoks R.N., Zanoni M.G. (2009), Epidemiological investigation of Streptococcus equi subspecies zooepidemicus involved in clinical mastitis in dairy goats. J. Dairy sci (92): 943-951.

Silanikove N., Leitner G., Merin U., Prosser C.G. (2010), Recent avances in exploting goat's milk: quality, safety and production aspect. Small ruminant research (89):110-124.

CLSI 2008 - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-third edition. CLSI Document M31-A3, Wayne, Pennsylvania, USA.

Studio di sieroprevalenza di *Neospora caninum* in aziende ovicaprine in Lombardia

A.L. GAZZONIS[1], S.A. ZANZANI[1], G. ALVAREZ-GARCIA[2], L. ORTEGA-MORA[2], M.T. MANFREDI[1]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano
[2] SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Spain

Parole chiave - *Neospora caninum*, ovicaprini, sieroprevalenza, ELISA.

INTRODUZIONE - *Neospora caninum* (Apicomplexa, Sarcocystidae) è riconosciuto in tutto il mondo come una delle principali cause di aborto nel bovino. Scarsi invece sono i dati disponibili riguardo la neosporosi negli ovicaprini e ancora sconosciuto rimane il ruolo di *N. caninum* come patogeno in queste specie (Dubey & Schares, 2011). Masala *et al.* (2007) confermano *N. caninum* come responsabile di aborti sia negli ovini (2%) che nelle capre (8,6%), indicando la possibilità di trasmissione transplacentare in entrambe le specie. Secondo recenti studi epidemiologici condotti in Europa, le sieroprevalenze variano dal 2,3% al 6,9% nelle capre e dal 3% al 16,8% negli ovini (Diakou *et al*., 2013; Iovu *et al*., 2011; Spilovska *et al*., 2009).

MATERIALI E METODI - L'area di studio selezionata comprende i territori a maggior vocazione ovicaprina in Lombardia: le province di Milano, Varese e Bergamo. Le aree e le aziende sono state selezionate allo scopo di rappresentare la massima diversità in termini di management. Tra ottobre 2012 e maggio 2013, sono stati prelevati campioni ematici da 428 pecore e 414 capre provenienti da 39 aziende. I campioni sono stati processati con metodica ELISA-in house seguendo il protocollo descritto da Aguado-Martinez (2008). Successivamente, per la conferma delle positività registrate, i campioni positivi sono stati sottoposti a test Western Blot secondo Alvarez-Garcia *et al.* (2002).

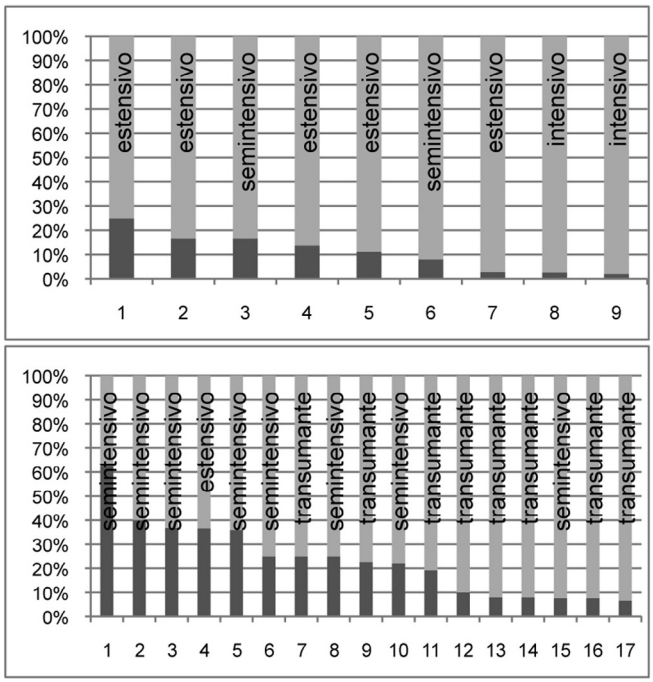


Figura 1 - Proporzione dei capi sieropositivi (nero) e sieronegativi (grigio) a *N. caninum* nell'aziende di capre (sopra) e ovini (sotto).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Secondo i risultati forniti dal test ELISA, anticorpi a *N. caninum* sono stati riscontrati in 25 aziende caprine su 28 campionate (89,2%; 77,7-100%, 95% CI), mentre tutte le 19 aziende di ovini presentavano almeno un animale sieropositivo. A livello individuale, sono risultati positivi il 57,4% delle capre (238/414; 52,6-62,1%, 95% CI) e il 59,5% degli ovini (255/428; 54,8-64,1%, 95% CI). Tuttavia, considerando i risultati ottenuti con la metodica Western Blot, i risultati di sieroprevalenza sono diminuiti: solo 9 aziende caprine (32,1%; 14,8-49,3% 95% CI) e 17 aziende ovine (89,4%; 75,5-100% 95% CI) sono confermate positive, con 24 capre (5,7%; 3,5-8%, 95% CI) e 83 ovini (19,3%; 15,5-23%, 95% CI) sieropositivi. È interessante notare come sia per le capre sia per gli ovini le prevalenze intra-aziendali maggiori siano state registrate in allevamenti estensivi o semintensivi (Fig. 1). Tuttavia, anche le aziende intensive caprine e i greggi transumanti appaiono a rischio di contrarre l'infezione. Fattori di rischio legati al management aziendale devono essere perciò indagati e considerati. I risultati di sieroprevalenza ottenuti sono concordanti con i dati riportati in letteratura. I test sierologici, utilizzati in combinazione, permettono di aumentare l'efficienza dei test in termini di sensibilità e specificità. Il monitoraggio sierologico aziendale si rivela pertanto un valido strumento per indagare la neosporosi negli ovicaprini, soprattutto in aziende che riportano problemi di fertilità.

Seroprevalence of *Neospora Caninum* in small ruminants in Lombardy

Key words: *Neospora caninum*, small ruminant, seroprevalence.

Bibliografia

Aguado-Martinez A., Alvarez-Garcia G., Fernandez-Garcia A., Risco-Castillo V., Arnaiz-Seco I., Rebordosa-Trigueros X., Navarro-Lozano V., Ortega-Mora L.M. (2008), Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. Vet Parasitol 157:182-195.

Alvarez-Garcia G., Pereira-Bueno J., Gómez-Bautista M., Ortega-Mora L.M. (2002), Pattern of recognition of Neospora caninum tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted foetuses. Vet Parasitol 107:15-27.

Diakou A., Papadopoulos E., Panousis N., Karatzias C., Giadinis N. (2013), Toxoplasma gondii and Neospora caninum seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. Vet Parasitol 198:387-390.

Dubey J.P & Schares G. (2011), Neosporosis in animals—The last five years. Vet Parasit 180:90-108.

Iovu A., Györke A., Mircean V., Gavrea R., Cozma V. (2012), Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in dairy goats from Romania. Vet Parasitol 186:470-474.

Masala G., Porcu R., Daga C., Denti S., Canu G., Patta C., Tola S. (2007), Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. J Vet Diagn Invest 19: 96-98.

Spilovska S., Reiterová K., Kovacová D., Bobáková M., Dubinsky P. (2009), The first finding of Neospora caninum and the occurrence of other abortifacient agents in sheep in Slovakia. Vet Parasitol 164:320-323.

Trasferimento di aflatossina M_1 dal latte al formaggio ovino

G. GIANGOLINI, C. BOSELLI, F. FILIPPETTI, A. PROIETTI, R. BICOCCHI, S. AMATISTE

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 (C.Re.L.D.O.C.)

Parole chiave: aflatossina M_1, ovini, latte, formaggio.

INTRODUZIONE - L'aflatossina M_1 (AFM_1) può essere presente nel latte in seguito all'ingestione di aflatossina B1 (AFB_1) presente negli alimenti contaminati con AFB_1. Il limite di legge dell'AFM_1 nel latte è di 0.05 µg/Kg (Regolamento UE n.165/2010). La presenza di AFM_1 nei formaggi dipende dalla concentrazione di AFM_1 nel latte. Studi sul latte bovino hanno messo in evidenza che AFM_1 è legata alla frazione proteica ed in particolare alla caseina (Brackett e Marth, 1982). In seguito alla caseificazione la concentrazione di AFM_1 nel formaggio può risultare in media anche 3-5 volte più alta rispetto al latte di partenza. Pochi studi sono disponibili sul passaggio di AFM_1 dal latte al formaggio ovino e caprino. In attesa di specifiche norme, che potranno regolamentare più accuratamente il livello massimo tollerabile di AFM_1 nelle diverse tipologie di formaggio, il Ministero della Salute con parere del Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare n.13 del 10/06/2013, raccomanda l'adozione in via provvisoria dei seguenti coefficienti di concentrazione: 3.0 per i formaggi a pasta tenera e prodotti dal siero; 5.5 per i formaggi a pasta dura (D.M. 31 luglio, 2003).

MATERIALI E METODI - 5 pecore di razza Comisana sono state alimentate con una razione naturalmente contaminata con AFB_1 (60 µg/pecore/die) per 6 giorni e controllate per altri 4 giorni. Il latte prodotto da ogni pecora nelle due mungiture manuali giornaliere è stato miscelato e caseificato. Le prove di caseificazione sono iniziate dal 2° giorno post trattamento fino all'8° giorno. In totale sono stati ottenuti 35 formaggi (5 per ogni giorno). Il latte è stato riscaldato alla temperatura di 37°C e aggiunto caglio liquido standardizzato con titolo 1:15.000 all'80% di chimosina. Il coagulo è stato rotto mediante un piccolo spino fino a chicco di riso. È stato poi raccolto in fiscelle ed eseguita una piccola pressione per favorire l'eliminazione del siero. Le forme ottenute sono state lasciate spurgare a temperatura ambiente per 12 ore. È stata determinata l'umidità dei formaggi mediante tecnica NIT (FoodScan - Foss Electric). Sono state poi congelate a –20°C fino al momento dell'analisi. L'estrazione di AFM_1 è stata eseguita nel latte e nei formaggi mediante colonne di immunoaffinità eluite successivamente con metanolo. La concentrazione è stata determinata mediante HPLC con rivelatore fluorimetrico.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Il Carry Over di AFM_1, calcolato durante il periodo di plateau è stato di 0,72% (Range 0,55% - 1,07%). La concentrazione media di AFM_1 nei campioni di latte è risultata di 183 ng/Kg con un valore massimo di 639 ng/Kg riscontrato in fase di plateau (5°- 6° giorno) e minimo di 11 ng/Kg riscontrato dopo 2 giorni dall'ultima somministrazione di AFB_1 ed un valore. La produzione individuale media di latte è risultata di 637,1 ± 218,6 g/die. La concentrazione media di AFM_1 nel latte è risultata massima al 6° giorno di trattamento (Tab. 1). Il valore minimo di AFM_1 riscontrato nel formaggio è risultato di 21 ng/Kg mentre il valore massimo di 852 ng/Kg.

L'umidità media dei campioni di formaggio è risultata del 59% (min. 49%; max. 65%). La regressione tra la concentrazione di AFM_1 nel latte e nel formaggio mostra un $R^2 = 0,79$, sovrapponibile con il valore di $R^2 = 0,80$, riscontrato da Battacone et al., 2005 in uno studio condotto su 15 pecore a cui erano stati somministrati mangimi artificialmente contaminati con tre livelli di concentrazione. La concentrazione di AFM_1 nel formaggio è risultata in media superiore del 35% rispetto a quella del latte di partenza. Il fattore di concentrazione medio riscontrato è stato di 1,3. Tale fattore diminuisce rapidamente fino a valori di circa 100 ng/Kg nel latte. Considerando i valori di AFM_1 nel latte fino al limite di legge di 50 ng/Kg il fattore di concentrazione medio risulta 1,9, diminuisce ad 1,7 se consideriamo la concentrazione di AFM_1 nel latte fino a 100 ng/Kg mentre risulta 1,2 per valori superiori a 100 ng/Kg. Questo fa supporre, come evidenziato da Battacone et al., 2002 che all'aumentare della concentrazione di AFM_1 nel latte diminuisca la capacità della cagliata nel trattenere la tossina, probabilmente in relazione alla saturazione dei siti di legame con la caseina. La concentrazione di AFM_1 nel formaggio è legata anche al tipo di tecnologia utilizzata (Barbiroli et al., 2007) ed all'umidità del formaggio (Cavallarin et al., 2014). A.A. hanno riscontrato fattori di concentrazione nella produzione di formaggi freschi bovini che vanno da 1.4 a 2.2 mentre su un formaggio a pasta dura di 6,7 (Cavallarin et al., 2014), Battacone et al. (2005; 2002) su cagliata ovina ha riscontrato fattori di concentrazione da 1,8 a 2,9.

Tabella 1 - Concentrazione media di AFM_1 nel latte.

Giorni	2	3	4	5	6	7	8
%AFM_1 ng/kg	109	169	136	282	341	211	29

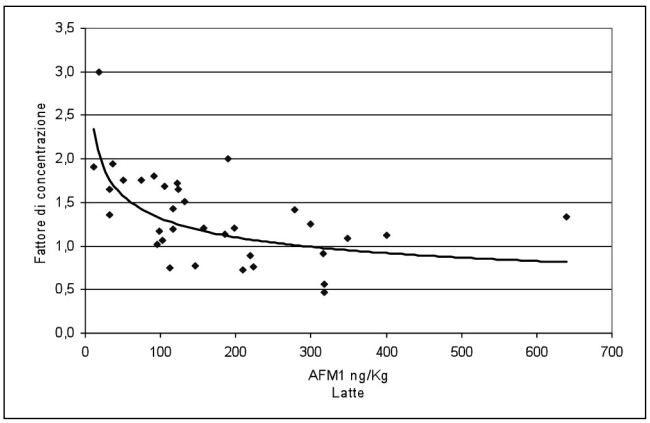


Figura 1 - Relazione tra il fattore di concentrazione ed il contenuto in AFM_1 nel latte.

Transfer of aflatoxin m1 from sheep milk to cheese

Key words: aflatoxin M_1, sheep, milk, cheese.

Bibliografia

Battacone G., Nudda A., Palomba M., Pascale M., Nicolussi P., Pulina G. (2005), Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. Journal of Dairy Science 88 (9).

Battacone G., Nudda A., Palomba M., Pulina G. (2002), Trasferimento di aflatossina dalla razione al latte e alla cagliata. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia 53 (4): 283-293.

Barbiroli A., Bonomi F., Benedetti S., Mannino S., Monti L., Cattaneo T., Iametti S. (2007), Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. Journal of Dairy Science 90: 532-540.

Brackett R.E., Marth E.H. (1982), Association of aflatoxin M1 with casein. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174: 439-441.

Cavallarin L., Antoniazzi S., Giaccone D., Tabacco E., Borreani G. (2014), Transfer of aflatoxin M1 from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods. Food Control 38: 174-177.

Ministero della Salute-Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare - Parere n. 13 del 10.06.2013, Applicabilità dei coefficienti di trasformazione in equivalente latte (All. 2, D.M. 31 luglio 2003 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali).

Regolamento UE n.165/2010 - Modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del regolamento (CE) n.1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

La situazione attuale del miglioramento genetico negli ovini da carne in Italia

E. LASAGNA[1], G. SLEITER[2], F.M. SARTI[1], F. PANELLA[1]

[1] Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali - Unità di Ricerca di Scienze Zootecniche - Università degli Studi di Perugia
[2] Associazione Nazionale della Pastorizia - Roma

Parole chiave: ovini da carne, conservazione, selezione.

IL PRESENTE - Gli ovini da carne italiani erano considerati quelli "che non è conveniente mungere"; nel passato, infatti, non è mai stata intrapresa un'azione selettiva indirizzata verso questa produzione. Tra questi tipi genetici ne esistono alcuni di scarsa consistenza, a rischio di estinzione e quindi iscritti ai RA, ma con produzioni tipiche: tra questi la Zerasca (951 capi) con l'agnello di zeri presidio Slow Food macellato a 70-90 giorni a un peso vivo di circa 20-30 kg, la Gentile di Puglia (3.532 capi) con la produzione dei mulacchi, agnelli macellati a 40 giorni e una volta trasportati durante la transumanza in ceste a dorso di mulo e da qui il nome, la Sopravissana (5.699 capi) con l'abbacchio, agnello anche questo macellato intorno ai 40 giorni e la Pomarancina (1.727 capi) con un agnello macellato a 25 kg di peso vivo.
Queste razze non sono soggette a miglioramento genetico, ma vengono conservate, nella loro tipicità, attraverso le loro produzioni. Esistono poi tipi genetici di buona consistenza, alcuni oggetto di tutela iscritti ai Libri Genealogici, su cui poter applicare metodologie selettive più avanzate: l'Appenninica (9.971 capi), la Bergamasca (12.042 capi), la Fabrianese (3.342 capi) e la Merinizzata italiana (27.260 capi) (www.assonapa.it). Al momento attuale, per queste razze, la selezione si basa essenzialmente su parametri fenotipici. Infatti, sia nei maschi che nelle femmine, viene effettuata una *valutazione morfologica* che si concretizza nell'attribuzione di giudizi da parte di esperti. Per quanto concerne più propriamente la selezione, una parte degli arieti viene valutata attraverso una prova di performance cui accedono agnelli scelti su base morfologica. La prova di performance viene condotta secondo una schema operativo, che prevede tre successive fasi di valutazione. Gli arieti al termine della prova di performance vengono qualificati da un punteggio che tiene conto degli incrementi ponderali conseguiti nelle tre fasi, secondo il seguente algoritmo: I = (1*IP1)+(2*IP2)+(0,5*IP3) in cui, I: indice dell'ariete; IP1, IP2, IP3: incrementi ponderali rispettivamente della prima, seconda e terza fase; 1, 2, 0,5: fattori di ponderazione rispettivamente del primo, secondo e terzo periodo che, come evidente, tendono ad enfatizzare le performance realizzate nel periodo di pascolamento, indicatore di rusticità. Nei vari cicli di PT sono stati valutati 2.017 soggetti appenninici, 563 bergamaschi, 1.156 fabrianesi e 2.186 merinizzati. Di questi soggetti si dispone di genealogia certa. *Per quanto riguarda i controlli funzionali questi si basano sul rilievo del peso ad età tipiche (nascita, 1 mese), tale attività trova però un serio ostacolo nell'elevato numero di pesi che gli addetti devono effettuare; un ulteriore problema è rappresentato dalle modalità di allevamento che porta spesso le greggi da controllare in zone difficilmente raggiungibili per buona parte dell'anno.* Ad oggi i controlli funzionali di cui si dispone (Tab. 1) peraltro ottenuti, molto spesso, su base fiduciale, non hanno alcuna utilizzazione ai fini del miglioramento genetico.
IL FUTURO - Sulle razze iscritte ai LG è possibile ipotizzare due tipi di selezione in base alle modalità di allevamento. Per la Bergamasca, razza per la quale è ancora diffuso il nomadismo, si potrebbe creare un nucleo genetico avanzato in cui concentrare il miglioramento genetico con la stima di indici BLUP-AM sia nei maschi che nelle femmine che diffonda geni positivi nella popolazione di base. Nelle altre tre razze, in cui è possibile un controllo degli animali iscritti, potrebbe essere condotto un PT in cui i soggetti vengano scelti su indici pedigree e di morfologia BLUP-AM; i caratteri oggetto di selezione possono essere sia quelli morfologici sia i pesi (dalla nascita a 9 mesi) o gli incrementi ponderali. In particolar modo, sull'Appenninica è stato condotto uno studio sulla stima dell'h^2 dei pesi durante il PT che ha permesso di evidenziare, tramite la tecnica dei Random Regressor, che la fine della prova potrebbe essere anticipata di circa due mesi rispetto all'attuale con notevole risparmio delle spese gestionali. Inoltre, di recente, si tende a sostituire la valutazione morfologica tradizionale con la *valutazione lineare*, il cui maggior pregio è costituito dall'oggettività. Attualmente questa viene applicata nella pratica alla sola razza Fabrianese ma, in tempi brevi, si presume verrà adottata anche da altri tipi genetici; nella Merinizzata italiana tale valutazione è già stata collaudata e potrebbe essere applicata. Va anche considerata con interesse la possibilità di utilizzare nella selezione tecniche innovative, quali lo studio dei marcatori molecolari o di polimorfismi SNPs in geni candidati; a tale proposito sono stati individuati 8 SNPs in altrettanti geni (GHR, GHRHR, IGF1, GDF8, MEG3, LEP,, MC1R, MYH1) associati a pesi ad età tipiche e relativi incrementi ponderali, indici di performance e valutazioni morfologiche. Per quanto concerne i controlli funzionali, caratteri diversi da quelli ponderali possono essere rilevati a basso costo anche dall'allevatore che danno una stima indiretta del peso; a tale scopo, nelle razze Appenninica e Merinizzata sono state stimate delle equazioni che consentono di ottenere il peso dalla misura della circonferenza toracica, già ampiamente collaudata in altre specie per superare problemi analoghi. Per le razze iscritte ai R.A. si continuerà ad effettuare la loro conservazione attraverso la valorizzazione dei prodotti tipici ed il mantenimento della variabilità genetica attraverso marcatori molecolari. A tal proposito è opportuno ricordare che, negli ultimi anni, anche nel settore ovino da carne, si sta affermando l'utilizzo di marcatori molecolari di ultima generazione (SNPs) con approcci di tipo Genome wide selection finalizzati allo studio della variabilità genetica e delle relazioni genetiche tra le razze allevate.

Tabella 1 - Controlli funzionali delle razze iscritte ai Libri genealogici.

Razza	Soggetti controllati
Appenninica	1687
Bergamasca	466
Fabrianese	1365
Merinizzata italiana	1586

The current situation of animal breeding in italian sheep meat

Key words: sheep meat, safeguard, selection.

Bibliografia

Ciani E., P. Crepaldi, L. Nicoloso, E. Lasagna, F. M. Sarti, B. Moioli, F. Napolitano, A. Carta, G. Usai, M. D'andrea, D. Marletta, R. Ciampolini, V. Riggio, M. Occidente, D. Matassino, D. Kompan, P. Modesto, N. Macciotta, P. Ajmone-Marsan, F. Pilla (2014). Genome-wide analysis of Italian sheep diversity reveals a strong geographic pattern and cryptic relationships between breeds. ANIMAL GENETICS, vol. 45, p. 256-266

Panella F., Sarti F. M., Lasagna E., Landi V., Ceccobelli S., Bianchi M., Murru S. (2011). Associazione tra SNPs e caratteri morfologici e produttivi nelle razze ovine italiane da carne In: Presentazione dei risultati del progetto SELMOL. Edizioni Polistampa, vol. III, p. 125-130.

Pieramati C., Lasagna E., Panella F., Piro F., Giontella A., Sarti F.M. (2011) Suitability of linear scoring in meat sheep: the practical case of Merinizzata Italiana breed. Ital J Anim Sci, 10, 51-53.

Sarti F.M., Castelli L., Bogani D., Panella F. (2003) The measurement of chest girth as an alternative to weight determination in the performance recording of meat sheep. Ital.J.Anim.Sci., 2, 123-129.

Effetto della stagione e dell'incremento della densità di allevamento in ovine in lattazione allevate a regime semi-estensivo

A. MAGGIOLINO, P. DE PALO, P. CENTODUCATI, A. TATEO

Università degli Studi di Bari "A. Moro", Dipartimento di Medicina Veterinaria, S.P. per Casamassima km 3, 70010, Valenzano (BA)

Parole chiave: pecore in lattazione, densità di allevamento, stagione.

INTRODUZIONE - Negli attuali sistemi di allevamento, gli animali vivono continuamente una competizione per le risorse, quali cibo, acqua, aree destinate al riposo o aree destinate al libero movimento. Per tal motivo, l'aumento degli spazi a loro destinati è genericamente considerato alla base del miglioramento delle condizioni di allevamento e del benessere degli animali stessi (Caroprese et al., 2009). Infatti, la densità di allevamento e le condizioni di stabulazione sono gli aspetti che principalmente possono inficiare il benessere.
L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di osservare gli effetti dell'aumento della densità di allevamento, per breve tempo, da un punto di vista etologico, produttivo e fisiologico, sia durante l'estate che l'inverno, al fine di ottenere maggiori informazioni utili al miglioramento dei sistemi di allevamento ovino, sia da un punto di vista produttivo che del benessere degli animali stessi.
MATERIALI E METODI - Per la prova sono state utilizzate 30 pecore in lattazione, suddivise in 2 gruppi. Un gruppo è stato testato durante la stagione estiva ed un gruppo durante la stagione invernale. Tutti i gruppi avevano accesso al pascolo durante le ore diurne, e durante le ore notturne erano stabulati in spazi coperti. Tutti avevano possibilità di accesso al paddock (2,5 m^2/capo) la cui superficie non ha subito variazioni durante tutta la prova sperimentale. La superficie indoor, invece, è stata variata settimanalmente. Le 3 densità testate sono state: bassa densità (1,5 m^2/capo; BD), media densità (1,0 m^2/capo, MD) ed alta densità (0,5 m^2/capo, AD). LA registrazione degli etogrammi è stata effettuata gli ultimi 2 giorni, dalle 20.00 alle 5.00, per un totale di 18 ore. Al settimo giorno sono stati raccolti i campioni di latte ed i campioni di sangue. Tutti i parametri, etologici, ematici e produttivi sono stati sottoposti ad analisi di varianza a due vie (ANOVA) secondo il metodo GLM del SAS (Sas, 1999). La stagione, la densità e l'interazione tra essi sono stati considerati come variabili indipendenti. Le stagioni sono state analizzate singolarmente, considerando come variabile indipendente solo la densità, applicando il test di Tuckey per misure ripetute.

Tabella 1 - Effetto della densità e della stagione sull'etogramma.

	BD[1]	MD[2]	AD[3]	ESM
Tempo (%): Estate				
Decubito	69,29^{A}	55,92^{B}	40,26^{C}	2,97
Stazione	24,27^{A}	39,28^{B}	56,53^{C}	2,23
Alimentazione	5,51^{A}	4,81^{A}	2,82^{B}	0,31
Paddock	0,00^{A}	31,01^{B}	95,27^{C}	2,73
Aggressività (n/h)	0,02	0,02	0.02	0,00
Tempo (%): Inverno				
Decubito	73,49^{A}	74,33^{A}	57,33^{B}	1,66
Stazione	15,15^{A}	14,67^{A}	28,17^{B}	1,87
Alimentazione	11,16	10,77	13,23	1,42
Paddock	0,00^{A}	0,00^{A}	2,32^{B}	0,12
Aggressività (n/h)	0,03^{a}	0,01^{a}	0,06^{b}	0,02

A lettere differenti sulla stessa linea corrispondono differenze statisticamente significative ($^{A, B, C}$: P < 0,01; $^{a, b}$: P < 0,05).
[1]Bassa densità; [2]Media densità; [3]Alta densità.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La densità di allevamento è in grado di influenzare il benessere animale, infatti è strettamente associate alla libertà di movimento (Hurnik e Lewis, 1991) e pertanto è in grado di influenzare il comportamento (Fregonesi e Leaver, 2002). I risultati riportati in Tabella 1 mostrano come, in entrambe le stagioni, con l'aumentare della densità di allevamento gli animali tendono a stare meno tempo in decubito e più tempo in piedi.
Ciò, in estate, si verifica già col passare dalla densità bassa alla media, in inverno, invece, si verifica solo nell'alta densità rispetto alle precedenti. Durante la stagione calda, inoltre, gli animali tendono ad utilizzare maggiormente il paddock. Viceversa, ciò non accade durante la stagione fredda. Ciò si ripercuote sulle interazioni di tipo aggressivo.
La riduzione degli spazi, infatti, tende afar si che le lotte gerarchiche si manifestino maggiormente (Fisher at al., 1997). Con l'utilizzo del paddock, invece, gli animali annullano gli effetti della riduzione degli spazi coperti a loro disposizione. Nessuna variazione è stata osservata sui parametri ematici e sui parametri produttivi indagati. Dai risultati ottenuti si evidenzia come, nel breve periodo, i parametri etologici risultino maggiormente sensibili ad una variazione di densità di allevamento rispetto ai parametri ematici e produttivi.

Effect of season and short time space allowance increasing in semi-extensively reared lactating ewes

Key words: lactating ewes, space allowance, season.

Bibliografia

Caroprese M., Annicchiarico G., Schena L., Muscio A., Migliore R., Sevi A. (2009), Influence of space allowance and housing conditions on the welfare, immune response and production performance of dairy ewes. Journal of Dairy Research 76: 66-73.

Fisher A.D., Crowe M.A., Kiely P.O., Enright W.J. (1997), Growth, behaviour, adrenal and immune response of finishing beef heifers housed on slatted floors at 1.5, 2.0, 2. 5 or 3.0 m2 space allowance. Livest. Prod. Sci. 51: 245-254.

Fregonesi J.A., Leaver D.J. (2002), Influence of space allowance and milk yield level on behavior, performance and health of dairy cows housed in strawyard and cubicle systems. Livestock Production Science 78: 245-257.

Hurnik J.F., Lewis N.J. (1991), Use of body surface area to set minimum space allowances for confined pigs and cattle. Canadian Journal of Animal Science 71: 577-580.

Comportamento alimentare di pecore da latte di razza Sarda e Nera di Arbus sottoposte a due sistemi di allevamento

C. MANCA, G.M. MARROSU, M. ACCIARO, M. SITZIA, M. DECANDIA

AGRIS Dipartimento per le Produzioni Animali, 07040 Olmedo, Sassari, Italia

Parole chiave: comportamento alimentare, Nera di Arbus, Sarda, pascolo, pecora Sarda

INTRODUZIONE - Lo studio del comportamento alimentare degli animali rappresenta un elemento fondamentale per una gestione razionale del pascolo e contemporaneamente per assicurare una buona copertura dei fabbisogni nutritivi. Considerando i molteplici fattori che lo possono influenzare, quali razza, stadio fisiologico, sistema di allevamento, regime alimentare, (Goetsch et al., 2009), l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto del genotipo e della stagione sul comportamento alimentare di pecore da latte di razza Sarda e Nera di Arbus sottoposte a diversi sistemi di allevamento.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto tra Luglio 2011 e Maggio 2013 presso l'azienda sperimentale "Monte Sant'Antonio" dell'Agris Sardegna. Il clima, tipicamente mediterraneo, è caratterizzato da estati calde e secche ed inverni miti e piovosi (T Max = 32.9°C, T min = 4.1°C, piovosità annua = 1000 mm). 32 ovini adulti da latte, omogenei per età, data di parto,, sono stati suddivisi in 2 gruppi costituiti da 8 pecore di razza Sarda (Sd) e 8 pecore di razza Nera di Arbus (NA) ciascuno che, per un periodo di 4 settimane a stagione, sono stati sottoposti a due differenti sistemi gestionali: Pascolo (P) e Stalla (St). Il gruppo P è stato gestito 24 h al pascolo e ha ricevuto un'integrazione media di fieno (0,27±0,04-0,49±0,04 kg/capo die) e concentrato (0,27±0,01- 0,44± 0,01 kg/capo die) in base ai fabbisogni degli animali ed alla disponibilità del pascolo. Il gruppo St, confinato senza alcun accesso all'esterno, è stato alimentato con fieno *ad libitum* (1,17±0,04 - 1,59±0,04 kg/capo die) e concentrato (0,40±0,01 - 0,44± 0,01 kg/ capo die). In entrambi gli anni, durante il periodo sperimentale di ciascuna stagione (estate, autunno, inverno e primavera) sono state effettuate delle osservazioni dirette del comportamento. Le osservazioni, condotte settimanalmente durante le ore di luce, sono state eseguite monitorando tutti gli animali del gruppo contemporaneamente ed indicando, ad intervalli di due minuti per ciascun genotipo il n° di animali coinvolti in ciascuna attività. Le attività, espresse come percentuale del tempo totale di osservazione, sono state distinte in: "pascolamento", se l'animale pascolava, "ingestione" se si alimentava alla mangiatoia con fieno o concentrato, "ruminazione", se ruminava e "riposo", nel caso in cui non fosse rilevata alcuna delle attività precedenti. Per il gruppo P è stato calcolato il tempo di "Ingestione Totale" come somma del tempo di pascolamento e del tempo di ingestione. I dati sono stati analizzati con la procedura GLM del SAS utilizzando la stagione (Sg), il genotipo (G) e la loro interazione come effetti fissi.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La stagione ha influenzato il comportamento alimentare delle pecore mentre il genotipo è risultato significativo solo nella tesi P (Tab. 1). In P la pecora Sarda ha mostrato un maggior tempo dedicato all'alimentazione, in particolare sono stati maggiori i tempi di Ingestione Totale della Sd (45±0,01 vs 42±0,01; P<0,05) e di riposo della NA, mentre non è stata rilevata alcuna differenza nel tempo di Pascolamento. Questo risultato potrebbe essere correlato alla maggiore produzione di latte e quindi alle maggiori esigenze della pecora di razza Sarda rispetto alla Nera di Arbus (873,5±20,12 vs 733,8±20,12 g/capo giorno). Nel confronto tra genotipi nella tesi St non sono stati registrati tempi differenti per nessuna delle attività considerate. La stagione ha influenzato il comportamento alimentare delle pecore di entrambi i sistemi di allevamento. Come atteso, nel gruppo allevato al pascolo, in entrambe i genotipi, la primavera è stata caratterizzata da un incremento dell'attività del pascolamento (47%±0,1) legata ad una maggiore disponibilità di erba in questa stagione, pari 6,77 ± 0,15 kg SS/capo die (Sitzia et al., 2014). I tempi di Ingestione sono stati maggiori durante l'inverno nella pecora Nera di Arbus (54±0,01) e nel corso sia dell'inverno (56±0,02) che dell'autunno (54±0,02) nella pecora Sarda. Nel gruppo St la maggior parte del tempo è stato speso in Ingestione, che ha raggiunto valori massimi in inverno e primavera. Questo andamento potrebbe essere dovuto allo stadio fisiologico degli animali (inizio lattazione) e alle loro maggiori esigenze di termoregolazione. La stagione influenza fortemente il comportamento degli animali a prescindere dalla razza e dal sistema di allevamento adottato. Negli animali allevati al pascolo la disponibilità di erba influenza il consumo di alimenti secchi. Razze più produttive, come la razza Sarda, dedicano più tempo all'ingestione essendo stimolate dalle maggiori esigenze energetiche rispetto ad animali meno produttivi, come il caso della Nera di Arbus.

Feeding behaviour of dairy sheep belonging to different genotypes sarda and nera di arbus, submitted to different livestock and feeding treatments estimated throughout different seasons

Key words: feeding behaviour, Nera di Arbus, grazing, Sarda sheep.

Bibliografia

Goetsch A. L., Gipson T. A., Askar A. R., Puchala R. (2009), Invited review: Feeding behavior of goats. J ANIM SCI, 88:361-373.

Sitzia M., Peana I., Marrosu GM., Manca C., Epifani G., Acciaro M., Decandia M. (2014), The role of grazed pasture in dairy Mediterranean sheep farming system. Communicazione orale Joint meeting of the "Mountain Pasture, Mediterranean Forage Resources and Mountain Cheese" networks. 24-26 Giugno -Clermont-Ferrand, Francia.

Tabella 1 - Comportamento degli animali (espresso come percentuale del tempo totale di osservazione) di pecore da latte di differenti genotipi (G) - Sarda and Nera di Arbus, alimentate al Pascolo e in Stalla nel corso delle diverse stagioni dell'anno (S). LSMeans±SE.

	Sarda				Nera di Arbus				Effetto		
	Estate	Autunno	Inverno	Primavera	Estate	Autunno	Inverno	Primavera	G	Sg	GxSg
Pascolo											
Pascolamento	13±0,02	39±0,02	39±0,02	47±0,02	12±0,02	37±0,02	36±0,02	47±0,02	0,15	***	ns
Ingestione	11±0,01	15±0,01	17±0,01	0,7±0,01	8±0,01	12±0,01	18±0,01	0,9±0,01	0,06	***	0,16
Ingestione totale	24±0,02	54±0,02	56±0,02	48±0,02	19±0,02	49±0,02	54±0,02	48±0,02	*	***	ns
Ruminazione	16±0,01	21±0,01	34±0,01	22±0,01	14±0,01	22±0,01	34±0,01	16±0,01	0,09	***	**
Riposo	60±0,01	25±0,01	10±0,01	30±0,01	67±0,01	29±0,01	11±0,01	36±0,01	***	***	ns
Stalla											
Ingestione	60±0,01	54±0,01	74±0,01	70±0,01	53±0,01	51±0,01	72±0,01	73±0,01	ns	***	ns
Ruminazione	13±0,01	21±0,01	17±0,01	21±0,01	17±0,01	19±0,01	19±0,01	19±0,01	ns	***	**
Riposo	25±0,01	23±0,01	8±0,01	7±0,01	25±0,01	28±0,01	8±0,01	7±0,01	ns	***	**

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Origine degli isolati di *Wohlfahrtia magnifica* in Italia

M. MARANGI[1], G. GAGLIO[2], P.D. READY[3], M.J.R. HALL[3], A. GIANGASPERO[1]

[1] Università di Foggia
[2] Università di Messina
[3] Natural History Museum, London, U.K.

Parole chiave: *Wohlfahrtia magnifica*, cyt b, filogenesi, Italia.

INTRODUZIONE - *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) è un ectoparassita obbligato le cui larve sono responsabili di una grave miasi traumatica. I principali ospiti sono gli ovini, ma l'insetto può infestare anche altre specie animali e talvolta l'uomo. *W. magnifica* è diffusa lungo la cosiddetta 'rotta euroasiatica' (Slingenbergh *et al.,* 2004) che dall'Europa si spinge verso la Turchia, l'Iraq e l'Iran, fino alle regioni più orientali della Cina. In Italia, la presenza di *W. magnifica* è stata ipotizzata fin dal 1994; tuttavia, solo recentemente, nel 2005, è stata confermata in alcune regioni dell'Italia centrale e meridionale (Giangaspero *et al*., 2011; Giangaspero *et al*., 2014). Recenti studi molecolari hanno documentato la presenza di due diversi 'ceppi genetici' di *W. magnifica*: un 'ceppo occidentale', presente in Spagna e in Marocco, e un'ceppo orientale', diffuso in Ungheria e in Grecia (Hall *et al*., 2009a). Nel corso di questi studi, un unico isolato proveniente dall'Italia è risultato appartenere al ceppo orientale (Hall *et al*., 2009b).
Con l'obiettivo di conoscere la provenienza geografica delle specie di *W. magnifica* che infestano gli ovini in Italia, esemplari di larve di *W. magnifica* raccolte da ovini infestati provenienti da allevamenti italiani, sono state caratterizzate geneticamente e gli isolati sono stati comparati filogeneticamente sia tra loro sia con sequenze omologhe provenienti da altri paesi europei.
MATERIALI E METODI - Venti larve di *W. magnifica* di II e III stadio, raccolte nel corso di precedenti studi epidemiologici sulla wohlfahrtiosi in allevamenti ovini (Giangaspero *et al*., 2011) della Sicilia, Lazio, Molise e da un ovino, recentemente ritrovato infestato in Puglia, sono state sottoposte individualmente all'estrazione del DNA. Un frammento di circa 715 bp del gene *cyt b* è stato sottoposto ad amplificazione, e il prodotto, una volta purificato, è stato sequenziato e allineato con dodici sequenze omologhe (aplotipi) disponibili in GenBank (Hall *et al*., 2009a). Ciascun allineamento è stato sottoposto ad analisi filogenetica mediante Neighbour Joining (NJ) e software v5.1 MEGA.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'albero filogenetico ottenuto con le sequenze italiane ha consentito di rilevare la presenza di tre gruppi geneticamente distinti, denominati1, 2 e 3 (Fig. 1).
La distanza genetica media tra i gruppi 1 e 2 è risultata pari a 0,036%, mentre le distanze genetiche medie tra il gruppo 1 e 3 e il gruppo 2 e 3, sono risultate, rispettivamente, pari a 0,017% e 0,023%. Dalle analisi filogenetiche ottenute comparando i dodici aplotipi provenienti dagli altri paesi è emerso che 4 isolati provenienti dal Lazio e Molise appartengono al 'ceppo orientale' e 16 provenienti dal Lazio, Molise, Sicilia e Puglia appartengono al 'ceppo occidentale'.
I risultati ottenuti dimostrano la presenza in Italia di due ceppi. L'identificazione del 'ceppo orientale' conferma i dati precedentemente ottenuti da Hall *et al.* (2009b) mentre il rilievo del 'ceppo occidentale' potrebbe essere correlato ad una recente introduzione, avvenuta mediante lo spostamento in volo degli insetti adulti o l'introduzione di animali infestati dalla Spagna e/o del Nord Africa. L'importazione di ovini in Italia dalla Spagna e da altri paesi dell'Unione Europea (ex PECO) è documentata in letteratura (http://www.assonapa.it); è possibile che soggetti con una infestazione occulta possano essere stati introdotti in Italia da questi paesi e dalle larve mature, dopo l'impupamento, siano sfarfallati individui che si sono dispersi nel territorio italiano.
Alla luce dei risultati ottenuti, si ritengono necessari sia indagini su larga scala sia studi genetici più approfonditi al fine di comprendere meglio la diversità genetica tra gli isolati e i fattori che contribuiscono alla diffusione e alla dispersione di questo importante parassita.

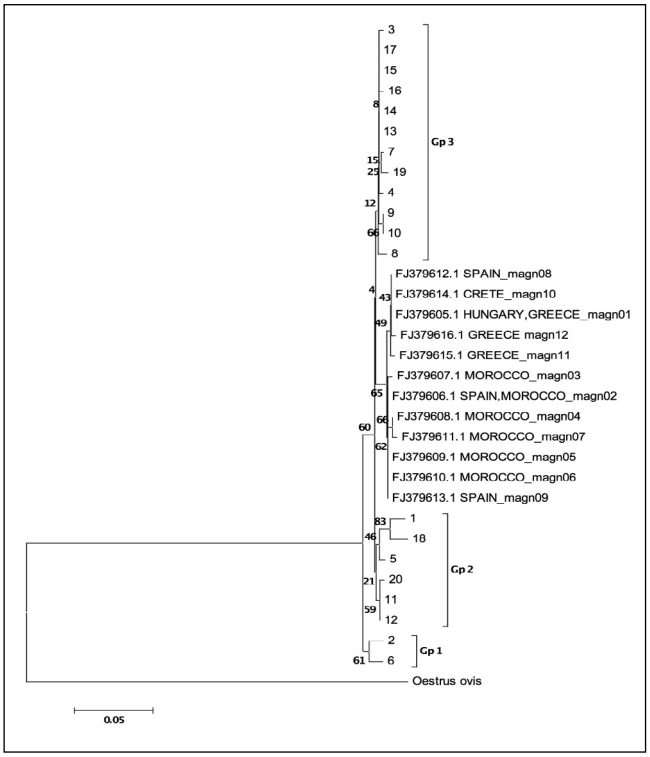


Figura 1 - Relazioni filogenetiche di *W. magnifica*. Venti sequenze provengono dal presente studio e 12 da sequenze di riferimento.

Origins of *Wohlfahrtia magnifica* isolates in Italy

Key words: *Wohlfahrtia magnifica*, cyt b, Italy, phylogeny.

Bibliografia

Giangaspero A, Brianti E, Traversa D, Hall MJR. (2014), A retrospective and geographical epidemiological survey of traumatic myiasis in southern Italy. Med Vet Entomol. doi: 10.1111/mve.12071.

Giangaspero A, Traversa D, Trentini R, Scala A, Otranto D. (2011), Traumatic myiasis by *Wohlfahrtia magnifica* in Italy. Vet Parasitol. 175:109-112.

Hall MJ, Adams ZJ, Wyatt NP, Testa JM, Edge W, Nikolausz M, Farkas R, Ready PD. (2009b), Morphological and mitochondrial DNA characters for identification and phylogenetic analysis of the myiasis-causing flesh fly *Wohlfahrtia magnifica* and its relatives, with a description of *Wohlfahrtia monegrosensis* sp. n. Wyatt & Hall. Med Vet Entomol. 1:59-71.

Hall MJ, Testa JM, Smith L, Adams ZJ, Khallaayoune K, Sotiraki S, Stefanakis A, Farkas R, Ready PD. (2009a), Molecular genetic analysis of populations of Wohlfahrt's wound myiasis fly, *Wohlfahrtia magnifica*, in outbreak populations from Greece and Morocco. Med Vet Entomol. 1:72-79.

Slingenbergh JI, Gilbert M, de Balogh KI, Wint W. (2004), Ecological sources of zoonotic diseases. Rev Sci Tech.23:467-484.

MiniFLOTAC technique: un nuovo approccio per la diagnosi di *Eimeria* spp. nelle capre

M.P. MAURELLI[1], L.M.R. SILVA[2], M.J.M. VILA-VICOSA[2], H.C.E. CORTES[2], A. BOSCO[1], P. PEPE[1], V. MUSELLA[3], G. CRINGOLI[1,4], L. RINALDI[1,4]

[1] Unità di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Regione Campania
[2] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Laboratorio di Parassitologia "Victor Caeiro", Università di Évora, Évora, Portogallo
[3] Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi "Magna Grecia" di Catanzaro, Catanzaro, Italia
[4] Centro Interdipartimentale di Ricerca in Parassitologia - CIRPAR

Parole chiave: *Eimeria* spp., capre, *MiniFLOTAC technique*, *Modified Mc Master Technique.*

INTRODUZIONE - Le infezioni da protozoi del genere *Eimeria* (eimeriosi/coccidiosi) sono notevolmente diffuse negli allevamenti di animali da reddito e nelle capre. Tutte le categorie di età sono suscettibili alle infezioni, i capretti, tuttavia sono particolarmente sensibili con perdita di peso, ritardato accrescimento e mortalità (Taylor e Catchpote, 1994). Per la notevole rilevanza della coccidiosi soprattutto negli allevamenti, intensivi, la diagnosi di laboratorio, sia per la messa in evidenza che per la conta delle oocisti (faecal egg count - FEC), necessita di metodiche precise ed accurate. La *MiniFLOTAC technique (MFT)*, che si avvale del MiniFLOTAC, nuovo apparato della famiglia FLOTAC, è una tecnica copromicroscopica molto sensibile, accurata, semplice, rapida ed economica, già validata per la diagnosi delle infezioni da elminti in cani, ovini e bovini (Cringoli *et al.*, 2013) e per la diagnosi di infezioni da elminti e protozoi nell'uomo (Barda *et al.*, 2013a,b; Barda *et al.*, 2014). Obiettivo di questo studio è stato quello di comparare la *MFT* con la tradizionale *Modified McMaster technique* (McT) per la diagnosi di *Eimeria* spp. nelle capre.

MATERIALI E METODI - La prova è stata effettuata utilizzando 16 campioni di feci prelevati da capre adulte in un allevamento intensivo nella provincia di Alentejo (Sud Portogallo). Da ogni campione, dopo accurata omogeneizzazione, sono state preparate aliquote di 2 g, utilizzate per comparare le due tecniche, la *MFT*: sensibilità 10 oocisti per grammo di feci (OPG) e la *McT* con due livelli di sensibilità: 50 OPG (lettura dei due reticoli del McMaster; volume di lettura = 0,3 ml) (*McT 0,3 mL*) e 15 OPG (lettura totale delle due camere; volume di lettura = 1 mL) (*McT 1mL*). Per entrambe le tecniche è stata utilizzata una soluzione flottante (SF) a base di sodio cloruro (peso specifico 1.200).
Per ciascuna tecnica, e per ciascun campione, sono state effettuate 6 repliche, per un totale di 288 letture. Per la *MFT* ad ogni aliquota di 2 g sono stati aggiunti 38 ml di SF (diluizione 1:20), il campione è stato poi omogenato, filtrato e sono state riempite le due camere del MiniFLOTAC. Per la *McT* (Whitlock, 1948) a ciascuna aliquota di 2 g sono stati aggiunti 28 ml di SF (diluizione 1:15), il campione è stato omogenato, filtrato e sono state quindi riempite le due camere del vetrino; in tutti i casi la lettura è stata effettuata dopo 10 minuti.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I risultati della comparazione sono riassunti nella tabella che segue. I valori di OPG della *McT 0,3mL* sono statisticamente superiori ai valori della *McT 1mL*. Considerando che maggiore è l'area/volume di lettura, più accurato è il risultato, il *McT 1mL* dà valori di lettura del vetrino McMaster più attendibili rispetto al *McT 0,3mL*. Da ciò scaturisce che i valori della McT sono influenzati dalla scelta dell'area di lettura (volume) come già riportato da Cringoli *et al.* (2004). Questa è una ulteriore conferma che i valori della *McT 0,3mL* sono il risultato di una sovrastima delle OPG, probabilmente dovuta all'elevato fattore di moltiplicazione (50x) e/o alla tendenza degli elementi parassitari a concentrarsi verso il centro della camera del vetrino McMaster. I valori di OPG della *MFT* sono risultati sovrapponibili agli stessi della *McT 0,3mL*, ma statisticamente superiori ai valori della *McT 1mL*. A tale riguardo: a) premesso che la *MFT* e la *McT* si basano sullo stesso principio e che in questa prova è stata utilizzata anche la stessa FS; b) considerando che maggiore è l'area/volume di lettura più accurato è il risultato, la superficie di lettura della *MFT* è esattamente la stessa della *McT 1mL*, (mm 18x18 x 2), tuttavia le due camere di flottazione del MiniFLOTAC racchiudono un volume di 2 mL, il doppio del volume delle due camere del vetrino Mc Master; c) visto che i valori della media delle OPG della *MFT* sono risultati statisticamente più elevati degli stessi della *McT 1mL* (2081 *vs* 1791; P<0,05), con un coefficiente di variazione, che esprime la precisione della tecnica per letture ripetute, comparabile tra le due tecniche (19,4 *vs* 17,5; P>0,05), i risultati del presente studio hanno mostrato che la *MFT* è risultata la più accurata e quindi è una tecnica promettente per la diagnosi e la conta di oocisti di *Eimeria* spp. nelle capre e probabilmente anche per altre specie animali.

Tabella 1 - Comparazione tra la *Modified McMaster technique* (0,3 mL; 1 mL) e la *MiniFLOTAC technique.*

Tecniche	Media OPG	CV (%)
McMaster technique 0,3 mL	2078[a]	23,0[a]
McMaster technique 1 mL	1791[b]	17,5[b]
MiniFLOTAC technique	2081[a]	19,4[b]

P < 0,05; livello di significatività con lettere differenti.

MiniFLOTAC technique: a new approach for the diagnosis of *Eimeria* spp. in goats

Key words: *Eimeria* spp., goats, MinFLOTAC technique; Modified McMaster technique.

Bibliografia

Barda B., Ianniello D., Salvo F., Sadutshang T., Rinaldi L., Cringoli G., Burioni R., Albonico M. (2014), "Freezing" parasites in pre-Himalayan region, Himachal Pradesh: Experience with mini-FLOTAC". Acta Tropica (130):11-16.

Barda B., Zepherine H., Rinaldi L., Cringoli G., Burioni R., Clementi M., Albonico M. (2013b), Mini-FLOTAC and Kato-Katz: helminth eggs watching on the shore of Lake Victoria. Parasit Vectors. (6):220.

Barda B.D., Rinaldi L., Ianniello D., Zepherine H., Salvo F., Sadutshang T., Cringoli G., Clementi M., Albonico M.(2013a), Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. PLoS Negl Trop Dis. (7):e2344.

Cringoli G., Rinaldi L., Albonico M., Bergquist R., Utzinger J., (2013), Geospatial (s)tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. Geospat. Health (7): 399-404.

Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A., (2004), The influence of flotation solution, sample dilution and the choiceof 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. Vet. Parasitol. (123): 121-131.

Taylor M.A., Catchpote J. (1984), Review article: coccidiosis of domestic ruminants. Appl. Parasitol. (35):73-86.

Withlock H.V. (1948), Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. J. Counc. Sci. Ind. Res. (21): 177-180.

Elementi in traccia in campioni di latte ovini e caprini prelevati nelle regioni Puglia e Basilicata: valutazione dei dati mediante analisi multivariata

O. MIEDICO, M. TARALLO, C. POMPA, A.E. CHIARAVALLE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Parole chiave: latte, metalli pesanti, monitoraggio.

INTRODUZIONE - Il piano di monitoraggio su alimenti di origine animale prodotti nei Siti di Interesse Nazionale (SIN) si propone di raccogliere dati sulla contaminazione nelle aree a maggior impatto ambientale di origine antropica. Il latte, alimento ad elevato potere nutrizionale, è una matrice alimentare in grado di evidenziare eventuali contaminazioni ambientali in atto. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, deputato al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, ha eseguito su 78 campioni di latte le analisi dei principali oligoelementi (Fe, Cu, Mn, Zn, Ni, Al, V, Se, Sn, Co, Mo) e contaminanti inorganici (Pb, Cd, Hg, As, U, Cr, Sr, Be, Tl). Il presente lavoro, pertanto, mostra i risultati ottenuti nell'ambito del piano di monitoraggio in campioni di latte prelevati presso aziende rurali in Puglia e Basilicata e pervenuti presso codesto Istituto nel periodo da Luglio 2012 a Dicembre 2013.

MATERIALI E METODI - Sono stati analizzati 78 campioni di latte: 58 di specie ovina, 10 caprina e 10 ovi-caprina; 32 di provenienza pugliese e 46 lucana. I contaminanti inorganici (Cd, As, Pb e Hg) sono stati analizzati mediante una metodica analitica normata e accreditata(UNI EN 15763, 2010), che prevede la mineralizzazione in umido con microonde e analisi mediante Spettrometria di Massa al Plasma Induttivamente Accoppiato (ICP-MS, Elan DRC II, PerkinElmer). Gli altri elementi sono stati determinati mediante metodica sviluppata e validata presso il laboratorio. Per il controllo qualità è stato utilizzato un idoneo Materiale di Riferimento Certificato (Milk Powder NIST 1549).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Dei 78 campioni di latte 2 sono risultati non conformi per il Piombo (Reg. CE 1881/2006) (limite massimo consentito: 0,020 mg/kg): il primo con un valore di 0,033 mg/kg proveniente da un allevamento nel comune di Pomarico (MT), il secondo con un valore di 0,024 mg/kg proveniente dal limitrofo comune di Ferrandina (MT). Tuttavia, la concentrazione media di Pb nei 78 campioni è pari a 0,00471 mg/kg, apprezzabilmente più bassa di quella riportata in letteratura per diversi campioni (Rahimi, 2013), con una media di 0,0121 e 0,00737 mg/kg per campioni di latte ovino e caprino, rispettivamente. Anche per il Cadmio sono stati riscontrati valori molto bassi: nel 40% dei casi la concentrazione è stata inferiore al LOQ (0,00044 mg/kg), con una media di 0,00081 mg/kg, sensibilmente inferiore al dato riscontrato in letteratura (Rahimi, 2013), dove per il latte ovino e caprino la media è pari a 0,00331 e 0,00233 mg/kg, rispettivamente.

Tabella 1 - Concentrazioni medie (mg/kg) e deviazioni standard di alcuni elementi per le 2 regioni.

	U (ng/g)	Co (ng/g)	Sr (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Basilicata	**0,0801** ± 0,120	**4,19** ± 1,30	**1,40** ± 0,457	**1,118** ± 0,391	**5,45** ± 1,77
Puglia	**0,234** ± 0,308	**2,24** ± 1,03	**0,766** ± 0,571	**0,763** ± 0,277	**3,25** ± 1,67

La concentrazione di Mercurio per tutti i campioni è risultata inferiore al Limite di Quantificazione (LOQ=0,00071 mg/kg), a prova della sua scarsa tendenza all'accumulo nel latte. La matrice dei dati, costituita da 78 oggetti e 20 variabili, è stata elaborata, previo *autoscaling* di colonna, mediante analisi statistica multivariata (PCA), consentendo di notare differenze apprezzabili nella composizione elementare dei campioni di latte provenienti dalle 2 regioni. Dalla Figura 1, riportante gli scores dei campioni proiettati sulla PC1 e PC2 (la due direzioni di massima variabilità) si nota una sostanziale separazione dei 2 gruppi, potendo individuare agevolmente la direzione di massima differenziazione. I campioni della Puglia hanno una minore dispersione, e quindi una maggiore omogeneità, a differenza dei campioni lucani, per i quali si nota un grado di variabilità più elevato. Le variabili che contribuiscono maggiormente alla differenziazione sono U e Tl, maggiori nei campioni della Puglia; mentre Co, Sr, Zn, Fe, Mn, Al e V hanno un contenuto maggiore nei campioni della Basilicata.

La Tabella 1, con i tenori medi e deviazione standard degli elementi più significativi per la diversificazione tra le due regioni, conferma tali considerazioni.

I contaminanti più pericolosi (Mercurio, Piombo, Cadmio, Arsenico e Cromo) non mostrano una particolare differenza tra le due regioni, suggerendo un non localizzato livello di contaminazione. Tali considerazioni potranno essere successivamente approfondite mediante campionamenti e monitoraggi pianificati *ad hoc.*

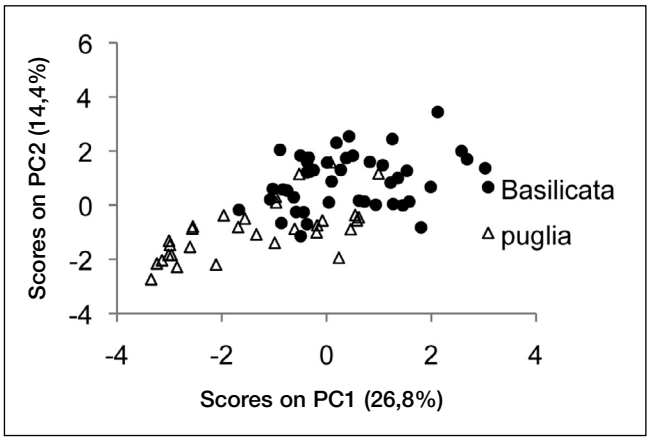


Figura 1 - Score plot dei 78 campioni di latte su PC1 e PC2.

Trace elements in sheep and goat milk samples from Apulia and Basilicata regions: valutation by multivariate data analysis

key words: milk, heavy metals, monitoring study.

Bibliografia

Norma UNI EN 15763. (2010), Determinazione di Arsenico, Cadmio, Mercurio e Piombo nei prodotti alimentari per mezzo di spettrometria di massa al plasma induttivamente accoppiato (ICP-MS).

Regolamento (CE) 1881/2006 della Commissione del 19 Dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

Rahimi E. (2013) Lead and Cadmium concentrations in goat, cow, sheep and buffalo milks from different regions of Iran. Food Chemistry 136: 389-39.

Screening di espressione di recettori purinergici P2X in monociti ovini

S. MUZZACHI[1], A. CAPOGNA[2], L. GUERRA[1], E. PIERAGOSTINI[2], E. CIANI[1]

[1] Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli Studi di Bari Aldo Moro
[2] Dipartimento di Emergenza e dei Trapianti di Organi, Università degli Studi di Bari Aldo Moro

Parole chiave: recettori purinergici, monociti, ovini.

INTRODUZIONE - I recettori purinergici P2X sono proteine di membrana, in grado di rispondere all'attivazione da parte dell'ATP extracellulare (North, 2000). Si distinguono sette isoforme, denominate P2X1-7 (Ravelic e Burnstock, 1998), codificate da geni distinti. Studi riportati in letteratura indicano che i segnali innescati dall'attivazione di questi recettori regolano un numero elevato di importanti processi fisiologici. Nello specifico, esperimenti su topi ko hanno evidenziato che P2X1 (Mulryan et al., 2000) media la contrazione dei vasi deferenti, P2X2 e P2X3 sono responsabili di dolore neuropatico (Cockayne et al., 2000), P2X4 ha un ruolo nel mantenimento del tono vascolare e nel rilascio di prostaglandine, P2X7 è coinvolto in rilascio di citochine, morte cellulare, regolazione delle ghiandole esocrine ed endocrine (Jiang, 2012). Inoltre, l'alterata espressione e funzionalità di P2X è stata associata a svariate patologie, quali malattie infiammatorie, ipertensione, ischemia, dolore cronico, cancro. Un nostro precedente studio (Muzzachi et al., 2013) ha evidenziato che l'inibizione specifica di P2X7 in monociti umani è in grado di bloccare il processo infiammatorio nelle prime fasi di sviluppo. Per tale motivo, ci siamo occupati in questo lavoro di realizzare, nella specie ovina, uno screening preliminare dei livelli di espressione monocitaria delle diverse isoforme di P2X.

MATERIALI E METODI - A partire da monociti ovini, isolati da buffy coat mediante centrifugazione in gradiente di densità con Histopaque (Sigma), è stato estratto l'RNA totale utilizzando RNeasy Mini Kit (Qiagen) secondo le indicazioni della casa produttrice. L'RNA è stato successivamente retro-trascritto in cDNA mediante High capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems) e sottoposto ad amplificazione delle regioni target mediante protocolli specifici di PCR. Al fine di discriminare tra le diverse isoforme di P2X, a partire dalle sequenze di mRNA di P2X disponibili in banca dati per la specie ovina (*Ovis aries)*, sono state disegnate specifiche coppie di primers (www.primer3.ut.ee/, version 4.0.0) la cui specificità è stata saggiata *in silico* mediante analisi BLAST (www.ensembl.org). La mix di PCR era costituita, in tutte le reazioni di amplificazione, da Multiplex PCR Master Mix 1X (Qiagen), primers 0.2 µM (MWG), cDNA ed RNAse free-water, in un volume finale di 50µl. Gli amplificati sono stati separati mediante corsa elettroforetica per 1h a 90 V su gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro. I frammenti ottenuti sono stati escissi dal gel e purificati utilizzando il kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e successivamente sottoposti a sequenziamento di Sanger (Eurofins MWG Operon).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I protocolli di RT-PCR adottati hanno consentito di dimostrare, per la prima volta, la presenza di trascritti di P2X in monociti ovini. In particolare, la separazione su gel di agarosio dei frammenti amplificati ha evidenziato la presenza di bande corrispondenti ai recettori P2X1 (199 pb), P2X4 (185 pb), P2X5 (197 pb) e P2X7 (187 pb). Nelle nostre condizioni sperimentali, nessun amplificato è stato osservato per P2X2 e P2X6, mentre sono state osservate bande di aspecificità per P2X3. Ulteriori esperimenti saranno effettuati allo scopo di ottimizzare i protocolli di PCR.

L'allineamento mediante Clustalw (http://www:ebi.ac.uk./Tools/clustal2/) delle sequenze nucleotidiche ottenute con quelle di *Ovis aries* presenti in banca dati, ha rivelato un'identità pari al 100%. Esperimenti futuri saranno volti a valutare l'espressione proteica e la localizzazione dei recettori P2X in monociti ovini.

Parallelamente, per testare la funzionalità saranno effettuate misure spettrofluorimetriche di calcio intracellulare, in seguito ad attivazione dei canali con agonisti specifici.

Screening of P2x purinergic receptors expression in ovine monocytes

Key words: purinergic receptors, monocytes, ovine.

Bibliografia

Burnstock G. (2012), Discovery of Purinergic Signalling, the Initial Resistance and Current Explosion of Interest. Br. J. Pharmacol. (2):238-255.

Cockayne D.A, Hamilton S.G., Zhu Q.M., (2000), Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. Nature 407(6807):1011-1015.

Jiang L.H (2012), P2X receptor-mediated ATP purinergic signaling in health and disease. Cell Health and Cytoskeleton (4):83-101.

Mulryan K., Gitterman D.P., Lewis C.J. (2000), Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. Nature 403(6765):86-89.

Muzzachi S., Blasi A., Ciani E., Favia M., Cardone R.A., Marzulli D, Reshkin S.J., Merizzi G., Casavola V., Soleti A., Guerra L. (2013), MED1101: a new dialdehydic compound regulating P2X7 receptor cell surface expression in U937 cells. Biol. Cell (105)399-413.

North R.A. (2002), Molecular physiology of P2X receptors. Physiol. Rev. 82(4):1013-1067.

Surprenant A., North R.A. (2009), Signaling at purinergic P2X receptors. Annu Rev. Physiol. (71):333-359.

Tabella 1 - Sequenze dei primers utilizzati nei protocolli di RT-PCR.

Recettore	Primer forward	Primer reverse
P2X1	5'GGCTGCCTTCTTCTTCGAGT3'	5'TGTCACAGCCAGACCTTTGA3'
P2X2	5'GGCATTTATGAAGAAGCCACA3'	5'ACACAGTCCTCGTCCGAGTC3'
P2X3	5'GTCGTGAAGAGCTGGACCAT3'	5'TGGGGTCACGTAGTCAGACA3'
P2X4	5'CCGGCTTTCCTCAGAATCTT3'	5'CACGAGTGTGGGGTTGAAG3'
P2X5	5'GCTCTACCAGTCGCTCTTCG3'	5'TCACACCCTTGACTTTGGTG3'
P2X6	5'GTTACGCCCACTCTGCAGTC3'	5'GAGGAGGGAGAAGCACAGG3'
P2X7	5'GTACCAGGAGCCCTTGCTG3'	5'GCCACTGTATTGGCCTTCAC3'

Casi di carcinoma a cellule squamose e papilloma squamoso in ovini della Regione Basilicata: indagini istologiche e di immunocaratterizzazione

S. PAVONE[1], C. LORENZETTI[1], D. CRUCIANI[1], S. BROCCATELLI[1], M. GARAGUSO[2], G. PRESTERA[2], G. FILIPPINI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche
[2] Associazione Regionale Allevatori della Basilicata

Parole chiave: ovino, carcinoma a cellule squamose, papilloma squamoso, Papilloma virus.

INTRODUZIONE - I tumori spontanei nella specie ovina risultano poco frequenti. Tra questi, il carcinoma a cellule squamose (CCS) rappresenta la forma più frequente tra i tumori delle cute, presentando un tasso di prevalenza variabile dallo 0,2% al 2,29%. L'incidenza di tale tumore appare maggiore nei soggetti più anziani. Il carcinoma a cellule squamose è stato segnalato in Australia, Sud Africa, Francia, Spagna, Arabia Saudita, Brasile e nell'Italia insulare. Episodi multipli di CCS della pecora (*Ovis aries*) nello stesso allevamento vengono in genere correlati ad intensa e prolungata esposizione a radiazioni attiniche, specie se associata all'assunzione di piante fotosensibilizzanti, scarsa pigmentazione della cute, e interventi chirurgici come il taglio della coda. Spesso, il CCS viene preceduto da lesioni cutanee precancerose quali cheratosi attinica, displasie dell'epidermide associate a iperplasia cronica reattiva dei cheratinociti e flogosi croniche cutanee. Alcuni studi hanno mostrato, mediante tecnica di ibridazione in situ e microscopia elettronica, come queste lesioni spesso si associano ad infezione con il Papillomavirus. Tuttavia i due genotipi della pecora largamente conosciuti (OaPV1 e l'OaPV2) sembrano associarsi esclusivamente a lesioni fibropapillomatose, mentre non sono mai stati riscontrati in lesioni precancerose o tumorali prettamente dell'epidermide. Solo di recente, uno studio ha identificato un nuovo genotipo di papillomavirus ovino, chiamato *Ovis aries* Papillomavirus 3 (OaPV3) epidermotropico associato al carcinoma a cellule squamose ovino. A causa della elevata incidenza registrata in alcuni greggi, il CCS può essere causa di importanti perdite economiche per gli allevatori ovini e può rappresentare pertanto una patologia di particolare significato economico. Scopo della comunicazione è descrivere lesioni riferibili a CCS e papilloma squamoso della pecora (*Ovis aries*) in soggetti allevati nella Regione Basilicata.

MATERIALI E METODI - Alcuni allevamenti della Regione Basilicata riferiscono che negli ultimi due anni, durante il periodo primaverile-estivo, alcune pecore hanno presentato lesioni cutanee che tendevano ad ulcerarsi e accrescersi nonostante alcuni trattamenti topici effettuati. Questi animali, a motivo dell'ulcerazione e conseguente infestione con larve di ditteri delle lesioni cutanee, sono stati sacrificati ed eliminati dall'allevamento. La ricomparsa del fenomeno anche durante il 2014 ha reso necessario approfondire il problema. Pertanto, il veterinario referente ha inviato le lesioni all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche per accertamenti diagnostici. Porzioni di tessuto neoplastico sono state fissate in formalina neutra tamponata al 10%, processati con le normali tecniche, colorati con ematossilina-eosina ed osservate al microscopio ottico. Sezioni di 5 µm sono state sottoposte inoltre ad indagini di immunoistochimica (IHC) per la ricerca del Papillomavirus e per una immunocaratterizzazione delle lesioni campionate e dell'infiltrato infiammatorio intra- e peri-tumorale.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Le indagini istologiche hanno evidenziato lesioni riferibili a papilloma squamoso, a carcinoma a cellule squamose in stadio iniziale e a carcinoma a cellule squamose in stadio avanzato. Tutte le lesioni presentano un ricco infiltrato infiammatorio peri- ed intra-tumorale costituito prevalentemente da linfociti e plasmacellule. Le indagini di immunoistochimica hanno permesso di immunocaratterizzare l'infiltrato infiammatorio ottenendo così informazioni circa il meccanismo di risposta immunitaria dell'ospite nei confronti della crescita di tali lesioni. La nota progressione neoplastica delle lesioni cutanee precancerose versus il carcinoma a cellule squamose, pone l'attenzione sulla necessità di una diagnosi precoce, tale da consentire l'eventuale escissione chirurgica delle lesioni prima che progrediscano verso forme tumorali maligne, note per un elevato tasso di recidiva e tendenza a divenire, dopo l'asportazione chirurgica, ancora più aggressive. Inoltre, visto la probabile associazione di tali lesioni con l'infezione da Papillomavirus, in via sperimentale si sta valutando la possibilità di utilizzare, anche nella specie ovina, il trattamento con autovaccino dei capi di elevato valore genetico.

Figura 1 - Merinizzata italiana di due anni di età. Carcinoma a cellule squamose in stadio avanzato della zona periorbitale associato alla presenza di un carcinoma a cellule squamose in stadio iniziale della pinna dell'orecchio.

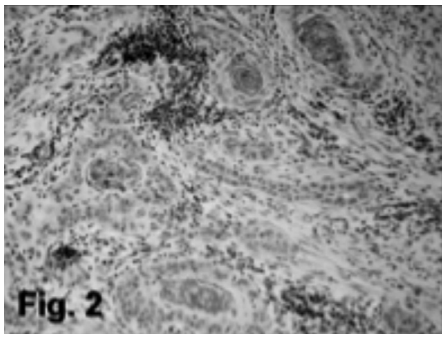


Figura 2 - Merinizzata italiana di due anni di età. Carcinoma a cellule squamose della regione peri-orbitale in stadio avanzato. Il tumore appare costituito da trabecole e isole di cellule a differenziazione squamosa con aree di necrosi centrale (perle cornee) immerse in abbondante stroma fibro-connettivale riccamente infiltrato da plasmacellule e più rari linfociti.

Ovine squamous cells carcinoma and squamous papillma in Basilicata region (Italy): histology and immunocharacterisation analysis

Key words: sheep, squamous cell carcinoma, squamous papilloma, Papillomavirus.

Bibliografia

Alberti A., Pirino S., Pintore F., Addis M.F., Chessa B., Cacciotto C., Cubeddu T., Anfossi A., Benenati G., Coradduzza E., Lecis R., Antuofermo E., Carcangiu E., Pittau M. (2010) Ovis aries Papillomavirus 3: A prototype of a novel genus in the family Papillomaviridae associated with ovine squamous cell carcinoma. Virology 407:352-359.

Mozos E., Méndez A., Martín M.P., Herráez P., Pérez J. (1998) Ovine cutaneous squamous cell carcinoma: immunohistochemical expression of CD3, CD4, CD8 and MHC class II antigens in the associated inflammatory infiltrate. Veterinary Immunology and Immunopathology 61: 221-228.

Pérez J., Méndez A., De Lara F.C-M., Martín M.P., Mozos E. (1997) Ovine squamous cell carcinoma: immunocharacterisation of neoplastic cells and peritumoural cellular infiltrate. Research in Veterinary Science 63(1):43-47.

Puleio R., Capucchio M.T., Mignacca S., Spuria L., Sofia T., Fiasconaro., Loria G.R. (2013) Carcinoma a cellule squamose in pecore allevate nella Regione Sicilia. Large Animal Review suppl. 1-5:92.

Savini F., Gallina, Scagliarini A., Mignacca S., Di Marco P., Pur pari G., Guercio A., Capecchio M.T., Di Marco Lo Presti V. (2013) Carcinoma mammario negli ovi-caprini: ruolo dei papillomavirus. Large Animal Review suppl. 1-5:5.

Utilizzo di inulina nella produzione di un formaggio fresco da latte di capra

A. PIRISI, E. SALVATORE, S. FURESI, M. PES

Dipartimento per la ricerca nelle Produzioni Animali, Agris Sardegna, loc. Bonassai, 07040 Olmedo (SS), Italia

Parole chiave: inulina, prebiotici, formaggio fresco, *low-fat*.

INTRODUZIONE - L'inulina può essere utilizzata come ingrediente nell'industria alimentare sia per le sue proprietà nutrizionali che tecnologiche. Le proprietà nutrizionali derivano dal fatto che l'inulina resiste agli acidi gastrici e alla digestione nell'intestino tenue umano, ed è pertanto una fibra dietetica con un basso potere calorico (Roberfroid et al 1999). Inoltre presenta importanti effetti prebiotici, legati all'aumento nel numero e/o nell'attività, nel tratto gastrointestinale, di microrganismi benefici per la salute. Per quanto riguarda i dati relativi ai livelli di introduzione giornalieri di inulina/oligofruttosio, la stima per l'Europa è di 3,2-11,3 g, mentre nel Nord America, l'*intake* giornaliero è di 1-4 g. Non esistono attualmente in Europa raccomandazioni relativamente ai livelli massimi assumibili di inulina e oligosaccaridi, tuttavia è sconsigliato superare i 20 g/giorno per evitare disordini di natura intestinale. Per quanto riguarda gli aspetti inerenti l'etichettatura, il regolamento (CE) N. 1924/2006 relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari attesta che un alimento è "fonte di fibre" solo se il prodotto contiene almeno 3 g di fibre per 100 g, mentre è considerato "ad alto contenuto di fibre" solo se il prodotto contiene almeno 6 g di fibre per 100 g. Per quanto riguarda le proprietà tecnologiche di inulina e oligofruttosio, esse sono strettamente dipendenti dal loro DP, in particolare le molecole a lunga catena presentano un'elevata capacità di legare l'acqua e, per tale caratteristica, di sostituire il grasso. Per tale motivo l'inulina è stata utilizzata come *fat-replacer* in prodotti lattiero-caseari a basso contenuto di grasso.
Lo scopo del presente lavoro era quello di utilizzare l'inulina nella produzione di formaggi caprini freschi, arricchiti in fibre, e con un basso contenuto di grassi, mediante l'impiego di tecnologie di filtrazione su membrana (ultrafiltrazione, UF).

MATERIALI E METODI - Sono stati prodotti tre formaggi caprini freschi (IN0, *full-fat*: 9% grasso, 0% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina) a coagulazione prevalentemente acida (eseguita direttamente nella confezione finale), utilizzando miscele composte da quantitativi predeterminati di retentato di UF di latte di capra magro, crema di latte di capra, inulina DP≥23 (Frutafit TEX, Sensus, The Netherlands), e acqua. Sono state eseguite tre lavorazioni sperimentali, e sui prodotti alle 24 h dalla produzione, sono state effettuate le seguenti determinazioni analitiche: pH, metodo potenziometrico (Orion, 420A, USA); azoto totale; grasso; sostanza secca; proteina totale: azoto totale x 6,38; test di penetrometria con reometro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Surrey, UK) (Seuvre et al., 2008).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I prodotti non presentavano separazione di siero nelle confezioni. Ciò fa si che la composizione fisicochimica (Tab. 1) del formaggio, sia identica alla composizione della miscela di partenza, e di conseguenza, il recupero di materia (grasso, proteina e inulina) sia praticamente totale. Inoltre, i formaggi, erano caratterizzati da valori uguali di pH, umidità, e proteina totale. Le uniche differenze erano relative al contenuto di grasso e inulina. Come è possibile notare dalla tabella, i prodotti IN5 ed IN7 sono estremamente validi da un punto di vista nutrizionale, ed in particolare nel caso di IN7, potrebbe essere indicato in etichetta: formaggio "a basso contenuto di grassi", in quanto il formaggio contiene meno di 3 g di grasso per 100 g e formaggio "ad alto contenuto di fibre", in quanto presenta un contenuto di inulina superiore a 6 g/100 g. Per quanto riguarda i parametri reologici dei formaggi, essi venivano influenzati dalla sostituzione grasso/inulina (Tab. 2). Per tutti i parametri osservati, è stata rilevata una riduzione lineare dei valori, in funzione del maggiore contenuto di inulina, con valori di IN0 mediamente superiori di 2,5 volte circa rispetto a IN7. Come è possibile notare, per i valori relativi a tutti i parametri considerati, i formaggi IN5 e IN7 differivano in maniera statisticamente significativa ($p<0,05$) rispetto al controllo (IN0). Pertanto i formaggi contenenti inulina risultavano meno duri e coesi rispetto al controllo. In conclusione, la metodologia di preparazione dei formaggi utilizzata si è rivelata estremamente valida nel permettere l'arricchimento in fibre funzionali di formaggi freschi *low-fat*, consentendo inoltre di migliorarne la struttura.

Tabella 1 - Composizione fisico-chimica dei formaggi alle 24 h dalla produzione.

Parametri	IN0*	IN5*	IN7*
pH (UpH)	4,49 ± 0,01	4,49 ± 0,01	4,50 ± 0,01
Umidità (%)	78,49 ± 0,23	78,27 ± 0,36	78,31 ± 0,12
Grasso (%)	8,88 ± 0,10	4,16 ± 0,05	2,13 ± 0,04
Grasso/SS** (%)	41,31 ± 0,85	19,22 ± 0,67	9,80 ± 0,21
Proteina totale (%)	8,13 ± 0,15	8,02 ± 0,10	8,03 ± 0,10
Inulina*** (%)	0,00 ± -	5,00 ± -	7,00 ± -

* IN0, *full-fat*: 9% grasso, 0% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina; **Rapporto Grasso/Sostanza secca. ***Quantità di inulina aggiunta alle miscele.

Tabella 2 - Parametri reologici dei formaggi alle 24 ore dalla produzione.

Parametri	IN0*	IN5*	IN7*
Forza max (N)	$9,2^{a}$ ± 1,9	$4,5^{bc}$ ± 1,0	$3,5^{c}$ ± 0,5
Area positiva (N/s)	$272,4^{a}$ ± 56,8	$137,5^{bc}$ ± 28,0	$112,6^{c}$ ± 15,3
Forza max negativa (N)	$2,6^{a}$ ± 0,6	$1,2^{bc}$ ± 0,3	$0,8^{c}$ ± 0,2
Area negativa (N/s)	$50,1^{a}$ ± 15,8	$26,0^{bc}$ ± 4,0	$19,7^{c}$ ± 4,8

* IN0, *full-fat*: 9% grasso, 0% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina; I valori con una diversa lettera, nella stessa riga, differiscono significativamente ($p<0,05$).

Utilization of inulin as fat replacer in a fresh cheese made from goat milk

Key words: inulin, prebiotics, fresh cheese, low-fat.

Bibliografia

Roberfroid M.B. (1999), Caloric value of inulin and oligofructose, Journal of Nutrition 129:1436S-1437S.

Seuvre, A.M., Turci, C., Voilley, A. (2008), Effect of the temperature on the release of aroma compounds and on the heological behaviour of model dairy custard. Food Chemistry 108: 1176-1182.

Studio preliminare sull'effetto residuo di un pascolamento razionato in pecore sottoposte a effetto maschio e flushing con lupino

C. PORCU, A. RODRIGUEZ, M. DATTENA, M. GALLUS, S. PILICHI, G. MOLLE

Agris, Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali, loc. Bonassai, 07040 Olmedo, Italia

Parole chiave: ciclo ovarico, fertilità, prolificità, nutrizione.

INTRODUZIONE - Nelle pecore a fine anaestro, l'esposizione repentina all'ariete può portare ad ovulazione e sincronizzazione dei calori (Dattena et al., 2010; Rosa et al, 2002). Questo evento detto "effetto maschio" può essere influenzato da diversi fattori, che possono essere intrinseci agli animali, come razza, peso vivo (PV), stato di ingrassamento (BCS), stadio di lattazione, livello produttivo o dipendere dal sistema di allevamento, ed, in particolare, dall"alimentazione.

L'obiettivo di questo lavoro è stato valutare l'effetto residuo del pascolamento razionato (Molle et al., 1995) di pecore da latte al quinto mese di lattazione sulla loro risposta all'effetto maschio e flushing alimentare in termini di ripresa dell'attività ovarica, della fertilità e della prolificità.

MATERIALI E METODI - A questo scopo sono state utilizzate n. 36 pecore di razza Sarda ad iniziare dal terzo mese di lattazione. A partire dal 18 febbraio le pecore sono state gestite come gruppo unico ed adattate al pascolo razionato (4 ore/giorno) di loglio italico (*Lolium multiflorum)*, ricevendo giornalmente come integrazione 700 g/capo di fieno di loglio trinciato e 700 g/capo di concentrato commerciale. Dall'11 Marzo le pecore sono state suddivise in tre gruppi da dodici soggetti, omogenei per età, PV, BCS e produzione lattea assegnati a tre trattamenti che prevedevano l'accesso al pascolo a orario con il seguente programma: G2h, 2 ore/giorno dalle h. 08:00 alle h. 10:00; G4h, 4 ore/giorno dalle h. 08:00 alle h. 12:00; G6h, 6ore/giorno dalle h. 08:00 alle h. 14:00. Dal 26 Marzo 300 g/capo di concentrato commerciale sono stati sostituiti con 300 g/capo di semi di lupino.

Dal 30 Aprile gli animali sono stati messi assieme in un unico gruppo, portando tutti i capi a 6 ore/giorno di permanenza al pascolo di loglio (07:30-13:30).

Il 02 Maggio (identificato come giorno 0) per indurre l'"effetto maschio" sono stati introdotti quattro maschi adulti, interi e non tosati. Dal 18 Maggio (giorno 16) è stato effettuato un flushing alimentare con 400 g/capo di semi di lupino e 50 g/capo di concentrato commerciale per 5 giorni. Il 18 Maggio è iniziato il controllo dei calori per 8 giorni, tre volte al giorno (h 08:00, h14:00 e h16:00) con l'ausilio di pastelli. Il 29 Giugno (giorno 58) è stato rilevato il 3° e ultimo calore e dopo 8 giorni sono stati tolti i maschi dal gruppo.

Nel corso dello studio sono morte 5 pecore per Blue Tongue, distribuite in tutti i gruppi. Nello stesso periodo non sono stati registrati effetti residui significativi dei trattamenti su produzione individuale di latte, PV, BCS e loro variazioni.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Tutti i gruppi hanno ripreso l'attività ovarica all'introduzione del maschio (G2h 83% = 10/12; G4h 75% = 9/12; G6h 75% = 9/12, P>0.2, Fisher Exact test a due code). La percentuale di fertilità al primo calore è stata in G2h 30% (3/10), in G4h 70% (7/10) e in G6h 64% (7/11, P = 0.17 tra G2h e G4h) (Fig. 1). La fertilità complessiva relativa alla stagione riproduttiva (tre cicli ovarici) invece è stata in G2h 70% (7/10), in G4h 80% (8/10) e in G6h 73% (8/11, P>0.2) (Fig. 1). La prolificità al 1° calore è stata in G2h 3/3 (1 agnello), in G4h 11/7 (1.6 agnelli) e in G6h 13/7 (1.9 agnelli, P<0.05 tra G2h e G6h) (Fig. 2), mentre la prolificità relativa alla stagione è stata in G2h 10/7 (1,4 agnelli), in G4h 12/8 (1,5 agnelli) e in G6h 15/8 (1,9 agnelli, P=0.11 tra G2h e G6h) (Fig. 2).

La percentuale di concentrazione dei parti* è stata in G2h 43% (3/7), in G4h 86% (7/8) e in G6h 86% (7/8) (Fig. 1). I parti gemellari sul totale delle pecore partorite sono stati rispettivamente in G2h 3/7 (43%), in G4h 4/8 (50%) e in G6h 7/8 (86%) (Fig. 1).

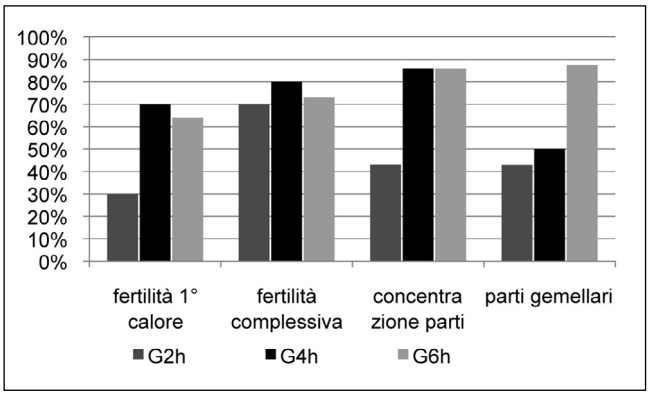


Figura 1 - Fertilità, concentrazione parti e parti gemellari in Gh1, Gh2 e Gh3.

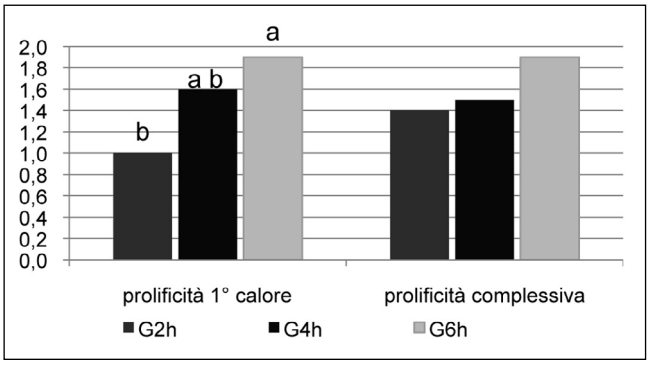


Figura 2 - Prolificità relativa al primo calore e complessiva.

In conclusione, una riduzione della durata di accesso al pascolo su loglio italico al di sotto di 6 ore/giorno in pecore a metà lattazione può manifestare un effetto residuo negativo sulla risposta all'"effetto maschio" accoppiato al flushing con lupino, con riduzione significativa della prolificità a primo calore e, tendenziale della prolificità totale. Gli effetti residui sulla fertilità non sono significativi probabilmente per il ridotto numero di osservazioni.

Preliminary study of the residual effect of a rationed grazing in ewes under male effect and flushing with lupine

Key words: ovarian cycle, fertility, prolificity, nutrition.

Bibliografia

Dattena M., Mayorga I., Mara L., Belloi L., Gallus M., Meloni G., Cabiddu A., Salaris S., (2010), An example of reproduction management in organic sheep farming. XI International Mediterranean Symposium 27-29 October, Zadar (Croazia), Abstract pg 75.

Molle G., Branca A., Ligios S., Sitzia M., Casu S., Landau S., Zoref Z., (1995), Effect of grazing background and flushing supplementation on reproductive performance in sarda ewes. Small ruminant research17:245-254.

Rosa H.J.D., Bryant M.J., (2002), The "ram effect" as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. Small ruminant research 45 1-16.

* Numero di parti con data riferibile al 1° ciclo ovarico/Numero di parti con data riferibile ai primi tre cicli ovarici.

Diagnosi di *Coxiella burnetii:* sviluppo di un nuovo saggio LAMP *(Loop Mediated Isothermal Amplification)*

D.A. RAELE, D. GALANTE, G. MANCINI, N. CAVALIERE, M.A. CAFIERO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata (IZSPB), Foggia, Italia, Struttura Complessa Virologia

Parole chiave: *Coxiella burnetii*, zoonosis, LAMP, COM1.

INTRODUZIONE - *Coxiella burnetii*, agente eziologico della Febbre Q (F.Q.), zoonosi ubiquitaria, è un batterio Gram negativo, intracellulare obbligato, appartenente all'ordine Legionellales. Per la resistenza e il grado di infettività elevati è considerato un potenziale agente di bioterrorismo (Dorko *et al*., 2012). Molto diffuso in natura, può infettare diversi ospiti, tra cui i mammiferi domestici e selvatici (Maurin e Raoult, 1999), inclusi i ruminanti. Tra questi, gli ovi-caprini infetti manifestano disordini riproduttivi con aborti, natimortalità e parti prematuri (Capuano *et al*., 2004) e possono diventare un pericoloso serbatoio di F.Q. anche per l'uomo. L'inalazione di batteri aerosolizzati e le polveri contaminate dai prodotti abortigeni infetti rappresentano le più comuni vie di contagio (Angelakis e Raoult, 2010). Per quanto detto, una diagnosi rapida della malattia resta punto fondamentale per ridurre i casi di F.Q. anche nell'uomo. Da alcuni anni, la Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), tecnica di amplificazione genomica in condizioni isotermiche, è sempre più utilizzata per la diagnosi di numerosi microorganismi patogeni (Parida *et al.,* 2008) ma lo è ancora scarsamente per la F.Q, (Pan *et al.*, 2013). Scopo di questo lavoro è descrivere un nuovo saggio LAMP per il rilevamento di *C. burnetii (C.b.)*.

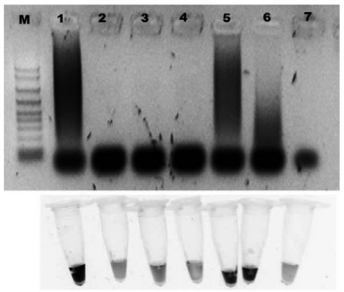
MATERIALI E METODI - Sulla sequenza del gene *COM1,* altamente conservato e presente in singola copia nel genoma di *C. burnetii,* sono state disegnate 2 coppie di primers denominate FIP (TCCTTGTTTAGCGGCTGCTAAT GAGAACTGCCCATTTTTGGCG), BIP (TTATGCTTTCCAC GACGCGCTGCTGCGGTTTGAAGGGTGATT), F3 (AACCT CCGCGTTGTCTTC) e B3 (CCATGTCTTTTTTGAGCTGA GC), utilizzando il Software Primer Explorer (http://primerexplorer.jp/e/). La miscela di reazione (volume finale, 25 µL) è stata ottimizzata utilizzando 10 µL di Buffer di amplificazione isotermica 1X, 5.2 µL di acqua "nuclease free", 2.5 µL di dNTPs (1.5 mM), 1.6 µM di ciascun primers FIP e BIP, 0.3 µM di ciascun primers F3 e B3, 2.5 µL di DNA estratto e 1 µL (8 U) di *Bst* 2.0 WarmStart DNA Polymerase. La reazione di amplificazione è avvenuta utilizzando un termo blocco a 65°C per 45 min. La specificità del saggio è stata valutata testando 33 differenti DNA (Tab. 1) forniti dal Centre for Rickettsial Reference and Research (Marseille, France) e dal Centro di Referenza per l'Antrace IZSPB (Foggia, Italia) e la sensibilità valutata su diluizioni seriali di DNA di *C. burnetii* (Nine Mile strain) contenenti da 100 ng a 100 fg di DNA. Successivamente, il metodo è stato testato su 10 cotiledoni/invogli fetali di ruminanti domestici scelti tra i positivi a *C.burnetii* tramite PCR convenzionale (Berri *et al.*, 2009), di cui 5 (5/10) positivi anche a *Chlamydophila abortus*. Un campione di sangue ovino e uno di latte caprino da animale sano sono stati utilizzati come controlli negativi. I prodotti sono stati visualizzati su gel di agarosio e in provetta, previa aggiunta di propidium iodide, utilizzando una lampada UV.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Tutti i campioni di DNA (33/33) (100%) utilizzati per il test di specificità del metodo sono risultati negativi; il limite di sensibilità è stato determinato in 10 pg di DNA di *C. burnetii* (Nile Mile strain). La totalità (10/10) (100%) dei campioni di campo testati è risultata positiva a *C.b.* Il saggio LAMP da noi sviluppato risulta essere dotato di buona specificità e sensibilità; il tempo per la reazione di amplificazione di 45 minuti lo rende più rapido rispetto alla PCR convenzionale che richiede circa 2 ore.

È inoltre possibile eseguirlo anche in laboratori diagnostici non particolarmente attrezzati, in quanto necessita di apparecchiature di comune reperimento. Oltre al metodo LAMP sviluppato da Pan *et al*., 2013 che rileva DNA di *C.b.* nel sangue, il nostro saggio LAMP permette di individuare DNA di *C. burnetii* in placente/invogli fetali in ruminanti domestici infetti e può considerarsi, pertanto, un ulteriore contributo alla diagnosi di questa zoonosi.

Tabella 1 - DNA testati per le prove di specificità del saggio LAMP.

Classificazione	Patogeno
Membri Ordine Rickettsiales	*Orientia tsutsugamushi, Rickettsia aeschlimannii, R. conorii, R. felis, R. helvetica, R. monacensis, R. prowazekii, R. siberica, R. slovaca, R. typhi*
Potenziali agenti di Bioterrorismo	*Bacillus anthracis, Brucella abortus, Br. canis, Br. melitensis, Br. ovis, Burkholderia mallei, Bu. pseudomallei, Yersinia pestis, Francisella tularensis*
Altri microrganismi patogeni	*Anaplasma phagocytophilum, Babesia ovis, Bartonella henselae, Ba. quintana, Borrelia burgdorferi, Br. neotomae, Chlamydophila abortus, Ch. psittaci, Ehrlichia chaffeensis, Escherichia coli* VTEC, *Y. pseudotuberculosis, Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Streptococcus equi*



M, marcatore;
1: K+ (*C.b.*) cotiledone capra;
2: K- sangue di ovino;
3: *Brucella melitensis*;
4: *Chlamydophila abortus*;
5: K+ (*C.b.*) cotiledone pecora;
6: K+ *C. burnetii* (Nine Mile strain);
7: K- di reazione.

Figura 1 - Visualizzazione prodotti LAMP: su gel di agarosio al 2% (riga superiore) in provetta (riga inferiore).

A novel Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for a rapid detection of *Coxiella burnetii*

Key words: *Coxiella burnetii*, zoonosis, LAMP, COM1.

Bibliografia

Angelakis E., Raoult D. (2010), Q Fever. Vet. Microbiol. 140: 297-309.

Capuano F1, Parisi A, Cafiero MA, Pitaro L, Fenizia D. (2004), Coxiella burnetii: what is the reality? Parassitologia. 46: 131-134.

Dorko E., Rimárová K., Pilip inec E. (2012), Influence of the environment and occupational exposure on the occurrence of Q fever. Cent. Eur. J. Public Health. 20: 208-214;

Maurin M., Raoult D. (1999), Q Fever. Clin. Microbiol. Rew. 12: 518-553.

Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. (2008), Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Rev. Med. Virol. 8: 407-421.

Pan L, Zhang L, Fan D, Zhang X, Liu H, Lu Q, Xu Q. (2013), Rapid, Simple and Sensitive Detection of Q Fever by Loop-Mediated Isothermal Amplification of the htpAB Gene. PLoS Negl. Trop. Dis. 7(5):e2231.

Aspetti microbiologici del formaggio prodotto con latte crudo di capra Nicastrese. Osservazioni preliminari

C. RANDAZZO[1], L. LIOTTA[2,3], F. DE NARDO[3], A. PINO[1], C. CAGGIA[1]

[1] Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali (DiGeSA), Università degli Studi di Catania
[2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina
[3] RARE - Associazione Italiana Razze Autoctone a Rischio di Estinzione

Parole chiave: caprino tradizionale, sicurezza microbiologica, tipicità, Nicastrese.

INTRODUZIONE - La capra Nicastrese è una razza caprina autoctona del territorio di Nicastro (Lamezia Terme, Calabria), erede dell'antica Neocastrum, di origine bizantina (dal nome greco *Neòcastron* = castello nuovo, ai piedi del monte Reventino). Attualmente risultano iscritti al Registro Anagrafico nazionale 4975 capi, mentre il valore della popolazione effettiva (Ne) è stimato in 834 capi. La razza è allevata soprattutto nella provincia di Catanzaro e, per le sue caratteristiche produttive apprezzate dagli allevatori calabresi (Cosenza et al., 2012), si è diffusa nel corso degli anni anche nelle province limitrofe (De Nardo, 2011). Nelle pluripare la produzione di latte in 210 gg di lattazione è di circa 260 litri. Per parecchie generazioni ha rappresentato la fonte primaria di approvvigionamento di latte per uso alimentare, allorquando era poco diffusa la produzione e distribuzione del latte bovino. Oggi è allevata esclusivamente per la produzione di prodotti caseari di solo latte caprino (formaggi monorazza) o misti con latte ovino o bovino (De Nardo, 2003). Il formaggio caprino è ottenuto a partire da latte crudo senza aggiunta di colture starter. In breve, il latte crudo (50-60 l) è portato a 28 °C ed aggiunto di caglio di capretto naturale (0,4-0,5 g/l) quindi lasciato coagulare per circa 1 ora. La cagliata è posta in forma e scottata nel siero a 65 °C circa per 10 minuti, e mantenuta a temperatura ambiente per due giorni. Successivamente le forme sono immerse in salamoia (30% di NaCl) per 24 ore e poste a stagionare a temperatura di 14-15 °C e umidità dell'80-82% per circa un mese. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare il formaggio Caprino Nicastrese dal punto di vista chimico-fisico e microbiologico.

MATERIALI E METODI - Campionamento: Campioni di latte crudo, cagliata e formaggio a un mese di stagionatura sono stati prelevati presso due caseifici locali siti in provincia di Catanzaro.

Analisi microbiologiche: I campioni, mantenuti a bassa temperatura, sono stati trasportati presso il laboratorio di Microbiologia Agroalimentare del DiGeSA e immediatamente sottoposti ad analisi microbiologiche. Aliquote (10 g) di cagliata e di formaggio sono state sospese in 90 ml di soluzione fisiologica sterile (0,9% NaCl) ed omogeneizzate in Stomacher Lab-Blender 400 (Steward Medical, London, UK) per circa 5 minuti. Le sospensioni così ottenute e i campioni di latte crudo (10 ml) sono stati sottoposti a diluizioni seriali in soluzione fisiologica sterile e seminati in piastra su differenti terreni per la conta microbica. I terreni impiegati sono stati: MRS agar per la conta dei lattobacilli; M17 agar per la conta di streptococchi e lattococchi; SAB per la conta lieviti; VRBGA a 37 °C e a 44°C per la conta dei coliformi totali e fecali, rispettivamente; EC X-GLUC agar per la conta di *Escherichia coli*; MSA per la determinazione degli stafilococchi.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I risultati (espressi come log delle unità formanti colonia su ml o su g), riportati nella Tabella 1, hanno evidenziato una forte eterogeneità della popolazione microbica presente sia nel latte crudo sia nel formaggio. Elevati sono risultati i valori di ufc/ml per tutti i gruppi microbici ricercati. Per le due caseificazioni si osservano valori di carica mesofila compresi tra 6,88 e 9,30 log ufc/ml; valori di batteri lattici compresi tra 7,11 e 9,24 log ufc/ml; di streptococchi tra 7,48 e 9,11. Simili anche le conte relative ai lieviti. *Escherichia coli* e stafilococchi sono stati ritrovati solo nei campioni della seconda caseificazione. Tali risultati, da considerarsi preliminari, saranno oggetto di ulteriori approfondimenti. Una corretta gestione dei parametri tecnologici che influenzano lo sviluppo microbico garantirà in futuro la sicurezza microbiologica del formaggio Caprino Nicastrese nel rispetto e nella salvaguardia delle preziose caratteristiche di tipicità.

Microbiological characterization of the Nicastrese goat raw milk cheese. Preliminary results

Key words: traditional cheese, microbiological safety, typical, Nicastrese.

Bibliografia

Asso.Na.Pa (2013), Banca Dati. Consistenze della razza Nicastrese (Q2) in provincia di Catanzaro Anno 2013.

Cosenza G., Pauciullo A., Mancusi A., D'Avino A., Colimoro L., Di Bernardino D., Ramunno L. (2012), Identification of single nucleotide polymorphisms in the Nicastrese goat and Sardinia sheep mannose-binding lectin. Biochem Genet. 50(1-2):73-83.

De Nardo F. (2003), La razza caprina Nicastrese. News R.A.R.E. Dicembre, 16-18.

De Nardo F. (2011), Razze zootecniche in pericolo di estinzione: capra Nicastrese. Vita in Campagna. 12: 53.

Tabella 1 - Analisi microbiologiche dei campioni.

Campioni	pH	Cariche microbiche espresse come log cfu/ml o log cfu/g						
		MRS	M17	PCA	SAB	VRBGA	E. coli	MSA
Latte crudo (L1)	7,00	7,11	7,48	7,95	8,45	0	2,95	0
Cagliata (C1)	6,6	9,24	8,45	6,88	8,37	5,72	3,95	0
Formaggio a 30 giorni (F1)		8,01	8,07	7,64	7,03	2,95	0	0
Latte crudo (L2)	6,8	8,45	8,58	8.64	6,46	5,11	3,95	5,17
Cagliata (C2)	6,7	9,03	9,11	9,3	9,05	5,21	3,48	5,15

Stima dell'ereditabilità e della correlazione genetica con la produzione del latte di misure della persistenza della lattazione in ovini di razza Sarda

S. SALARIS, S. CASU, S. SECHI, M.G. USAI, A. CARTA

Unità di ricerca: Genetica e Biotecnologie, DIRPA-AGRIS Sardegna, 07100, Sassari, Italia

Parole chiave: componenti principali, parametri genetici, persistenza.

INTRODUZIONE - La persistenza della lattazione è un carattere di notevole importanza economica nei sistemi di produzione lattiero-casearia. È generalmente definita come l'abilità di mantenere elevati livelli produttivi dopo il picco di lattazione. Nei sistemi produttivi degli ovini da latte, principalmente localizzati nei paesi mediterranei e basati sul pascolamento, la persistenza assume un ulteriore significato. In tali sistemi, infatti, la produzione di latte risulta fortemente influenzata dal ciclo di crescita dell'erba che presenta due picchi produttivi in corrispondenza dell'autunno e soprattutto della primavera. Le pecore adulte partoriscono in autunno-inverno mentre le primipare alla fine dell'inverno-inizio primavera. La mungitura si protrae fino all'inizio dell'estate quando a causa della siccità estiva e della riduzione della qualità dell'erba, la mungitura viene interrotta simultaneamente per tutto il gregge indipendentemente dal livello produttivo. In questo periodo le lattazioni delle pecore con parto tardivo, in particolare delle primipare, mostrano ancora elevati livelli produttivi. Tale sistema di allevamento rende difficile la stima della persistenza potenziale delle lattazioni mentre assume particolare interesse economico l'abilità di una pecora di recuperare un significativo livello produttivo in corrispondenza della primavera, quando le condizioni ambientali sono favorevoli alla crescita dell'erba, in uno stadio di lattazione comunque avanzato. Macciotta et al. (2006) hanno proposto l'impiego di un'analisi multivariata delle componenti principali sulle produzioni giornaliere dei bovini da latte per identificare una misura della persistenza. Lo scopo del nostro studio era applicare lo stesso approccio per identificare una misura della persistenza della lattazione adatta alle specifiche condizioni di allevamento degli ovini in ambiente mediterraneo. In particolare, sono state stimate l'ereditabilità di misure della persistenza e le loro correlazioni genetiche con la produzione di latte.

MATERIALI E METODI - I dati si riferiscono a 58.675 produzioni di latte giornaliere (TD) registrate negli anni tra il 2000 e il 2012 con cadenza quindicinale alle due mungiture su 2.477 pecore di razza Sarda tra i 2 e 4 anni di età partorite tra Novembre e Gennaio. Sono state considerate solo le lattazioni con periodo di mungitura superiore ai 150 giorni (DIM). I caratteri considerati sono stati: la produzione di latte nell'intera lattazione espressa in equivalente pecora matura (MY); il rapporto tra la produzione primaverile e invernale (SWR) calcolate utilizzando rispettivamente i TD compresi tra il 1 aprile e il 31 Maggio e tra la data di inizio della mungitura e il 31 marzo. Inoltre, per tenere conto del livello produttivo al momento dell'interruzione estiva della mungitura, la lunghezza della mungitura potenziale (pML) è stata stimata in base alla durata del periodo necessario a raggiungere un livello di 300 ml con un decremento delle produzioni uguale a quello dell'ultima parte della lattazione effettiva. L'analisi delle componenti principali (CP) è stata eseguita su produzioni giornaliere a distanze dal parto definite (da 60 a 150 con intervalli di 15 giorni). Per l'analisi genetica sono state considerate le CP (CP1 e CP2) che nel loro insieme spiegavano oltre il 90% della variabilità originale. I parametri genetici di tutte le variabili considerate sono stati stimati con modelli animali con misure ripetute che includevano gli effetti fissi interazione anno di produzione e mese del parto e interazione anno di produzione, età e numero di agnelli e gli effetti casuali genetico additivo e ambiente permanente animale.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La media della produzione di latte è stata di 241±49 litri mentre quella di SWR di 0,54±0,21. Tale rapporto è condizionato anche dal fatto che la produzione invernale è stata ottenuta in media in un periodo di 88±19 giorni rispetto ai 60 della primaverile. La media di pML è stata di 249±48 giorni. CP1 (78,5% della variabilità), ha mostrato una correlazione simile con tutte le produzioni giornaliere a prescindere dallo stadio di lattazione (0.89 in media). CP2 (11,7% della variabilità) ha mostrato una correlazione negativa con le produzioni giornaliere della prima parte della lattazione (0.39 in media), vicino allo zero con quelle centrali e positiva (0.45 in media) con quelle della parte finale. Quest'andamento suggerisce che tale variabile, cosi come dedotto nei bovini da latte da Macciotta et al. (2006), possa essere utilizzata come indice di persistenza. In tabella 1 sono riportati i parametri genetici della produzione di latte (MY e CP1) e dei caratteri di persistenza (CP2, SWR e pML).

Tabella 1 - Ereditabilità e ripetibilità (in diagonale), correlazioni genetiche (sopra) e fenotipiche (sotto) dei caratteri considerati.

	CP1	CP2	MY	SWR	pML
CP1	**0,44; 0,66**	0,04	0,99	0,33	0,36
CP2	0,03	**0,21; 0,31**	0,09	0,92	0,62
MY	0,97	0,04	**0,45; 0,67**	0,40	0,45
SWR	0,11	0,42	0,16	**0,15; 0,23**	0,88
pML	0,10	0,17	0,15	0,04	**0,08; 0,13**

CP1 e MY hanno mostrato h^2 simili. SWR e pML hanno mostrato h^2 inferiori a CP2 e comunque nell'intervallo di valori riportati in letteratura (Gengler et al., 1996; Kominakis et al. 2002). CP2 ha mostrato una correlazione elevata e favorevole con SWR e pML. SWR e pML hanno mostrato correlazioni genetiche moderatamente positive con MY. Al contrario la correlazione genetica tra CP2 e MY è risultata trascurabile. Gengler et al. (1996) sostengono che una efficace misura di persistenza dovrebbe essere indipendente dalla produzione o corretta per l'influenza della produzione di latte. In conclusione, la selezione diretta di SWR e pML è limitata dalle inferiori ereditabilità e dalla non trascurabile correlazione con MY. Viceversa, CP2 è risultata altamente correlata con SWR, ha mostrato un'ereditabilità superiore a SWR e a pML e una debole correlazione genetica con MY.

Questo studio ha dimostrato che CP2 è un efficiente criterio di selezione per migliorare negli ovini da latte l'abilità di sfruttare condizioni ambientali favorevoli alla produzione di latte in primavera in uno stadio di lattazione avanzato in ambiente mediterraneo.

Heritability of persistency traits and their genetic correlations with milk yield in dairy sheep of sarda breed

Key words: principal components, genetic parameters, persistency.

Bibliografia

Gengler N. (1996), Persistency of lactation yields: a review. INTERBULL Bull. No. 12: 87-96.

Kominakis A.P., Bogdakis E. and Koutsotolis K. (2002), Genetic aspects of persistency of milk yield in Boutsico dairy sheep. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15: 315-320.

Macciotta N.P.P., D. Vicario, and A. Cappio-Borlino. (2006), Use of Multivariate Analysis to Extract Latent Variables Related to Level of Production and Lactation Persistency in Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 89: 3188-3194.

Determinazione della vitalità del *Mycoplasma agalactiae* in campioni di latte ovino mediante immunocattura

G. SANNA, G. CILLARA, N.M. ROSA, C. LONGHEU, M. FUSCO, M.G. MANCA, S. TOLA

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

Parole chiave: proteine di membrana, anticorpi, *Mycoplasma agalactiae,* immunocattura-PCR.

INTRODUZIONE - Il *Mycoplasma agalactiae* è ritenuto il principale agente eziologico responsabile dell'agalassia contagiosa (AC) nei piccoli ruminanti. Poiché l'AC si diffonde velocemente all'interno di un allevamento, è essenziale una rapida identificazione degli animali infetti e un loro isolamento. Le procedure standard di laboratorio utilizzate per identificare il *M. agalactiae* negli animali infetti sono lunghe e richiedono da 1 a 2 settimane di tempo. Il metodo standard prevede la semina dei campioni, provenienti da animali con sospetta AC, in piastre di agar Hayflick per 7 giorni a 37°C e la successiva identificazione delle tipiche colonie ad uovo fritto mediante tecniche biochimiche, sierologiche o, sempre più spesso, tramite PCR (Tola *et al*., 1996; Subramanian *et al*., 1998) o real-time PCR (Oravcova *et al.,* 2009). Tuttavia, l'identificazione di *M. agalactiae* mediante PCR non fornisce informazioni sulla vitalità e, perciò sull'infettività dei micoplasmi, in quanto il metodo non permette di discriminare il DNA proveniente dalle cellule morte da quelle vive. Gli obiettivi di questa ricerca sono stati: 1) sviluppare un metodo di immunocattura (IMC) utilizzando la combinazione di anticorpi policlonali anti-P55 e -P80 (due proteine di membrana di *M. agalactiae*) prodotti in agnello, 2) valutare la performance del metodo, 3) utilizzare il metodo IMC-PCR per isolare i micoplasmi vivi da campioni di latte positivizzati, combinando la capacità dell'IMC di differenziare i micoplasmi vivi da quelli morti con la specificità e sensibilità della PCR e 4) isolare i micoplasmi vivi nei campioni di latte ovino provenienti dall'attività diagnostica ordinaria.

MATERIALI E METODI - In questo lavoro abbiamo inoculato, in due differenti agnelli, le bande proteiche corrispondenti rispettivamente alla P80 e P55 del *M. agalactiae.*

Legame degli anticorpi anti-P80 e anti-P55 con biglie magnetiche attivate - Sono state utilizzate le biglie DynabeadsMyOne carboxylic acid (Invitrogen, Dynal AS, Oslo, Norway). L'attivazione delle biglie è stata effettuata utilizzando la soluzione idrofobica N-cyclohexyl-N-(2-morpholinethyl) carbodiimide methyl-p-toluensulfonate (CMC, Sigma, St. Louis, Mo) che migliora la resa e l'orientamento degli anticorpi immobilizzati. Dopo un'incubazione a 4° C per 30 min con CMC, le biglie sono state lavate con 25 mM 2-(n-morpholino)ethanesulfonic acid (MES, Sigma) pH 6.0, e messe a contatto con gli anticorpi in modo da instaurare dei legami tra i gruppi carbossilici attivati delle biglie e i gruppi amminici degli anticorpi.

Cattura immunomagnetica (IMC) di M. agalactiae risospesi in PBS e latte- A partire da colture di *M. agalactiae* in fase log. di crescita, sono state allestite diluizioni seriali decimali in terreno di Hayflick. Un ml di ciascuna diluizione è stato centrifugato e il pellet risospeso sia in PBS che in latte. Il numero dei micoplasmi inoculati, stimato in base all'ultima diluizione seriale della coltura con evidente viraggio di colore determinato dalla crescita batterica, è stato espresso in Colony Changing Units (CCU/ml). I campioni positivizzati sono stati processati mediante IMC utilizzando 10 µl di biglie rivestite di anticorpi anti-P80 e 10 µl di particelle magnetiche rivestite di anticorpi anti-P55. Dopo un'incubazione a 37°C per 1 ora in leggera agitazione, i complessi micoplasmi-particelle magnetiche sono stati separati dalla sospensione, lavati tre volte con PBS contenente 0.05% Tween 20 (PBST) e risospesi in 100 µl di TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). A questo punto, i campioni sono stati incubati a 100 °C per 15 min e centrifugati a 7.500 rpm per 5 min. Cinque µl di supernatante sono stati utilizzati in ciascuna reazione di PCR (Tola *et al.,* 1996).

Cattura immunomagnetica (IMC) di M. agalactiae da campioni routinari di latte ovino-In questa ricerca, abbiamo analizzato 516 campioni di latte ovino raccolti nel periodo 2012-2013, provenienti da 61 allevamenti con sospetta agalassia contagiosa. Un'aliquota di 850 µl di ciascun campione di latte è stata diluita con 150 µl di PBST e miscelata con cura con 10 µl di biglie rivestite con anticorpi anti-P80 e 10 µl di biglie rivestite con anticorpi anti-P55. Dopo un'incubazione di 1 ora a 37°C in leggera agitazione, i complessi micoplasmi-biglie sono stati processati come descritto prima. Il metodo colturale è stato utilizzato come test comparativo: tutti i 516 campioni di latte sono stati seminati in piastre di agar Hayflick, incubati a 37°C per 5 giorni in camera umida ed osservati con il microscopio a luce invertita Axiovert della Zeiss

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Uno degli obiettivi di questa ricerca era sviluppare un metodo di immunocattura per arrivare a diagnosticare la presenza di micoplasmi vivi nel latte clinico. L'efficienza di cattura ottenuta con il metodo IMC-PCR è risultata di 10-10^2 CCU/ml con le colture risopese in PBS e di 10^2-10^3 CCU/ml con i campioni di latte positivizzati. L'IMC-PCR è stata applicata anche ai campioni di latte provenienti da allevamenti con sospetta agalassia contagiosa. Dei 516 campioni di latte ovino analizzati nel periodo 2012-2013, 473 sono pervenuti nei nostri laboratori nell'arco di 24-48 ore, mentre 43 dopo 3-10 giorni. Pur applicando l'IMC-PCR a tutti i campioni, dall'analisi finale abbiamo escluso i 43 campioni in quanto la crescita di altri batteri in terreno di Hayflick impediva l'osservazione delle colonie ad uovo-fritto al microscopio ottico. Il confronto tra i risultati ottenuti con il metodo colturale e con l'IMC-PCR ha evidenziato che solo 9 campioni sono sfuggiti a quest'ultima analisi. Tali campioni "falsi-negativi" li abbiamo riscontrati in 9 allevamenti diversi. È importante sottolineare che, in caso di sospetta agalassia contagiosa, consigliamo di recapitare presso l'IZS della Sardegna un numero di campioni pari al 5-10% del gregge.

Development of a specific immunomagnetic capture-PCR for rapid detection of viable *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples

Key words: membrane surface proteins, antibodies, Mycoplasma agalactiae, immunocapture-PCR

Bibliografia

Tola S., Idini G., Manunta D., Galleri G., Angioi A., Rocchigiani A.M., Leori G. (1996), Rapid and specific detection of Mycoplasma agalactiae by polymerase chain reaction. Vet Microbiol 50:77-84.

Subramaniam S., Bergonier D., Poumarat F., Capaul S., Schlatter Y., Nicolet J., Frey, J. (1998), Species identification of Mycoplasma bovis and Mycoplasma agalactiae based on the uvrC genes by PCR. Mol Cell Probes 12:161-169.

Oravcova K., Lopez-Enriquez L., Rodriguez-Lazaro D., Hernandez M. (2009), Mycoplasma agalactiae p40 gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. J Clin Microbiol 47: 445-450.

Episodi di aborti e nati-mortalità associati ad infezione da *Coxiella burnetii* in un allevamento caprino: gestione sanitaria del caso

G. SARALLI[1], G. BRUNI[1], T. GALLI[1], A. GIOIA[2], M. VELLUCCI[2], M.R. CECCARELLI[3], A. FAGIOLO[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana - Sezione di Latina
[2] Azienda USL Latina - Servizio Sanità Animale Distretto Latina-Pontinia
[3] Medico Veterinario Libero Professionista

Parole chave: Coxiellosi, aborti, natimortalità, profilassi.

INTRODUZIONE - *Coxiella burnetii* (famiglia *Coxiellaceae*, ordine *Legionellales*) è un batterio Gram negativo, pleomorfo, di piccole dimensioni, parassita intracellulare obbligato, che nella sua forma vegetativa si presenta in due varianti morfologiche, una a grandi cellule (LCV) associata a forme di replicazione e una a piccole cellule (SCV) associata a forme di resistenza (Raoult *et al.*, 2005). È agente causale della Febbre Q nell'uomo ed è capace di infettare anche diverse altre specie, inclusi artropodi, pesci, uccelli, rettili e mammiferi (Aitken, 1989), tra cui i ruminanti sono considerati il principale *reservoir* della malattia. È caratterizzato da elevata stabilità ambientale e resistenza (attivo in terreni, polveri, feci di zecche, pellame, latte crudo, e suoi derivati per alcuni mesi) e viene eliminato dall'ospite attraverso escreti (feci, urine, secreti vaginali, liquido amniotico) e secreti (latte, colostro). La trasmissione avviene in genere per via aerogena, eccezionalmente mediante zecche; scarsamente probabile, invece, la trasmissione verticale, venerea e alimentare (Raoult *et al.*, 2005; Welsh *et al.*, 1958). La Coxiellosi è una malattia diffusa in tutto il mondo, esclusa la Nuova Zelanda (Greenslade *et al.*, 2003); è endemica nella maggior parte degli stati UE e in Italia, negli allevamenti di ruminanti domestici (bovini, ovini e caprini), è diffusa con prevalenze variabili tra il 2% e il 14% ed è stata dimostrata la sua implicazione nel 5% di casi di aborti e fenomeni di infertilità nei bovini e nel 9.5% negli ovi-caprini (Capuano *et al.*, 2004); di recente è stata associata anche a fenomeni di aborto nel bufalo (Perugini *et al.*, 2009). Tuttavia la capra sembra sia la specie domestica più suscettibile al rischio di infezione, provocando principalmente aborto, metriti, placentiti, raramente nati-mortalità e cherato-uveiti (Hendrik-Jan *et al.*, 2012; Gruppillo *et al.*, 2006).
L'infezione è caratterizzata talvolta da stagionalità con incrementi di incidenza in concomitanza con la stagione dei parti o la stagione di maggiore circolazione dei vettori.

MATERIALI E METODI - In un allevamento intensivo di capre di razza Maltese (550 capi), nel periodo dicembre 2013 - gennaio 2014 si sono verificati alcuni casi di aborto e numerosi casi di nati-mortalità precoce. La mortalità dei capretti era associata a una sindrome caratterizzata da debolezza, astenia, disoressia e depressione del sensorio.
Accertamenti diagnostici sono stati eseguiti tramite esami sierologici indiretti, esami anatomo-patologici, microbiologici e biomolecolari. Gli esami sierologici sono stati eseguiti mediante test specifici nei confronti di diversi patogeni: Kit ELISA IDVET ID Screen® *Chlamydophila abortus* Indirect Multi-species, Kit ELISA IDVET ID Screen® Q Fever Indirect Multi-species, Kit ELISA IDVET ID Screen® *Neospora caninum* Indirect Multi-species, siero-agglutinazione lenta per *Salmonella Abortus ovis* e *Toxoplasma gondii* e ELISA IDEXX CAEV/MVV Antibody test Kits. Gli esami anatomo-patologici sono stati eseguiti su cinque soggetti venuti a morte nelle prime 12 ore di vita, mentre gli accertamenti diagnostici diretti sono stati eseguiti da organi prelevati in sede autoptica (esami batteriologici per ricerca di *Salmonella* spp, *Listeria* spp, *Campylobacter* spp e altri agenti batterici patogeni; esami biomolecolari in PCR per *Chlamydiales*, *Coxiella burnetii*, *Neospora caninum* e *Toxoplasmatidae*).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Agli esami sierologici eseguiti su 19 campioni prelevati da capre interessate da aborto o nati-mortalità precoce, sono risultati positivi 2 campioni per clamidiosi (10%), uno per *Neospora caninum* (5%), 2 per *Toxoplasma gondii* (10%), 15 per *Coxiella burnetii* (79%) e 11 per CAEV (58%). All'esame anatomo-patologico è stato possibile osservare soltanto modica quantità di liquido siero-emorragico in cavità peritoneale, congestione epatica e splenica. Tutti gli accertamenti diagnostici diretti hanno dato esito negativo ad eccezione della PCR per *Coxiella burnetii*, risultata positiva da fegato e milza di tutti i cinque capretti controllati. A seguito della diagnosi, si è proceduto alla segnalazione del caso mediante il SIMAN (MinSal) e sono state date all'allevatore prescrizioni per la gestione di un piano di controllo basato su misure finalizzate alla prevenzione del rischio di diffusione della malattia e di trasmissione all'uomo. Prioritariamente, sono state ordinate le misure restrittive obbligatorie previste dal Regolamento di Polizia Veterinaria (DPR 8 febbraio 1954, n° 320) e, per la gestione sanitaria del caso clinico, sono state date le seguenti prescrizioni: a) rispetto di norme di biosicurezza basate sull'isolamento degli animali ammalati, pulizia e disinfezione degli ambienti di stabulazione e zone destinate ai parti, allontanamento e distruzione dei prodotti del parto; b) trattamenti antiparassitari efficaci contro ectoparassiti potenziali vettori; c) piano di derattizzazione; d) controllo sierologico e cura (o allontanamento) dei cani eventualmente risultati infetti; e) definizione di un programma di sorveglianza attiva dei casi clinicamente riferibili alla malattia (aborti, nati-mortalità e sindromi respiratorie acute associate a ipertermia, anche nei soggetti adulti). Inoltre, considerando che è stata già ampiamente dimostrata l'efficacia della vaccinazione nel ridurre l'incidenza degli aborti e l'eliminazione dell'agente infettante nei ruminanti (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005), è stato prescritto un piano vaccinale mediante l'uso di Coxevac® (CEVA), un vaccino commerciale inattivato registrato per bovini e caprini basato sulla inattivazione della fase 1 di *C. burnetii*.

An outbreak of abortion and stillbirth caused by *Coxiella burnetii* in caprine herd

Key word: Q fever, abortion, stillbirth, prophylaxis.

Bibliografia

Aitken I.D. (1989), Clinical aspects and prevention of Q fever in animals. Eur J Epidemiol 5: 420-424.

Arricau-Bouvery N., Souriau A., Bodier C., Dufour P., Rousset E., Rodolakis A. (2005), Effect of vaccination with phase I and phase II Coxiella burnetii vaccines in pregnant goats. Vaccine, 23: 4392-4402.

Capuano F., Parisi A., Cafiero M.A., Picaro L., Fenizia D. (2004), Coxiella burnetii: quale realtà? Parassitologia 46: 131-134.

Greenslade E., Beasley R., Jennings L., Woodward A., Weinsein P. (2003), Has Coxiella burnetii (Q fever) been introduced into New Zeland? Emerg Infect Dis 9: 138-140.

Hendrik-Jan R., van Gelderen B., Dinkla A., Frangoulidis D., van Zijderveld F., Rebel J., van Keule L. (2012), Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of Coxiella burnetii. PloS One 7(11): e48949. doi:10.1371/journal.pone.0048949.

Gruppillo A., Di Pietro S., Incardina A., Bonanno G., Currò V., De Majo M. (2006), Kerato-uveitis in sheep: clinical and serological patterns. The Ruminant Science.

Perugini A.G., Capuano F., Esposito A., Marianelli C., Martucciello A., Iovane G., Galiero G. (2009), Detection of Coxiella burnetii in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: a preliminary report. Res Veterinary Science 87: 189-191.

Raoult D., Marrie T.J., Mege J.L. (2005), Natural history and pathophysiology of Q fever. Lancet Infect Dis 5: 219-226.

Welsh H.H., Lennette E.H., Abinanti F.R., Winn J.F. (1958). Air-borne transmission of Q fever: the role of parturition in the generation of infective aerosol. Ann. N.Y. Accademy Science 70: 528-540.

La paratubercolosi negli ovini e caprini: I. Prolegomeni allo studio delle cause predisponenti a questa malattia

R. SARDARO[1], L. CASOLI[1], A. CONTE[1], N. DIBENEDETTO[1], A. MICCOLIS[1], A. BATTISTA[2], D. SCALTRITO[2], F. PETAZZI[1]

[1] DETO - Sez. Cliniche Veterinarie e Produzioni Animali - Università di Bari
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata

Parole chiave: paratubercolosi, management, fattori di rischio.

INTRODUZIONE - La paratubercolosi, o enterite paratubercolare (conosciuta anche come malattia di Johne), è una patologia infettiva ad andamento cronico sostenuta da *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). È diffusa ovunque si pratichi l'allevamento ovino e caprino, rappresentando una delle malattie infettive più importanti per i danni arrecati agli allevamenti. Alla diffusione del MAP hanno contribuito specifici fattori gestionali, ma soprattutto la commercializzazione incontrollata di animali, con conseguente aumento dell'incidenza della malattia e prevalenza di allevamenti infetti ormai variabile tra il 7 ed il 60% su scala mondiale. In questo quadro si colloca il progetto PON "EpiSud-Programma per lo sviluppo di metodologie per l'identificazione ed il controllo di infezioni micobatteriche animali", che vede il Parco Tecnologico Padano come proponente e l'Istituto Zooprofilattico della Sicilia nonché l'Università degli Studi di Bari Aldo Moro (DETO-Sez. Cliniche veterinarie e Produzioni Animali) in qualità di partner. L'Università di Bari, in particolare, sta conducendo un'indagine epidemiologica in Puglia su allevamenti estensivi ovini e caprini al fine di studiare la prevalenza della malattia ed i fattori di rischio scatenanti l'infezione in relazione alle pratiche gestionali adottate dagli allevatori. L'indagine è ancora *in fieri* ed è prematuro trarre conclusioni circa i dati epidemiologici; è tuttavia possibile, ancorché su dati parziali, avanzare ipotesi circa i fattori di rischio. Data la natura complessa di detti fattori, per l'analisi è stato scelto un approccio multivariato, cosicché nel presente lavoro si riportano i risultati dei primi dati raccolti mediante la somministrazione agli allevatori di un'apposita scheda aziendale, redatta al fine di reperire una serie di informazioni di carattere strutturale, igienico-sanitario e gestionale.

MATERIALI E METODI - Lo studio ha interessato le prime 61 schede aziendali raccolte, la cui classificazione in base alla tipologia di allevamento ed al riscontro al test ELISA per la presenza del MAP, è riportata in tabella 1. L'analisi statistica, effettuata in ambiente R (Torgo, 2010), è stata di tipo univariato e multivariato. In quest'ultimo caso è stato implementato un modello logistico in cui l'unità sperimentale è il singolo capo, la cui positività al MAP è stata utilizzata come variabile risposta, mentre un set di caratteristiche intrinseche (età e sesso) ed estrinseche ai capi (derivanti dalle schede aziendali) sono state adoperate come predittori. Per la selezione delle variabili maggiormente significative tra le 124 iniziali è stata adoperata in prima battuta la matrice di correlazione basata sul calcolo dell'indice di Cramer'sphi, conseguentemente alla presenza di variabili nominali. Successivamente il criterio *stepwise* nel modello logit ha consentito un ulteriore affinamento nel processo di scelta dei predittori maggiormente influenti la positività dei capi. In tal caso il valore soglia in ingresso e in uscita delle variabili è stato impostato a 0,2, scelta prudenziale a causa della bassa percentuale di allevamenti ad oggi esaminata (Brauer e Castillo-Chavez, 2012).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La consistenza media degli allevamenti è pari a 205 capi, con un numero minimo e massimo di unità rispettivamente pari a 18 e 801, ad indicare l'elevata eterogeneità delle aziende indagate. I 3.271 capi campionati comprendono razze in purezza e soggetti meticci, informazione che tuttavia non è stata inserita nel modello in quanto non può essere considerata una variabile casuale, non essendo le 61 aziende rappresentative della distribuzione razziale del campione globale. Osservando la tabella 2 in cui si riportano i risultati del modello logit, si possono enucleare le prime due voci che riguardano variabili di tipo biologico, entrambe altamente significative. In particolare, la probabilità di riscontrare un capo positivo è direttamente correlata alla giovane età (P<0,0068), nonché ad allevamenti misti con presenza di capre (P<0,0001). Altri fattori di rischio di natura non biologica sono allevamenti di piccole dimensione misti con altre specie (P<0,0001), la contaminazione fecale di acqua e alimenti (P<0,0001) e la presenza di ristagni idrici all'interno dell'ovile (P<0,0003). Nel complesso, rilevanti risultano gli aspetti relativi alla professionalità dell'allevatore che sembrano strettamente correlati con i fattori di rischio; ed infatti la capacità dell'allevatore nel riconoscere i giovani capi (P<0,0066), la conduzione delle nascite in box individuali, il confino in recinti separati della rimonta e la turnazione dei pascoli risultano fattori limitanti la diffusione dell'infezione. In sintesi,6 variabili su 9 risultano significative(P< 0,001) e comunque tutti i coefficienti presentano i segni attesi in base a considerazioni di tipo teorico-pratico. Concludendo, quindi, nonostante le esigue dimensioni del campione esaminato (13% del totale degli allevamenti visitati) l'attendibilità di queste prime analisi appare altamente plausibileil che porta a presumere che i risultati possano essere confermati successivamente nell'analisi del campione totale.

Tabella 1 - Descrizione del data set ottenuto dall'analisi di un campione di 61 schede aziendali per un totale di 3271 capi.

Connotazione aziendale	N	%	Negativi	Positivi
Allevamenti ovini	13	21,3	7	6
Allevamenti caprini	14	23,0	1	13
Allevamenti misti	34	55,7	4	30
Numero capi ovini	1.537	65	1.476	61
Numero capi caprini	1.667	35	1.324	343

Tabella 2 - Modello logitmultivariato stepwise.

Coefficients	Est.	Std. err.	zvalue	Pr (>|z|)
Intercetta	-2,5518	0,2361	116,8314	0,0001
Età capo	-0,0057	0,0021	7,3160	0,0068
N. capre allevamento	0,0032	0,0005	45,6227	0,0001
Altre specie in piccoli allevamenti	0,7028	0,1748	16,1690	0,0001
Presenza acque stagnanti nell'ovile	0,4780	0,1310	13,3180	0,0003
Permanenza rimonta in recinti separati	-0,1696	0,1272	1,7763	0,1826
Riconoscimento figlio/madre da parte dell'allevatore	-0,3459	0,1273	7,3871	0,0066
Nascite in box individuali	-0,2904	0,1831	2,5162	0,1127
Contaminazione fecale di acqua e alimenti	0,8733	0,1896	21,2087	0,0001
Turnazione dei pascoli	-0,0131	0,0111	1,4031	0,1362
N = 3.271				
Rapporto verosom. = 118,9398		p>chi quadr. = 0,0001		

Paratubercolosis in sheep and goats in Apulia: I. Prolegomena to the study of the cause predisposing to the diseases

Key words: paratuberculosis, management, risk factors.

Bibliografia

Brauer F., Castillo-Chavez C. (2012), Mathematical Models in Population Biology and Epidemiology. Springer, 2nd edition.

Torgo L. (2010), Data mining with R learning with case studies, Chapman & Hall/CRC Data Mining and Knowledge Discovery Series.

Ulteriori acquisizioni sull'influenza dei nematodi gastro-intestinali sulla fertilità delle pecore

A. SCALA[1], A. SPEZZIGU[2]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Sassari
[2] Embryosardegna, tecnologia riproduzione e fertilità, Perfugas (SS)

Parole chiave: ovino, fertilità, nematodi gastro-intestinali.

INTRODUZIONE - È ormai noto che la presenza di nematodi gastro-intestinali (NGI) può ridurre le performances produttive degli ovini, mentre l'influenza di questi parassiti sulla loro fertilità, quantunque spesso ipotizzata, è dimostrata solo raramente.
Recentemente, in esperienze di campo condotte in Sardegna su ovini di razza sarda da latte naturalmente infestati da NGI sono state monitorate le possibili interferenze sulla produzione di latte (Sechi *et al*., 2010) o sulla qualità del seme di arieti infestati sperimentalmente con L3 di trichostrongilidi (Gaglio *et al*., 2010), nonché sui tassi di gravidanza (Scala *et al*., 2012).
Per apportare un ulteriore contributo allo studio dell'influenza dei NGI sulla fertilità delle pecore da latte si è voluto in questa sede riportare i risultati di un'ulteriore prova di campo condotta in Sardegna, dopo quella attuata da Scala *et al.* (2012), per ampliare la casistica relativa all'influenza dei NGI sui tassi di gravidanza, attraverso il monitoraggio delle loro Uova per Grammo di feci (UPG) e contemporaneamente delle condizioni di Body Condition Score (BCS).
In particolare in questa fase della ricerca i dati sono stati elaborati per pecore vuote in anestro e vuote che ciclavano.
MATERIALE E METODI - L'indagine è stata condotta in 269 pecore sarde da 6 diversi greggi di pecore di razza Sarda da latte allevati in Sardegna (Italia). Sui gruppi di studio è stato utilizzato "l'effetto maschio" per indurre il calore negli ovini (ciclo estrale). In ogni ovino lo stato di gravidanza veniva diagnosticato mediante ecografia, utilizzando un ecografo ALOKA SSD -500 con sonda lineare di tipo 7,5 MHz prostate, 18-20 giorni dopo l'accoppiamento naturale. Contemporaneamente veniva, sempre eco-graficamente, valutato anche lo stato funzionale delle ovaie delle pecore vuote (ovaie in anestro o con corpo luteo).
In particolare sono state scelte per questa indagine 131 pecore gravide e 138 vuote, di cui 115 in anestro.
Analisi copromicroscopiche - I campioni fecali sono stati prelevati dal retto da ciascun animale incluso nella prova ed processati in laboratorio con la tecnica quali-quantitativa di McMaster, per valutare il numero di UPG, con una soluzione flottante di NaCl (ps 1200) e cut- off di 15 UPG.
Rilevamento BCS - Il BCS veniva valutato al momento della diagnosi ecografica di gravidanza. La valutazione della condizione corporea era basata su una scala di 5 punti, con frazioni di un quarto di punto.
Analisi statistica - I dati sono stati importati in un database e poi elaborati tramite il software Mintab release 12.1. Il tipo di distribuzione, normale o non, dei valori di UPG e di BCS nelle pecore monitorate è stato valutato con il test di Kolmogorov-Smirnov. Essendo risultati i dati distribuiti non normalmente, per il confronto delle medie tra i gruppi, sia in generale e all'interno di ciascun gregge, è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney per due campioni indipendenti.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I valori medi di UPG e degli score di BCS con le relative Deviazioni Standard (DS) e i risultati delle analisi statistiche relative al confronto tra le medie sul totale delle pecore monitorate delle 6 greggi sono riportati nella Tabella n°1.
L'emissione media di UPG per i NGI evidenziata anche in questa indagine, così come in quella condotta in precedenza (Scala *et al*., 2012), risultava significativamente maggiore di quelle gravide (P<0,05), ma non rispetto a quelle vuote non in anestro (P>0,05). È possibile quindi che i NGI oltre una soglia di valori medi di UPG ≥ di 450 possano causare uno stato di anestro, mentre la mancata gravidanza in pecore che però stavano ciclando dovrebbe essere attribuita, in virtù dei livelli medi di UPG di NGI rilevati in questa categoria di pecore, ad altre cause/concause presenti in allevamento.

Tabella 1 - Valori medi UPG e degli score di BCS nelle pecore monitorate, insieme ai rispettivi valori di DS.

	gravide (n°131)	vuote (n°138)	vuote in anestro (n°115)	vuote con corpo luteo (n°23)
Medie UPG	264,47[a]	427,7[b]	471,5[b]	208,7[a]
DS UPG	660,90	624,7	664,5	286,9
Medie BCS	2,536[a]	2,3175[b]	2,3026[c]	2,3913[c]
DS BCS	0,2195	0,2238	0,2168	0,0517

Le medie riportate in ogni linea della tabella con differenti lettere in esponente differiscono tra loro in modo significativo (P<0,05).

È inoltre interessante rilevare come anche le medie dei valori di BCS si confermino significativamente inferiori nelle pecore gravide rispetto alle vuote (P<0,05), sia in anestro che con corpo luteo, anche se in quest'ultimo caso sono stati riscontrati valori di BCS significativamente inferiori rispetto a quelli degli animali in gravidanza (P<0,05).
Alla luce di questi risultati, il monitoraggio copromicroscopico quantitativo per determinare i valori di UPG per i NGI prima della stagione degli accoppiamenti, potrebbe rappresentare un'azione sanitaria di monitoraggio utile per stabilire l'opportunità o meno di attuazione di un trattamento antielmintico.
L'eventuale intervento farmacologico potrebbe garantire così, in presenza di livelli medi di UPG ≥ 450, un incremento importante della fertilità con ripercussioni positive sull'economia aziendale.
Ulteriori sviluppi di tali aspetti dovrebbero essere indagati al fine di individuare la dinamica dell'azione dei NGI in questo senso, per individuare le fasi in cui questa interviene (ovulazione, attecchimento e/o sviluppo dell'embrione).

Further acquisitions on gastro-intestinal nematodes influence on sheep fertility

Key words: sheep, fertility, gastro-intestinal nematodes.

Bibliografia

Gaglio G., Poglayen G., Capelli G., Gruner L., Mara L., Giannetto S., Scala A., (2010), Influence of gastrointestinal trichostrongylidosis on ram fertility. Polish Journal of Veterinary Sciences 13(4): 743-748.

Scala A, Spezzigu A, Soriolo A, Salamina V., Bassini A., Sanna G., Pipia A.P., Solinas C., Capelli G., (2012), The gastro-intestinal nematodes as reducing fertility factor in Sarda breed sheep: field experiences, Atti Femesprum 19: 340-343.

Sechi S., Giobbe M., Sanna G., Casu S., Carta A., Scala A., (2010), Effects of anthelmintic treatment on milk production in Sarda dairy ewes naturally infected by gastrointestinal nematodes. Small Ruminant Research 88(2-3): 145-150.

Valutazione dell'efficacia del toltrazuril e del diclazuril nel controllo dell'eimeriosi subclinica in agnelli svezzati di razza sarda

A. SCALA[1], P.P. MULA[1], G. SANNA[1], C. SOLINAS[1], F. DORE[1], A.P. PIPIA[1], G. SOTGIU[2], L. NISOLI[2], A. CARTA[3], A. VARCASIA[1]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari (Italy)
[2] Bayer Animal Health Italy
[3] Agris Sardegna, Olmedo - Sassari, Italy

Parole chiave: *Eimeria*, toltrazuril, diclazuril, agnello.

INTRODUZIONE - La coccidiosi ovina è una patologia sostenuta da protozoi del genere *Eimeria* e costituisce un rilevante problema sanitario, in quanto può essere causa diretta di mortalità, soprattutto nei giovani animali.
Alla luce di quanto sopra riportato si è ritenuto utile verificare, in condizioni di campo, su agnelli di razza sarda da rimonta, l'efficacia del trattamento a base di toltrazuril e di diclazuril verso le infezioni parassitarie naturali causate da coccidi del genere *Eimeria* che infettano gli ovini.
MATERIALE E METODI - Lo studio è stato condotto su n°142 agnelle da rimonta tra i 45 e i 60 giorni stratificate in 3 gruppi di 46, 48 e 48 animali, rispettivamente contrassegnati con le sigle TOLT, DICL e C (Controllo) e trattate al Giorno 0 secondo lo schema di seguito riportato:
- Gruppo TOLT - trattamento (T0) con un'unica dose di sospensione orale di toltrazuril (Baycox® ovino- 50 mg toltrazuril/ml, Bayer Animal Health, Leverkusen, Germany) al dosaggio di 20 mg/Kg di peso vivo (p.v.), corrispondente a 0,4 ml/Kg di p.v.; Gruppo DICL - trattamento (T0) con un'unica dose di sospensione orale di diclazuril (Vecoxan®-2,5 mg/ml, Janssen-Cilang, Beerse, Belgio) al dosaggio di 1 mg/Kg di p.v., corrispondente a 1 ml/2,5 Kg di p.v.; - Gruppo C - somministrazione di un volume corrispondente di H_2O. Indagini copromicroscopiche quali-quantitative sono state effettuate su campioni individuali di feci, raccolti dall'ampolla rettale a partire dal giorno del trattamento (T0) e in seguito a cadenza settimanale per le 9 settimane successive (T1, T2, … T9). Su ciascun campione fecale sono state eseguite le seguenti tecniche copromicroscopiche: metodo di arricchimento per flottazione con soluzione satura di Cloruro di Sodio; tecnica di McMaster modificata, con sensibilità di 50 oocisti per grammo di feci (opg). Da campioni positivi sono state allestite coprocolture in bicromato di potassio al 2,5% al fine di valutare le caratteristiche morfometriche delle oocisti per la loro classificazione (Eckert et al., 1995). Nel corso dello studio è stato valutato il peso vivo degli agnelli al tempo T0 e poi alla fine della sperimentazione T9. La stima dell'efficacia dei trattamenti, espressa come percentuale (%) di riduzione dell'escrezione oocistica, è stata calcolata applicando la seguente formula: (M opg C tempo^n - M T tempo / M opg C tempo^n x 100(dove M= media aritmetica, n= tempo dei vari controlli parassitologici, C= controllo; T= trattati).
RISULTATI - Al giorno T0 (giorno del trattamento) tutti i 142 agnelli sono risultati positivi agli esami copromicroscopici per infezioni da *Eimeria* spp. con le seguenti medie: Gruppo TOLT 48.777,17 opg; Gruppo DICL 38.653,13 opg; Gruppo C 51.393,75 opg. Il test non parametrico di Mann-Whitney non ha evidenziato a T0 alcuna differenza significativa tra i gruppi.
Nel Gruppo C non è stata registrata nessuna differenza statisticamente significativa nell'eliminazione delle oocisti fino a T3, in seguito al quale si è rilevata una progressiva diminuzione ($p < 0.05$) fino a raggiungere il valore minimo a T9 (media 9.152,08). A T2, è stata evidenziata una diminuzione significativa dell'eliminazione delle oocisti sia nel Gruppo TOLT (media 467,39) che nel Gruppo DICL (media 17.671,88); allo stesso tempo i valori di opg del Gruppo TOLT differivano significativamente sia da quelli del Gruppo C che del Gruppo DICL ($p < 0.05$). A T2, i Gruppi TOLT (1.236,41 opg) e DICL (19.966,67 opg) differivano ancora dal Gruppo C. A T3, soltanto gli agnelli del Gruppo TOLT avevano un numero di opg statisticamente differente dal Gruppo C ($p < 0.05$). A partire da T4 fino alla fine dello studio (T9) non è stata registrata nessuna differenza statisticamente significativa tra i due Gruppi di trattamento e il Gruppo C. Nella Tabella 1 sono riportate le percentuali di riduzione dell'eliminazione delle oocisti durante il trial.
Sono stati individuati 10 morfotipi differenti di *Eimeria* spp.: *E. ahsata*, *E. crandallis/weybridgensis*, *E. ovinoidalis*, *E. bakuensis*, *E. parva*, *E. intricata*, *E. marsica*, *E. faurei*, *E. pallida* ed *E. granulosa*; quelle con percentuali di frequenza più elevate in tutta la prova sono state *E. bakuensis, E. crandallis/weybridgensis* ed *E. ahsata.* Le medie degli incrementi ponderali sono aumentate significativamente durante il corso dello studio nei tre Gruppi di agnelli ($p < 0,001$). Il Gruppo TOLT ha mostrato la media di incremento ponderale più elevata (39,7%) di 6.578,3 ± 1.374,6 g a T9, differente statisticamente dagli agnelli del Gruppo C ($p < 0,05$). Non è stata riscontrata nessuna differenza tra il Gruppo DICL e il Gruppo C.
CONCLUSIONI - In conclusione possiamo affermare come soprattutto il trattamento con toltrazuril negli agnelli di razza sarda da rimonta di circa 2 mesi d'età comporti un controllo efficace dell'infezione da *Eimeria* spp. per almeno 3 settimane, mentre la % di riduzione del diclazuril in questa categoria di animali non ha mai superato il 90%, con valori massimi di circa 85% ad una settimana e un decadimento a 58,5% già a 2 settimane. Inoltre il trattamento con il toltrazuril ha determinato una diminuzione delle % di frequenza, non solo nei confronti di *E. ahsata*, come anche nel caso del diclazuril, ma anche di *E. crandallis*, specie ritenuta particolarmente patogena per gli ovini. La % di incremento ponderale evidenziata nel Gruppo TOLT è risultata maggiore rispetto ai soggetti del Gruppo DICL (39,7 *vs* 35,2%).

Evaluation of the efficacy of toltrazuril and diclazuril in the control of subclinical eimeriosis in sarda weaned lambs

Key words: *Eimeria*, toltrazuril, diclazuril, lamb.

Bibliografia

Eckert J., Taylor M., Carchpole J., Licois D., Coudert P., Bucklar H. (1995), Identifications of Eimeria species and strains. Biotecnology, guidelines on techniques in coccidiosis research, COST 89/820 EUR 16602 EN: 103 119.

Tabella 1 - Percentuale di riduzione dell'eliminazione delle oocisti durante il trial.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Group Tolt	99,1%	97,4%	76,3%	8,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
Group Dicl	64,4%	58,5%	12,7%	3,7%	0,0%	0,0%	16,1%	0,0%	0,0%

Il caglio in pasta utilizzato per la produzione di formaggi tradizionali siciliani: indagine microbiologica

M.L. SCATASSA, I. MANCUSO, L. ARCURI[1], A. PARCO, M. CRUCIATA[2], M. TODARO[2], C. CARDAMONE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" Palermo
[1] ASP 6 Palermo; [2] Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

Parole chiave: caglio in pasta, formaggi tradizionali siciliani, composizione microbica.

INTRODUZIONE - La produzione casearia siciliana tradizionale è storicamente rappresentata da formaggi prodotti con cagli in pasta ottenuti direttamente in azienda dalla lavorazione artigianale dell'abomaso di agnelli o capretti alimentati solo con latte e macellati a circa 30-50 giorni di età. Ad oggi, per l'evoluzione delle condizioni sociali, economiche ed igieniche si sta diffondendo l'uso di cagli in pasta prodotti industrialmente.
Il caglio, complesso enzimatico ancora solo parzialmente noto, oltre ad essere un coadiuvante tecnologico, diventa un vero e proprio ingrediente poiché è in grado di apportare una flora microbica che può intervenire sia nella fase della coagulazione che nella maturazione dei formaggi (Santillo *et al*., 2007; Cruciata *et al.,* 2014). Nonostante il ruolo centrale dei cagli nel processo di caseificazione, i regolamenti comunitari in materia di sicurezza alimentare non ne individuano condizioni di produzione o specifici criteri microbiologici.
Nell'ambito delle indagini sui formaggi tradizionali siciliani si è indagato sulla composizione microbica dei cagli per valutare la presenza di flora lattica o, eventualmente, di flora indesiderata o patogena.
MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto presso 9 caseifici aziendali siti nella Sicilia occidentale che utilizzavano caglio artigianale autoprodotto (9 campioni) e su cagli in pasta di agnello prodotti con la tecnica tradizionale dal Centro Regionale del Caglio del Consorzio di Tutela della Vastedda della valle del Belìce DOP (17 campioni).
Fra i caseifici visitati, 4 producevano "Caciocavallo Palermitano", 5 formaggio di pecora, 2 Pecorino Siciliano DOP e Vastedda della valle del Belice DOP.
In totale sono stati analizzati 26 campioni, di cui 25 di caglio in pasta di agnello ed 1 di caglio in pasta di capretto.
Su tutti i campioni è stata effettuata l'indagine microbiologica con le seguenti metodiche: Carica Microbica Totale (CMT) a 30°C (ISO 4833:2003), conta degli anaerobi solfito riduttori (ISO15213:2003), dei coliformi totali (ISO4832:2006), degli enterococchi (semina su Rapid Enterococcus Agar - Biorad, incubazione a 44°C per *48* h e conferma delle colonie sospette mediante esame microscopico, catalasi ed idrolisi dell'esculina), di *Escherichia coli* (ISO 16649-2: 2001), di Stafilococchi coagulasi positivi (ISO 6888-2: 1999 Amend 1:2003), la ricerca di *Listeria monocytogenes* (AFNOR BIO 12/11-03/04 con esecuzione del test *Listeria monocytogenes* VIDAS LMO2) e *Salmonella* spp (AFNOR BIO 12/23-05/07 con test VIDAS immuno-concentration Salmonella II). Per la microflora lattica è stata applicata la metodica dei Rapporti ISTISAN 08/36, per i lattococchi mesofili e termofili si è utilizzato l'agar M17 incubato rispettivamente a 30°C per 72h e a 44°C per 48h, per i lattobacilli l'agar MRS, incubato anaerobicamente a 37°C per 48 h. Su 15 ceppi di lattobacilli è stata valutata la produzione di gas dopo incubazione in MRS broth con campanula di Durham, a 37°C per 48 h. L'identificazione biochimica dei batteri solfito-riduttori è stata effettuata con sistema miniaturizzato API 20A (bioMerieux).
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I risultati hanno evidenziato una CMT fra 10^2 e 10^6 ufc/g con valori medi di $1.0x10^4$ ufc/g, presenza di lattococchi mesofili in concentrazioni fra 10^2 e 10^3 ufc/g con valori medi di $6.9x10^2$ ufc/g, lattobacilli fra 10^1 e 10^4 ufc/g con valori medi di $8x10^2$ ufc/g, gli enterococchi, se presenti, raggiungevano concentrazioni di10^2 ufc/g. Fra i 15 ceppi di lattobacilli testati 5 risultavano gas produttori.
In 13 campioni sono stati riscontrati anaerobi solfito riduttori, fra 10^1 e 10^2 ufc/g, all'identificazione di specie sono stati identificati come *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium bifermentans*.

Tabella 1 - Valori medi (in log) delle flore microbiche dei campioni di caglio artigianale e prodotti presso l'opificio siciliano.

	Media (log)	Min (log)	Max (log)	ds
Cagli artigianali aziendali				
CMT a 30°C	4.69	2.71	6.28	1.31
Lattococchi mesofili	2.82	2.56	3.26	0.26
Lattobacilli	2.58	1.78	3.23	0.50
Anaerobi solfito-riduttori	2.16	1.70	2.40	0.40
Cagli Centro Reg. Consorzio Vastedda DOP				
CMT a 30°C	3.60	2.52	5.30	0.91
Lattococchi mesofili	2.34	1.48	3.04	0.68
Lattobacilli	3.14	1.78	4.08	0.57
Anaerobi solfito-riduttori	2.32	1.60	2.74	0.30

In nessun caglio sono stati riscontrati lattococchi termofili, coliformi, *E. coli*, lieviti, stafilococchi coagulasi positivi, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.
I valori medi dei dati delle flore maggiormente rappresentate, trasformati in logaritmo, distinti per i cagli autoprodotti in azienda e per quelli prodotti presso il Centro Regionale del Caglio del Consorzio di Tutela della Vastedda della valle del Belìce DOP sono riportati in Tab. 1. Si nota che i cagli aziendali presentano CMT più alte rispetto a quelli prodotti presso il Centro del Caglio, ciò probabilmente è legato alle migliori condizioni igieniche di produzione. Nessuna differenza è presente, invece, nelle concentrazioni di anaerobi solfito riduttori, che anzi risultano leggermente più alte presso il Centro del Caglio, probabilmente per una minor competizione microbica.
Nel complesso i campioni di caglio esaminati hanno presentato una qualità microbiologica soddisfacente data dall'assenza di patogeni o microrganismi indice di carenze igieniche anche se ulteriori approfondimenti sono in corso per indagare su eventuali relazioni tra la presenza di *Clostridium perfringens* e il processo produttivo e la sicurezza dei formaggi prodotti.

The rennet used for traditional sicilian cheeses: microbiological investigation

Key words: rennet pastes, traditional Sicilian cheeses, microbial investigation.

Bibliografia

Cruciata M, Sannino C, Ercolini D, Scatassa M.L, De Filippis F, Mancuso I, La Storia A, Moschetti G, Settanni L (2014) Animal rennet as sources of dairy Lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology; 80: 2050-2061.

Santillio A, Caroprese M, Marino R, Muscio A, Sevi A, Albenzio A (2007) Influence of lamb rennet paste on composition and proteolysis during ripening of pecorino foggiano cheese. International Dairy Journal (17).

Aborto Enzootico: Indagine molecolare in aborti ovini e caprini di 13 regioni italiane

M. SEBASTIANELLI[1], F. CIUTI[1], A. MANFREDINI[2], N. VICARI[2], M. GOBBI[1], N. D'AVINO[1], M. FABBI[2], G. FILIPPINI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: aborto enzootico, PCR, *Chlamydophila abortus.*

INTRODUZIONE - *Chlamydophila abortus* è un batterio Gram-negativo intracellulare responsabile di una patologia diffusa su scala globale, con l'eccezione di Australia e Nuova Zelanda, nota con il nome di Aborto Enzootico Ovino (OEA). Essa rappresenta una delle principali cause di perdita economica per l'allevamento ovicaprino a causa delle ripercussioni sulla sfera riproduttiva. La patologia è stata riscontrata anche in altre specie animali quali bovini, cavalli, maiali, daini e cervi. Occasionalmente l'infezione può essere trasmessa all'uomo. In particolare le donne che durante la gravidanza sono esposte a pecore e capre nel periodo dei parti o a feti ed invogli abortiti rappresentano la categoria più a rischio.
L'infezione negli animali è asintomatica senza segni clinici premonitori dell'imminente aborto e la presentazione clinica varia a seconda della suscettibilità del gregge all'infezione: se l'allevamento è immune, l'introduzione di un soggetto infetto provoca un'elevata incidenza di aborti caratterizzati da grave placentite, mentre in contesti endemici la prevalenza della malattia si riscontra in una percentuale compresa tra il 5-10% nelle primipare e nei soggetti di nuova introduzione.
Diversi sono gli approcci alla diagnosi di Aborto Enzootico, per lo più dettati dal tipo di campione che viene conferito al laboratorio. Esso può essere rappresentato da sangue, tampone vaginale, placenta, feto, o da una combinazione di questi. Negli ultimi anni l'impiego della Real-time PCR è divenuto il metodo di scelta per la diagnostica di laboratorio grazie alla sua rapidità, sensibilità, specificità e rapporto costo beneficio. Tale indagine viene impiegata routinariamente presso i laboratori del Centro Specialistico per la Patologia dei Piccoli Ruminanti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche per indagare la presenza di DNA positivo per *Chlamydia spp*.
MATERIALI E METODI - Nel periodo di tempo compreso tra aprile 2013 e aprile 2014, abbiamo processato un totale di 129 campioni provenienti da allevamenti ovini e caprini con problemi di aborto/natimortalità; 86 campioni appartenevano ad allevamenti ovini e 43 ad allevamenti caprini. I campioni analizzati provenivano da 13 regioni Italiane. Le più rappresentate sia per numero di allevamenti che per la distribuzione sul territorio regionale degli stessi sono: Marche (ovini: 20; caprini: 15), Umbria (ovini: 20; caprini: 2), Lazio (ovini: 20; caprini: 4), Basilicata (ovini: 11; caprini: 8). Un numero inferiore di campioni è stato inviato da allevamenti di Toscana (ovini: 5), Emilia Romagna (ovini: 3; caprini: 2), Puglia (ovini: 2; caprini: 2), Sicilia (ovini:2; caprini: 1), Campania (ovini: 2; caprini: 1), Calabria (caprini: 3), Lombardia (ovini: 1; caprini: 2), Piemonte (caprini: 1), Sardegna (caprini: 1). Il DNA per la ricerca di *Chlamydia* spp, è stato estratto da omogenati d'organo (feti, annessi fetali) e da tamponi vaginali di pecore e capre con kit commerciale QiaAmp DNA mini kit, (Qiagen®). La reazione di amplificazione è stata eseguita in modalità Fast PCR Real-time sulla piattaforma StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies). I primers e la sonda utilizzati sono tratti dallo studio di Ehricht *et. al,* ed il target amplificato è il gene codificante il 23S-rRNA.
25 campioni di DNA positivi per *Chlamydia spp* sono stati inviati per l'identificazione di specie presso i laboratori del Centro di Referenza Nazionale per le Clamidiosi dell'IZSLER con sede a Pavia dove è stata eseguita una seconda PCR real-time specie-specifica per *C. abortus*. In quest'ultimo caso il target amplificato è il gene codificante la proteina di membrana ompA; i primers e la sonda utilizzati sono tratti dallo studio Pantchev *et al*. Altri 7 campioni positivi per *C. abortus* sono stati invece processati presso la sezione di Fermo dell'IZSUM tramite analisi del polimorfismo di lunghezza dei frammenti (RFLP) originati dalla digestione enzimatica degli amplificati.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Degli 86 campioni provenienti da allevamenti ovini, 17 sono risultati positivi per *C. abortus* (Lazio:5; Marche:4; Toscana: 2; Umbria: 2; Emilia Romagna:1; Campania:1; Basilicata:1; Puglia: 1). Il DNA è stato estratto da: 6 polmoni fetali, 6 tamponi vaginali, 4 pool di placenta/polmone fetale, 1 placenta, 1 cuore fetale. Dei 43 campioni inviati da allevamenti caprini 14 sono risultati positivi per *C. abortus* (Basilicata: 7; Marche: 3; Lombardia 2; Puglia: 1; Calabria: 1). Il DNA è stato amplificato da: 4 polmoni fetali, 2 placente, 5 pool di placenta/polmone fetale, 3 tamponi vaginali.
In assenza di dati epidemiologici precisi relativi all'incidenza della patologia in Italia, questi risultati possono offrire uno spunto per ulteriori e più accurate indagini estese a tutto il territorio nazionale, che consentano di valutare le ripercussioni economiche per gli allevamenti ovini e caprini dovute alla perdita di agnelli/capretti e di latte.

Enzootic abortion of ewes: molecular survey in sheep and goats of 13 italian region

Key words: enzootic abortion, PCR, *Chlamydophila abortus.*

Bibliografia

Curcio L., Sebastiani C., Ciullo M., Biagetti M. (2013), A fast Real-time PCR assay for the detection of Chlamydia species from animal samples. Atti XV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.- Monreale (PA), 23-25 Ottobre 2013.

Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Htzel H., Sachse K. (2006), Optimized DNA microaaray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. Molecular and cellular Probes 20: 60-63.

Livingstone M., Wheelhouse N., Maley S.W., Longbottom D., (2009), Molecular detection of Chlamydophila abortus in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. Vet Microbiology 135: 134-141.

Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. (2010), Detection of all Chlamydophila and Chlamydia spp. Of veterinary interest using species-specific real-time PCR assay. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 33: 473-84.

Sachse K., Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischil A., Longbottom D., (2009), Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. Vet Microbiology 135: 2-21.

Sillis M., Longbottom D. (2011), Chlamydiosis. In: Oxford Textbook of Zoonoses, Biology, Clinical Practice and Public Healt Control, 146-157. Palmer SR. Lord Soulsby, Torgerson PR & Brown DWG, eds Oxford University Press, Oxford, UK.

Stuen S., Longbottom D. (2011), Treatment and Control of Chlamydial and Rickettsial Infections in Sheep and Goats. Vet Clin Food Anim 27: 213-233.

Vicari N., Santoni R., Vigo P.G., Magnino S. (2004), A PCR-RFLP assay targeting the 16S ribosomal gene for the diagnosis of animal chlamydiosis. Proceedings, 5th meeting of European Society for Chlamydia Research, Budapest, Hungary, 1-4 Settembre 2004, p.297.

Sequenziamento di nuova generazione del genoma ovino per l'identificazione di mutazioni causative per caratteri di interesse economico

T. SECHI[1], S. CASU[1], B. LAZZARI[2], M.G. USAI[1], S. SECHI[1], R. GIANNICO[2], S. MIARI[1], A. STELLA[2], A. CARTA[1]

[1] Unità di Ricerca di Genetica e Biotecnologie, AGRIS Sardegna, Italy
[2] Fondazione Parco Tecnologico Padano, Italy

Parole chiave: SNP, risequenziamento, mutazione causale, QTL.

INTRODUZIONE - Negli ultimi anni l'avvento di nuove tecnologie molecolari ha permesso l'analisi approfondita del genoma degli ovini. In particolare sono stati sviluppati degli array che permettono di analizzare contemporaneamente migliaia di SNP. Inoltre si sono recentemente rese disponibili nuove tecnologie per il sequenziamento di interi genomi, che hanno portato nel 2012 al sequenziamento del genoma ovino. L'annotazione dello stesso è stata resa disponibile sia da Ensembl che da NCBI ed è tuttora in fase di aggiornamento. Nell'ambito del progetto europeo 3SR utilizzando l'Ovine SNP50K su una popolazione di ovini da latte, sono stati identificati numerosi QTL associati a caratteri di interesse economico (Usai et al., 2014). Al fine di identificare le mutazioni causative o SNP in forte *linkage disequilibrium*, è stato sequenziato l'intero genoma di animali target. Nel presente lavoro verranno descritti i criteri di identificazione degli animali target e una prima valutazione delle possibilità di identificazione delle mutazioni causative.

MATERIALI E METODI - I QTL sono stati identificati su una popolazione di 960 pecore backcross Sarda x Lacaune e di due generazioni di discendenti (1408 animali) ottenute da 33 arieti provenienti dal Centro Arieti rappresentativi della razza Sarda. È stato utilizzato il metodo di Usai et al. (2014) che ha analizzato i 76 aplotipi originari (66 dai 33 arieti sardi e 10 da 10 arieti F1). Per sette QTL (Tab.1), associati alla resistenza ai nematodi (FEC), al contenuto in cellule somatiche (SCS), alla resistenza alla paratubercolosi (PTB), al rapporto CLA/Acido vaccenico (CLA/V), al contenuto in proteina totale del latte (PCT), alla produzione di latte totale (MYT), sono stati identificati animali *target* che sono stati oggetto di risequenziamento col metodo Solexa (Illumina). Sono stati dapprima identificati due aplotipi (positivo H+ e negativo H-) con il contrasto maggiormente significativo. È stato poi verificato che i due aplotipi presentassero una probabilità di identità per discendenza (IBD) pari a 0. In seguito, un individuo omozigote H+H+ (IBD tra i due segmenti = 1) e un individuo omozigote H-H- (IBD tra i due segmenti = 1) sono stati risequenziati in quanto avevano elevata probabilità di essere omozigoti all'allele positivo e negativo rispettivamente per il polimorfismo causale. Un terzo animale con alta probabilità di essere eterozigote H+H- è stato risequenziato per raddoppiare le copie sequenziate di H+ e H-. Il risequenziamento è stato effettuato con un HiSeq ad un coverage di 12X. Le *reads* sono state allineate al genoma di riferimento (*Ovis aries* v3.1; Archibald, 2010) con BWA (Li et al., 2009). L'identificazione dei polimorfismi è stata effettuata con GATK (McKenna et al., 2010). La regione cromosomica da investigare corrispondeva a quella risultante dalla sovrapposizione delle zone omozigoti attorno al picco presenti nei due individui. Per ogni regione sono stati investigati esclusivamente SNP e INDELS che fossero allo stato omozigote opposto negli individui H+H+ e H-H- e dopo verifica del genotipo nell'animale H+H-. L'annotazione degli stessi è stata effettuata con il programma snpEff (Cingolani *et al.*, 2012) utilizzando le annotazioni di Ensembl 74. Inoltre, i polimorfismi identificati nelle 3'UTR sono stati ulteriormente investigati per verificare l'eventuale coincidenza con siti di attacco per microRNA individuati con il programma miRanda (Enright et al., 2003). Analogamente, il programma FIMO appartenente al pacchetto MEME (Bailey et al., 2009) è stato utilizzato per individuare i siti di attacco dei fattori di trascrizione noti nei promotori prossimali dei geni. ed è stata verificata la coincidenza degli stessi con i polimorfismi individuati.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La lunghezza delle regioni variava tra 0,40 Mb e 2,2 Mb. A seconda della regione, snpEff ha segnalato la presenza di un numero variabile di polimorfismi dentro i geni (questi ultimi andavano da un mimino di 1 a un massimo di 37) (Tab. 1). Il numero di SNP non sinonimi variava tra 0 e 66. Tra i geni identificati alcuni risultavano funzionalmente candidati: in particolare il cluster delle caseine per PCT dove sono stati anche identificati polimorfismi non sinonimi negli esoni (Casu et al., 2014). Nel gene CSN1S2 alcuni polimorfismi interessavano potenziali siti di attacco per microRNA e fattori di trascrizione. Questo risultato è di particolare interesse. Boichard et al. (2014) hanno trovato infatti un QTL significativo nella stessa regione per il contenuto in CSN1S2. Per il rapporto CLA/Acido vaccenico, il gene candidato è stato *Stearoyl CoA desaturase* con polimorfismi sia intronici che localizzati nelle zone a monte del sito di inizio. L'indagine verrà ulteriormente raffinata sia attraverso gli aggiornamenti delle annotazioni del genoma ovino sia con studi di espressione genica.

Tabella 1 - Statistiche relative alle regioni investigate.

Carattere (OAR)	Loc (Mb)	p-val	Contrasto (u.d.s)	L (Mb)	NP	N Geni	NP Geni	N Non_syn
FEC (7)	52	0.0023	0.583	0,40	1139	3	1	0
FEC (20)	25	0.0012	0.892	1,1	4082	23	1347	11
SCS (4)	47	0.0003	0.498	0,58	1988	1	61	0
PTB (20)	25	<0.0001	0.834	1,1	3762	21	1016	4
CLA/V (22)	20	<0.0001	0.332	0,35	1053	10	691	2
PCT (6)	85	<0.0001	0.516	2,2	9102	37	3309	66
MYT (10)	46	<0.0001	0.396	1,8	7560	9	3192	6

Loc=posizione del picco QTL, p-val=p-value in genome wise analisi, L=lunghezza del segmento analizzato, NP=polimorfismi presenti nel segmento, N Geni=numero di geni, NP Geni=polimorfismi presenti nei geni, N Non_syn=SNP non sinonimi.

Next generation sequencing of ovine genome to detect causal mutations involved in economical traits

Key words: SNP, resequencing, causal mutation, QTL.

Bibliografia

Archibald AL., Cockett NE., Dalrymple BP. et al. (2010), Anim. Genet. 41(5): 449-53.

Bailey T., Bodén M., Buske F.A., et al. (2009), MEME SUITE: tools for motif discovery and searching", Nucleic Acids Research, 37:W202-W208.

Boichard D., Govignon-Gion A., Larroque H., et al. (2014), Déterminisme génétique de la composition en acides gras et protéines du lait des ruminants, Prod Animales IN PRESS.

Casu S., Sechi T., Usai MG. et al. (2014), Investigating a highly significant QTL for milk protein content segregating in Sarda sheep breed close to the caseins cluster region by whole genome re-sequencing of target animals, ORAL presentation at the 10th WCGALP. August 17-22.

Cingolani, P., Platts, A., Wang, le L., et al. (2012), Fly (Austin), 6: 80-92. Enright A.J. B. John, U. Gaul, et al; 2003 MicroRNA targets in Drosophila; Gen Biol 5(1):R1.

Li, H., Durbin, R. (2009), Bioinformatics, 25: 1754-1760.

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., et al. (2010), Genome Res, 20:1297-1303.

Usai MG, Casu S., Sechi T. et al. (2014), Genome wide association study on milk production traits in a nucleus flock of Sarda breed sheep using a novel method combining linkage and linkage disequilibrium mapping, ORAL presentation at the 10th WCGALP. 17-22.

Valutazione qualitativa e dinamica del comportamento caprino

M. SERRAPICA[1], A. BRAGHIERI[1], A.M. RIVIEZZI[1], D. RUFRANO[2], E. SABIA[2], F. NAPOLITANO[1]

[1] Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università della Basilicata
[2] Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per la Zootecnia Estensiva

Parole chiave: caprini, comportamento, temporal dominance of sensations, valutazione qualitativa.

INTRODUZIONE - La valutazione qualitativa del comportamento permette una precisa interpretazione dello stato emozionale di varie specie di animali e delle modalità di interazione con l'ambiente circostante (Wemelsfelder et al., 2001; Napolitano et al., 2012) ma non tiene conto delle eventuali fluttuazioni che si possono verificare nel corso dell'osservazione. Nella presente indagine, pertanto, è stata verificata la possibilità di affiancare alla valutazione qualitativa del comportamento caprino la Temporal dominance of sensations (TDS), per descrivere l'evoluzione della dominanza dei descrittori comportamentali nel tempo (Pineau et al., 2009).

MATERIALI E METODI - La prova ha interessato 27 capre, di varie razze (Maltese, Cashmere, Girgentana, Siriana, Garganica e Ionica), di circa 3 mesi di età, suddivise in 3 gruppi, bilanciati per età e per razza: soggetti svezzati da almeno 10 giorni (gruppo C); soggetti ancora in fase di allattamento, separati dal gruppo quando la madre era assente perché al pascolo (gruppo A1); soggetti ancora in fase di allattamento, separati dal gruppo mentre la madre era presente in stalla (gruppo A2). Ciascun soggetto è stato sottoposto ad un test di 30 min che è consistito nella separazione dal gruppo di appartenenza e nell'immissione nel gruppo C. I rilievi quantitativi relativi ai 30 min di osservazione sono stati effettuati per mezzo del software The Observer XT (Noldus). Alcune delle categorie comportamentali rilevate sono state: vigilanza, esplorazione, interazioni agonistiche. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad ANOVA con un fattore (gruppo). La valutazione comportamentale qualitativa ha, invece, riguardato video-registrazioni di 90 secondi, rappresentative dell'intero periodo del test. Per la valutazione TDS è stato utilizzato un panel di 10 giudici addestrati che hanno ricevuto una lista di descrittori fra i quali indicare quelli considerati dominanti nel corso dell'osservazione dei video. I dati sono stati acquisiti e elaborati mediante il software FIZZ (Biosystemes, Couternon, Francia) che ha permesso di ottenere delle curve di dominanza per valutare l'evoluzione nel tempo delle reazioni comportamentali.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I dati quantitativi hanno evidenziato una maggiore inattività e una maggiore esplorazione nel gruppo C (rispettivamente 13,7±2,1 e 7,0±1,1 min) rispetto ai gruppi A1 (rispettivamente 5,87±2,2 min, $P<0,01$ e 4,6±1,2 min, $P<0,10$) e A2 (rispettivamente 7,5±2,2 min, $P<0,05$ e 2,5±1,2 min, $P<0,01$). Viceversa, il gruppo A1 ha evidenziato un maggior numero di interazioni agonistiche (26,4±4,2) rispetto ai gruppi A2 (11,1±4,2, $P<0,05$) e C (4,4±3,9, $P<0,001$). Infine la vigilanza è risultata più elevata in A2 (2,83±0,5 min) che nei gruppi A1 e C (in entrambi 0,1±0,5 min, $P<0,001$). Le curve di frequenza di dominanza dei descrittori comportamentali, rappresentative dei gruppi C, A1 e A2 (Fig. 1), evidenziano la capacità dei giudici di discriminare nel tempo le variazioni del comportamento, ricorrendo all'uso appropriato di specifici descrittori dello stato emozionale espresso dai 3 gruppi sperimentali. In particolare, in C si sono alternati nella dominanza i descrittori calmo-curioso, in A1 sono prevalse le interazioni agonistiche seguite prima dall'esplorazione e poi da una maggiore tranquillità, mentre in A2 gli scontri iniziali sono stati seguiti da uno stato di vigilanza/allerta indotto dalla presenza materna nel box adiacente. Mentre l'analisi quantitativa permette solo di discriminare i gruppi in funzione delle diverse categorie comportamentali, gli andamenti dei desccrittori riescono ad esprimere con chiarezza l'evoluzione temporale dello stato emozionale delle capre nei diversi gruppi. Pertanto, l'associazione QBA-TDS rappresenta uno strumento valido per la descrizione delle fluttuazioni delle espressioni comportamentali nel tempo fornendo, nel contempo, spunti di approfondimento nella valutazione dei processi di assuefazione animale all'azione di stressori di varia natura.

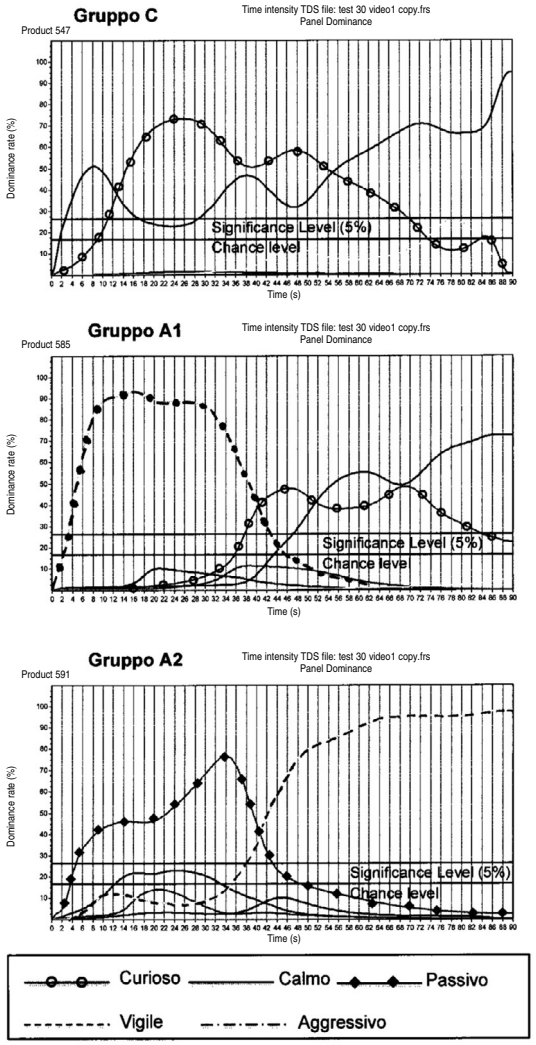


Figura 1 - Esempi di evoluzione del comportamento nei tre gruppi sperimentali.

Qualitative and dynamic assessment of young goat beahaviour

Key words: goat, behaviour, TDS, QBA.

Bibliografia

Napolitano F., De Rosa G., Grasso F., Wemelsfelder F. (2012), Qualitative behaviour assessment of dairy buffaloes (Bubalus bubalis). Applied Animal Behaviour Science 141: 91-100.

Pineau N., Schlich P., Cordelle S., Mathonnière C., Issanchou S., Imbert A., Rogeaux M., Etiévant P., Köster E. (2009), Temporal dominance of sensations: Construction of the tds curves and comparison with time-intensity. Food Qual. Pref. 20: 450-455.

Wemelsfelder F., Hunter T.E.A., Mendl M.T., Lawrance A.B. (2001), Assessing the whole animal: a free choice profiling approach. Anim. Behav. 62: 209-220.

Relazione tra peso corporeo, caratteri sessuali secondari e qualità di spermatozoi epididimali in becchi di razza Camosciata delle Alpi

F. TURRI[1], M. MADEDDU[2], T.M. GLIOZZI[1], G. GANDINI[3], F. PIZZI[1]

[1] Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, U.O.S di Lodi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, c/o Parco Tecnologico Padano, via Einstein, 26900 Lodi
[2] Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, via Celoria 10, 20133 Milano
[3] Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano

Parole chiave: capra, caratteri sessuali secondari, spermatozoi epididimali, qualità materiale seminale.

INTRODUZIONE - Nella specie caprina, in seguito all'aumento dell'utilizzo dell'inseminazione strumentale per la gestione routinaria della riproduzione, si ha la necessità di identificare caratteri che siano indicatori della fertilità del riproduttore. Un metodo utile per avere tali indicazioni è la valutazione del materiale seminale, elemento che diventa essenziale per la selezione dei maschi. La qualità spermatica è risultata associata positivamente al peso corporeo (Mekasha et al., 2007) e alla circonferenza scrotale (Ritar et al., 1992) in alcune razze caprine, e al diametro e alla lunghezza delle corna nello stambecco (Santiago-Moreno et al., 2007). Le informazioni riguardo questi aspetti sono scarse nella Camosciata delle Alpi. Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare la relazione tra peso corporeo, caratteri sessuali secondari e la qualità del materiale seminale attraverso l'analisi di spermatozoi epididimali. L'obiettivo finale è di dimostrare che attraverso la misurazione di questi caratteri è possibile predire la qualità spermatica e quidi la fertilità di un riproduttore.

MATERIALI E METODI - Su 50 becchi di razza Camosciata delle Alpi sono state effettuate, in media intorno alla 34ª settimana di età, le seguenti rilevazioni: peso corporeo (PC, Kg), circonferenza scrotale (CS, cm), diametro e lunghezza delle corna (DC-LC, cm). Successivamente è stato rilevato il peso corporeo alla macellazione (PCM, Kg) eseguita a fini alimentari. I testicoli di ciascun becco sono stati raccolti in sede di macellazione e trasportati in laboratorio. All'arrivo in laboratorio per ciascun testicolo è stato rilevato, mediante una bilancia digitale, il peso testicolare (PT, g) e in seguito a separazione dal testicolo, il peso della porzione epididimale (PE, g). Il materiale seminale è stato estratto dall'epididimo mediante la tecnica del flushing retrogrado e analizzato come descritto da Turri et al. (2014). Il campione ottenuto da ciascun epididimo è stato raccolto in una provetta e valutato per i seguenti parametri: volume totale (VOL, ml), raccolto epididimale (RE, ml), concentrazione spermatica (CS, 10^9/ml), numero totale di spermatozoi (NTS, 10^9), motilità (MOT, %), vitalità (VIT, %) e presenza di spermatozoi morfologicamente normali (SN,%). Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SAS™ v 9.2 (PROC GLM), testando la relazione tra peso corporeo e caratteri sessuali secondari con la qualità del materiale seminale. I risultati sono espressi come media dei minimi quadrati ± errore standard della media (LSM ± SEM). Per valutare la relazione tra tutte le variabili è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - A 34 settimane di età i 50 becchi presentavano PC=28,0±5,7 Kg, CS=26,7±3,0 cm, LC=23,2±3,8 cm e DC=15,4±1,9 cm. Il PC è risultato correlato positivamente con LC ($p<0,001$, r=0,51), PCM ($p<0,001$, r=0,71), PT ($p<0,001$, r=0,53) e PE ($p<0,001$, r=0,50). Anche tra PT e PE è presente una correlazione positiva ($p<0,001$, r=0,63). Queste ultime variabili presentano una correlazione positiva con PCM. Infine esiste una correlazione positiva tra le variabili LC e PE ($p<0,05$, r=0,33) e PCM ($p<0,01$, r=0,43) e tra DC e PCM ($p<0,01$, r=0,42). Per quanto riguarda la qualità spermatica si sono ottenuti i seguenti valori: VOL=2,4±0,1ml; RE=0,6±0,0 ml; CS=1,1±0,1^9/ml; NTS=5,5±0,3x10^9; MOT=74,6±2,3%; VIT=72,5± 1,7%; SN=99,8±0,6%. Le variabili PC, CS, DC, PCM sono correlate positivamente con la percentuale di SN (Tab. 1).È stata rilevata una relazione positiva tra LC e CS. Le variabili PT e PE sono positivamente correlate con i parametri seminali presenti in Tabella 1 ad eccezione del PE con RE. Il PT presenta una correlazione positiva con VOL, RE, CS e conseguentemente con NTS e SN. Il PE invece è correlato positivamente con VOL, CS, NTS, SN. Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra PC e MOT e VIT spermatica. Anche i caratteri sessuali secondari non sono risultati correlati con MOT e VIT; analoga condizione si è verificata tra CS e le variabili relative alla qualità spermatica. Questo studio conferma che esiste una correlazione positiva tra peso corporeo e caratteri sessuali secondari in quanto lo sviluppo delle corna e dei genitali avviene contemporaneamente all'incremento del peso corporeo. Inoltre i nostri risultati dimostrano che la qualità e la quantità degli spermatozoi epididimali raccolti, è legata a caratteri sessuali secondari quali lunghezza delle corna e peso del testicolo e dell'epididimo, suggerendo che tali caratteri (a 34 settimane di età) possono dare un'indicazione della capacità dei becchi di razza Camosciata di produrre materiale seminale di buona qualità.

Tabella 1 - Correlazione di Spearman e p values tra peso corporeo, caratteri sessuali secondari e qualità degli spermatozoi epididimali.

	VOL[1] (ml)	RE[2] (ml)	CS[3] (10^9/ml)	NTS[4] (10^9)	SN[5] (%)
PC	0,14(NS)	0,12(NS)	0,11(NS)	0,13(NS)	0,37(**)
LC	0,16(NS)	0,10(NS)	0,44(**)	0,24(NS)	0,16(NS)
DC	0,00(NS)	0,06(NS)	0,03(NS)	0,01(NS)	0,29(*)
PT	0,38(**)	0,32(*)	0,27(*)	0,45(***)	0,35(**)
PE	0,31(**)	0,24(NS)	0,31(*)	0,38(***)	0,35(**)
PCM	0,01(NS)	0,01(NS)	0,19(NS)	0,10(NS)	0,36(**)

***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05; NS=non significativo.
[1]VOL=Volume; [2]RE=raccolto epididimale; [3]CS=concentrazione spermatica; [4]NTS=numero totale di spermatozoi; [5]SN=spermatozoi morfologicamente normali.
PC=peso corporeo; LC=lunghezza corna; DC=diametro corna; PT=peso testicolo; PE=peso epididimo; PCM=peso corporeo macellazione.

Relationship between body weight, secondary sexual traits and epididymal semen quality in camosciata delle alpi bucks

Key words: goat, secondary sexual traits, epididymal sperm, semen quality.

Bibliografia

Mekasha Y., Tegegne A. and Rodriguez-Martinez H. (2007), Effect of Supplementation with Agro-industrial By-products and Khat (Catha edulis) left overs on testicular growth and sperm production in Ogaden bucks. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 54 (3):147-55.

Ritar AJ., Mendoza G., Salamon S., White IG. (1992), Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (Capra hircus). J Reprod Fertil, 95:97-102.

Santiago-Moreno J., Toledano-Dìaz A., Pulido-Pastor A., Gòmez-Brunet A., Lopez-Sebastiàn A.(2007), Horn quality and postmortem sperm parameters in Spanish ibex (Capra pyrenaica hispanica). Anim Reprod Sci, 99: 354-362.

Turri F., Madeddu M., Gliozzi T,M., Gandini G. and Pizzi F. (2014), Effect of testicle postmortem storage on goat frozen-thawed epididymal sperm quality as a tool to improve genebanking in local breeds. Animal, 8: 440-447.

Effetto dell'orario di pascolamento sulle performance produttive e sulla qualità della carne di agnello

B. VALENTI[1], A. PRIOLO[1], G. LUCIANO[1], L. BIONDI[1], M. SCERRA[2], R.I. PAGANO[1], M. LANZA[1], M. AVONDO[1]

[1] Produzioni Animali, Dipartimento DISPA, Università degli Studi di Catania
[2] Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-forestali e Ambientali, Università di Reggo Calabria

Parole chiave: acidi grassi, low input, qualità della carne, orario di pascolamento.

INTRODUZIONE - Avondo et al. (2008) hanno riportato una variazione della composizione chimica del pascolo nel corso della giornata. Il rapporto tra carboidrati solubili (WSC) e proteina grezza era più favorevole nel pascolo pomeridiano rispetto a quello della mattina per effetto dell'aumento dei WSC. Nell'ambito della gestione dei sistemi di allevamento denominati low-input, caratterizzati da un ridotto ricorso a input esterni e dall'ottimizzazione dell'utilizzo delle risorse naturali, concentrare le ore di pascolamento in certi momenti della giornata potrebbe rappresentare un'utile strategia per contenere i costi di gestione e ridurre la pressione esercitata sui pascoli dai ruminanti. Nelle zone a clima temperato, e nelle aree Mediterranee, dove la presenza del pascolo è limitata a certi periodi dell'anno, questa pratica potrebbe aumentarne la disponibilità per animale. Queste strategie non devono, però, compromettere le performance produttive o influenzare negativamente la qualità dei prodotti. Nell'ambito del progetto LowInputBreeds, finanziato dal VII° Programma Quadro, è stato valutato l'effetto dell'orario di pascolamento sulle performance produttive e sulla qualità della carne di agnello.

MATERIALI E METODI - Per tutti i dettagli sull'esperimento si rimanda agli articoli pubblicati (Luciano et al., 2012, Vasta et al., 2012). Brevemente, l'esperimento ha avuto una durata complessiva di 72 giorni ed ha coinvolto 44 agnelli di razza Merinizzata Italiana. Nel dettaglio, 9 animali (gruppo S), sono stati allevati in stalla ed alimentati con mangime concentrato, tutti gli altri animali sono stati alimentati esclusivamente con erba verde su un erbaio di *Lolium perenne* suddiviso in parcelle. Un gruppo di 12 animali ha pascolato per 8 ore al giorno (gruppo 8h), mentre gli altri due gruppi hanno pascolato per 4 ore al giorno, nelle ore mattutine o pomeridiane, rispettivamente gruppo 4h-AM (11 animali) e gruppo 4h-PM (12 animali). Nel corso dell'esperimento sono stati misurati l'ingestione di alimento e gli incrementi ponderali. Inoltre, sono stati raccolti campioni di sangue. Contestualmente alla misura dell'ingestione, sono stati raccolti campioni di pascolo dalle diverse parcelle. Tali campionamenti sono stati effettuati in 6 diversi momenti della giornata con una cadenza di 1.5 h per il gruppo 8h e in 3 momenti della giornata con una cadenza di 2h per i gruppi 4h-AM e 4h-PM. Al termine del periodo sperimentale gli animali sono sta macellati e sono stati prelevati campioni individuali di muscolo *longissimus dorsi*.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Riguardo l'effetto dell'orario di pascolamento sulla qualità della carne, è stata valutata la composizione acidica del grasso della carne dei tre gruppi di agnelli che avevano accesso al pascolo (Vasta et al., 2012). La carne del gruppo 4h-PM è risultata più ricca in acidi grassi ad effetto salutistico rispetto ai gruppi 4h-AM e 8h. In particolare, il pascolo pomeridiano ha avuto l'effetto di ridurre la percentuale di acidi grassi saturi (-8,2%) e di aumentare quella di acidi grassi polinsaturi (+9,6%) rispetto al sistema tradizionale di pascolamento (gruppo 8h). La stessa differenza non si è riscontrata confrontando il gruppo 4h-AM con il gruppo 8h. Tali differenze potrebbero derivare dalla variazione della composizione acidica del pascolo durante le diverse ore della giornata. Infatti, l'erba utilizzata dal gruppo 4h-PM si è caratterizzata per una maggiore percentuale di acido linolenico rispetto al pascolo del gruppo 4h-AM (67,7% vs 64,2%, rispettivamente) per l'intera durata del periodo sperimentale. È pertanto presumibile, che negli animali del gruppo 4h-PM la maggiore disponibilità di acido linolenico nel pascolo pomeridiano abbia determinato una sintesi più elevata di prodotti intermedi della bioidrogenazione ruminale e quindi un loro maggiore trasferimento alle carni. Sulla scorta di questi risultati, si è deciso di valutare l'effetto dell'orario di pascolamento sulle performance di crescita e produttive tra il gruppo con la migliore qualità della carne (4h-PM) contro il gruppo stalla e 8h (Luciano et al., 2012). L'incremento ponderale giornaliero è stato più elevato per gli agnelli che hanno pascolato per 8 ore al giorno rispetto al gruppo 4h-PM; di conseguenza, anche il peso vivo alla macellazione è risultato maggiore per gli animali del gruppo 8h, tuttavia non si sono osservate differenze significative sulla resa al macello (Fig. 1).

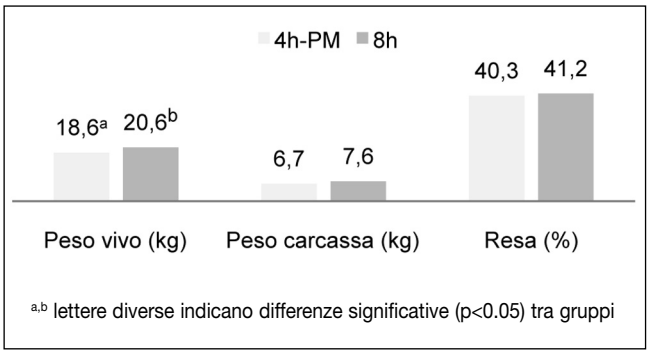


Figura 1 - Effetto dell'orario di pascolamento sul peso vivo e sulle performance produttive.

Questi risultati potrebbero essere dovuti a un possibile adattamento del comportamento da parte degli agnelli del gruppo 4h-PM tale da rendere minimi gli effetti dovuti alla riduzione dell'accesso al pascolo. Infatti, a fronte del dimezzamento delle ore di pascolamento, il livello di ingestione degli animali del gruppo 4h-PM si è ridotto solo del 22,6% rispetto al gruppo 8h (375 *vs* 485 g d^{-1}). Inoltre, per quest'ultimo gruppo, i maggiori livelli di ingestione avrebbero determinato un maggiore sviluppo dell'apparato digerente. Questi dati, insieme al minore dispendio fisico da parte degli animali 4h-PM, potrebbe aver contribuito a rendere simili tra i due gruppi sia il peso della carcassa che la resa al macello. I risultati ottenuti suggeriscono la possibilità di ridurre le ore di accesso al pascolo da parte degli agnelli alle sole ore pomeridiane senza particolari effetti negativi sule performance di crescita né sulla qualità della loro carne. Questa prospettiva potrebbe rivelarsi particolarmente adatta all'allevamento dei piccoli ruminanti, che, nelle aree mediterranee, vengono allevati durante il periodo primaverile e autunnale in concomitanza con la presenza di pascolo.

Effect of the grazing time on lamb productive performances and meat quality

Key words: fatty acids, low input, meat quality, grazing time.

Bibliografia

Avondo M. et al. (2008) Journal of Dairy Research. 75:48-45.
Luciano G. et al. (2012) Meat Science. 92 :30-35.
Vasta V. et al. (2012) Meat Science. 90:93-98.

Valutazione del benessere e dello stato metabolico di pecore in allevamenti siciliani

I. VAZZANA[1], S. GIAMBELLUCA[1], S.A. MIGNACCA[1], T. OREFICE[1], M. GIANESELLA[2], M. MORGANTE[2], S. DARA[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"
[2] Università degli studi di Padova - Dipartimento di Medicina Animale, Benessere e Salute (MAPS)

Parole chiave: ovini, benessere, metabolismo, razione.

INTRODUZIONE - La valutazione del benessere animale è una tematica di notevole interesse nei progetti e nella letteratura scientifica relativi alla zootecnia. Tuttavia, l'individuazione di indicatori che possano riflettere in maniera oggettiva le condizioni generali degli animali in allevamento, rimane una questione dibattuta e non risolta. Molti autori ritengono opportuna una valutazione che tenga contemporaneamente conto di diversi ordini di parametri: comportamentali, fisiologici, produttivi e sanitari (Bono, 2001). Tra gli indicatori fisiologici, i parametri ematici, sia per quanto concerne l'indagine emocitometrica (Archetti & Ravarotto, 2002) che quella biochimica (Bertolin e *et al*., 2002) vengono universalmente riconosciuti come validi indici dello stato di salute dell'animale e della possibile presenza di "stress disease". Obiettivo del presente lavoro è stata la valutazione dello stato di benessere e metabolico di ovini in allevamenti siciliani a conduzione semi-intensiva, mediante l'utilizzo di parametri ematici e metabolici. Tra i fattori che possono influenzare l'andamento di questi indicatori, un diverso regime alimentare (integrazione con concentrati) si è dimostrato essere la discriminante per diversi parametri.

MATERIALI E METODI - Sono stati individuati 10 allevamenti semi-intensivi di ovini da latte, distribuiti su tutto il territorio siciliano. Gli animali testati appartenevano a due razze autoctone: Comisana e della Valle del Belice. Per ciascun allevamento designato sono stati effettuati due campionamenti di 10 ovini ciascuno: il primo circa 15 giorni dalla data prevista dei parti, il secondo intorno al 30-35 giorno di lattazione. In 5 delle 10 aziende, la razione alimentare degli animali veniva integrata con concentrati (200-600 g a seconda del periodo fisiologico) a partire dal mese precedente la data prevista dei parti e nelle prime fasi della lattazione. I campioni ematici, mantenuti ad una temperatura di 4°C, sono stati immediatamente trasportati in laboratorio ed analizzati. Per ogni campione è stata effettuata un'indagine su 31 parametri. L'esame emocitometrico è stato condotto mediante l'utilizzo della strumentazione Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostic). Beta-idrossibutirrato, enzimi epatici (AST, GGT, ALP), urea, macroelementi (calcio, fosforo, magnesio) e proteine sieriche totali sono stati misurati con l'analizzatore multiparametrico Konelab 60I (Thermo Electron Corporation). La migrazione elettroforetica delle siero proteine è stata ottenuta attraverso l'uso della Helena Sas1-Sas2 (Helena). Per la determinazione del cortisolo è stato adoperato un sistema in chemioluminescenza, Immulite 2000 (Siemens). Infine, la concentrazione dell'aptoglobina è stata calcolata mediante kit ELISA Phase Haptoglobin (Tridelta). Sui risultati ottenuti è stata condotta un'analisi statistica tramite ANOVA, per il confronto dei dati relativi ai due differenti regimi alimentari, considerando come significativi valori di $p<0,05$.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Da una prima analisi comparativa generale dei dati, si evince una corrispondenza delle medie della maggior parte dei parametri indagati con i range riportati in letteratura (Morgante e D'Alterio, 2013; Radostits *et al*., 2000). Fanno eccezione MCHC, monociti, basofili ed urea, i cui valori sono risultati più elevati. Anche per quanto concerne il quadro siero-proteico, le frazioni globuliniche hanno concentrazioni maggiori rispetto ai dati bibliografici. Il confronto tra i dati ottenuti negli allevamenti con differente regime alimentare mostra differenze statisticamente significative per numerosi indicatori (Tab. 1). Dai risultati si evince come il fattore integrazione influisca in maniera significativa sullo stato di benessere e metabolico degli animali. Di particolare interesse risultano essere i valori più alti di WBC, neutrofili, monociti e BHB degli animali non integrati e più alti di Urea, GOT, Pi, Prot. Tot. Gammaglobuline e cortisolo negli animali la cui dieta era integrata. Se da un lato si registra un migliore stato di salute e metabolico degli animali integrati dall'altro i livelli di cortisolo più alti fanno suppore una maggiore condizione stressante in questi ultimi. Dai dati presentati si evince anche che la valutazione del BHB risulta utile come indicatore del metabolismo energetico, particolarmente importante in queste fasi del ciclo produttivo. Inoltre poiché questo parametro può essere misurato in campo con appositi apparecchi, il suo utilizzo come indice può essere immediato e di facile determinazione.

Tabella 1 - Valori medi (±SEM) di alcuni parametri ematici in ovini con diverso regime alimentare.

Parametri	Integrata (X±SEM)	Non Integrata (X±SEM)	
WBC (K/µl)	8,26±0,39	9,62±0,25	**
NEU (K/µl)	2,87±0,26	3,97±0,17	***
MONO (K/µl)	0,78±0,13	1,22±0,08	**
BHB (mmol/l)	0,41±0,03	0,54±0,02	***
Urea (mg/dl)	44,96±1,44	37,14±0,93	***
GOT (U/l)	107,94±4,1	98,34±2,62	*
Pi (mg/dl)	5,73±0,19	5,20±0,12	*
Prot. Tot (g/dl)	8,07±0,11	7,59±0,07	***
Gamma (g/dl)	2,38±0,10	2,04±0,06	**
Cortisolo (µg/dl)	2,21±0,17	1,64±0,11	**

* p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001.

Ringraziamenti - *Si ringraziano i Sig.ri Patitò G., Gioia G. e Calabrese E. per la preziosa collaborazione.*

Evaluation of welfare and metabolic condition in sheep farmed in Sicily

Key words: sheep, welfare, metabolism, feeding.

Bibliografia

Archetti I., Ravarotto L. (2002). Esame emocromocitometrico e formula leucocitaria mediante strumento Cell-Dyn 3500. In: La valutazione del benessere nella specie bovina. Amadori M. & Archetti I. Ed. Fondaz. Iniz. Zooprof. Zoot.: 77-83.

Bertolin P., Bortoluzzi M., Ravarotto L. (2002). Analisi dei parametri chimico clinici impiegati quali indicatori di benessere animale. In: La valutazione del benesserenella specie bovina. Amadori M. & Archetti I. Ed. Fondaz. Iniz. Zooprof. Zoot.: 95-107.

Bono G. (2001). Discomfort and stress indicators in farm animals. SIS Vet. An. Meet. Sel.Abs. 3: 18-30.

Morgante M. e D'Alterio G.L. (2013) L'esame dei piccoli ruminanti in Semiologia Clinica Veterinaria a cura di Paolo Ciaramella, Poletto Editore.

Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. e Hinchcliff K.W. (2000) Veterinary Medicine, 9th edn. W.B. Saunders: 1819-1822.

Effetto dell'integrazione alimentare dell'estratto di *Lippia citriodora* su alcuni parametri ematici e sulle performance produttive di agnelli di razza Lacaune allattati naturalmente

F. VIZZARRI[1], C. CORINO[1], M. PALAZZO[2], M. NARDOIA[2], D. CASAMASSIMA[2]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università di Milano, Italia
[2] Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università del Molise, Campobasso, Italia

Parole chiave: *Lippia citriodora*, agnelli, parametri ematici, performance produttive.

INTRODUZIONE - Nelle pecore, durante il periodo di gravidanza sia i tessuti materni sia quelli fetali richiedono una elevata quantità di ossigeno per lo svolgimento delle attività metaboliche. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si generano, se non bilanciate in maniera appropriata, possono causare una alterazione dei costituenti cellulari con effetti dannosi sia per la madre che per il feto. Alcuni estratti di natura vegetale, ad attività antiossidante, possono prevenire tali danni interferendo, a livello biochimico, sia sui meccanismi che innescano le reazioni di produzione dei ROS, sia sull'azione *scavenger* dei radicali liberi responsabili della loro produzione. L'estratto di *Lippia citriodora* (LC), ad attività antiossidante, da noi utilizzato come integratore alimentare, potrebbe migliorare il profilo di alcuni parametri ematici e le performance produttive degli agnelli lattanti. Con il presente lavoro, si è inteso valutare l'effetto di un estratto vegetale LC (titolato al 50% di verbascoside), su alcuni parametri ematici e sulle performance produttive di agnelli lattanti di razza Lacaune. L'estratto LC è stato somministrato in forma liquida, nel latte agli agnelli, in forma solida, integrato nel mangime, alle madri nell'ultimo mese di gravidanza.

MATERIALE E METODI - La prova, della durata di 40 giorni, è stata condotta su 40 agnelli, provenienti da parto singolo, di razza Lacaune, dell'età di 2-3 giorni, suddivisi in 4 gruppi di 10 soggetti ciascuno, omogenei per sesso e peso vivo (5,340±0,466 kg) ed allattati naturalmente sino al termine della sperimentazione. Gli agnelli con le rispettive madri del Gruppo T (controllo) non hanno ricevuto alcuna integrazione alimentare con LC. Al gruppo I è stato somministrato, *per os*, solo agli agnelli, l'estratto di LC nella misura di 0,90 mg/kg p.v.^{0,75}/giorno, mentre le madri non hanno ricevuto alcuna integrazione. Al gruppo II, agli agnelli non è stata somministrata alcuna integrazione, mentre alle madri è stato somministrato nell'ultimo mese di gravidanza, l'estratto di LC nella misura di 0,49 mg/kg p.v.^{0,75}/giorno. Al gruppo III è stato somministrato, agli agnelli e alle madri, l'estratto di LC nei rispettivi dosaggi indicati nei gruppi I e II. Gli agnelli sono stati sottoposti a 0d, 20d e a 40d ai seguenti rilievi: peso vivo, consumo di latte, con il sistema della doppia pesata, prelievi ematici.

RISULTATI E DISCUSSIONE - Il peso vivo e gli incrementi giornalieri (Tab. 1) sono stati influenzati positivamente dal trattamento sperimentale con differenze significative (P<0,05) tra il gruppo T di controllo ed il gruppo III.

Il maggior consumo di latte (Tab. 1), rilevata, negli agnelli dei gruppi sperimentali (I, II e III) rispetto al controllo, potrebbe spiegare i più elevati pesi vivi e accrescimenti realizzati dai soggetti che hanno beneficiato dell'ingestione diretta e indiretta, tramite le madri, dell'estratto di LC. Il trattamento sperimentale con LC, al termine della prova, ha determinato una significativa riduzione (P<0,05) dei trigliceridi, del colesterolo totale e della bilirubina e un aumento del colesterolo HDL, evidenziando un effetto ipocolesterolemico ed epatoprotettivo dell'estratto naturale. La somministrazione di LC ha migliorato, inoltre, significativamente (P<0,01) tutti i markers dello status ossidativo plasmatico, con riduzione dei ROMs e dei TBARS e aumento delle vitamine A ed E, da attribuire, molto probabilmente, alla proprietà redox-attiva dei polifenoli presenti nell'estratto vegetale.

CONCLUSIONI - Dai risultati della presente ricerca emerge un effetto positivo dell'utilizzo dell'estratto vegetale di LC che ha prodotto un miglioramento di alcuni parametri del profilo ematico e delle performance produttive.

Tab. 1 Performance produttive degli agnelli

Parametri		GruppoT	Gruppi sperimentali I	II	III	ES	Effetto, P G
Agnelli	n.	10	10	10	10		
peso vivo:							
0 d	kg	5,320	5,315	5,160	5,519	0,081	ns
20 d	"	9,430	9,730	9,690	10,054	0,099	ns
40 d	"	13,880^{1}	14,570^{1,2}	14,380^{1,2}	15,000^{2}	0,140	*
incrementi:							
0-20d	g/d	205,43^{1}	220,98^{1,2}	226,20^{2}	219,84^{2}	2,759	*
20-40d	"	222,58	241,78	234,40	247,25	3,454	ns
Interaprova (0-40d)	"	*214,00^{1}*	*231,38^{1,2}*	*230,30^{1,2}*	*237,00^{2}*	*2,57*	*
consumi di latte:							
0-20 d	g/d	772,83^{1}	797,17^{1,2a}	861,67^{2,3}	937,50^{3}	13,70	*
20-40 d	"	854,50	862,50^{b}	855,67	945,33	12,45	ns
Interaprova (0-40 d)	"	*813,67^{1}*	*829,83^{2}*	*858,67^{2}*	*941,42^{2}*	*12,13*	*
indici di conversione:							
0-20d		*3,71*	*3,56*	*3,73*	*4,09*	*0,075*	*ns*
20-40d		*3,95*	*3,65*	*3,83*	*3,91*	*0,073*	*ns*
Interaprova (0-40d)		*3,83*	*3,6*	*3,78*	*4*	*0,057*	*ns*

ns = non significativo: ** P<0,01; * P<0,05
Sulla stessa riga medie seguite da numeri diversi differiscono per P<0,05 (^{1,2})

Tab. 2 Parametri ematici degli agnelli

Parametri		GruppoT	Gruppi sperimentali I	II	III	ES	Effetto, P G	T	GxT
Trigliceridi:									
0d	mmol/l	0,241^{a}	0,239^{a}	0,240^{a}	0,242^{a}	0,005			
20d	"	0,250^{1b}	0,213^{2b}	0,215^{2b}	0,214^{2b}	0,004			
40d	"	0,253^{1b}	0,205^{2c}	0,211^{2b}	0,200^{2c}	0,003	*	*	*
Colesterolo:									
0d	mmol/l	1,936	1,931^{a}	1,919	1,926^{a}	0,0129			
20d	"	1,937	1,899^{b}	1,904	1,899^{b}	0,0128			
40d	"	1,936^{1}	1,875^{2b}	1,890^{2}	1,855^{2c}	0,0132	*	*	*
Colesterolo HDL:									
0d	mmol/l	0,781	0,777^{a}	0,783	0,788^{a}	0,0126			
20d	"	0,784	0,813^{b}	0,789	0,814^{b}	0,0133			
40d	"	0,797^{1}	0,884^{2c}	0,802^{1}	0,894^{2c}	0,0206	*	*	*
Bilirubina:									
0d	μmol/l	8,04	7,97^{a}	8,04^{a}	7,99^{a}	0,239			
20d	"	8,21	7,52^{b}	7,87	7,52^{b}	0,154			
40d	"	8,22^{1}	7,18^{2c}	7,75^{2b}	7,01^{2c}	0,137	*	*	*

Sulla stessa riga medie seguite da numeri diversi differiscono per P<0,05 (^{1,2})
Sulla stessa colonna medie seguite da lettere diverse differiscono per P<0,05 (a,b.c)

Tab. 3 Parametri dello stato ossidativo plasmatico degli agnelli

Parametri		GruppoT	Gruppi sperimentali I	II	III	ES	Effetto, P G	T	GxT
ROMs:									
0d	U/Carr	209,95	205,38^{a}	207,1^{a}	210,62^{a}	9,392			
20d	"	236,16^{1}	174,51^{2a}	197,77^{1,2a}	168,41^{2b}	9,551			
40d	"	240,51^{1}	133,75^{2b}	150,21^{2,3b}	110,78^{2,4c}	9,203	**	**	*
TBARS:									
0d	μmol/l	0,171^{a}	0,174^{a}	0,176^{a}	0,173^{a}	0,009			
20d	"	0,193^{1}	0,138^{2b}	0,158	0,130^{2b}	0,010			
40d	"	0,260^{1b}	0,093^{2c}	0,143^{2b}	0,095^{2c}	0,017	**	**	*
Vit E:									
0d	mg/ml	0,118	0,119a	0,121^{a}	0,120^{a}	0,005			
20d	"	0,124^{1}	0,182^{2,b}	0,150^{a}	0,194^{2,b}	0,007			
40d	"	0,118^{1}	0,276^{2,c}	0,221^{2,3,b}	0,279^{3,c}	0,011	**	**	*
Vit A:									
0d	mg/ml	0,152	0,154^{a}	0,157^{a}	0,155^{a}	0,004			
20d	"	0,148^{1}	0,221^{2,b}	0,241^{2,b}	0,228^{2,b}	0,010			
40d	"	0,162^{1}	0,300^{2,c}	0,315^{2,3,c}	0,371^{3,c}	0,015	**	**	*

Sulla stessa riga medie seguite da numeri diversi differiscono per P<0,05 $^{(1,2,3)}$
Sulla stessa colonna medie seguite da lettere diverse differiscono per P<0,05 (a,b,c)

Effect of dietary lippia citriodora extract on various metabolites and productive performance in lacaune suckling lambs

Key words: *Lippia citriodora*, lambs, metabolites, productive performance.

Impiego di *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* in capre Cilentane allevate al pascolo: effetti sulla produzione quanti-qualitativa di latte

F. ZICARELLI[1], L. ADDI[1], R. TUDISCO[1], S. CALABRÒ[1], P. LOMBARDI[1], M.I. CUTRIGNELLI[1], G. MONIELLO[2], M. GROSSI[1], N. MUSCO[1], F. INFASCELLI[1]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II
[2] Dipartimento di Biologia Animale, Università di Sassari

Parole chiave: lieviti, capra, latte.

INTRODUZIONE - L'influenza sulla produzione quanti-qualitativa di latte dell'integrazione della dieta dei ruminanti con lieviti vivi è stata ampiamente indagata (Yoon e Stern, 1996; Abd El-Ghaniemail, 2004; Campanile et al., 2008) anche se meno noti risultano gli effetti quando gli animali sono allevati al pascolo (Mašek et al., 2008). Al fine di contribuire a colmare tale carenza, nel presente lavoro sono stati impiegati i lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* nella dieta di capre al pascolo.

MATERIALI E METODI - La prova è stata effettuata su 36 capre pluripare (tipo genetico Cilentana), che a partire da 90 ± 5 giorni dopo il parto sono state equamente suddivise in 3 gruppi omogenei per numero di parti e produzione di latte nella precedente lattazione. Al fine di soddisfare i fabbisogni nutritivi degli animali e sulla scorta di studi condotti precedentemente sullo stesso areale di allevamento (D'Urso et al, 2008; Tudisco et al, 2010; Tudisco et al., 2012), ad integrazione del pascolo - costituito per il 60% da leguminose e per il 40% da graminacee - sono stati somministrati 700 g/capo/die di una miscela (UFL/kg ss 1,03; PG/ss 18,1%) di orzo e favino. Alla miscela erano aggiunti 10 g di un prodotto commerciale contenente *Saccharomyces cerevisiae* per il gruppo SV o *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* per il gruppo VL. Il gruppo CTR ha rappresentato il controllo (nessuna aggiunta di lieviti alla miscela). A partire da 10 d dall'inizio della prova è stata registrata la produzione individuale e ogni 20 giorni sono stati prelevati campioni individuali di latte, per un numero totale di 4/capo. Su tali campioni, ottenuti ponderando le produzioni delle due mungiture giornaliere, sono stati determinati grasso, proteine e lattosio, mediante metodo all'infrarosso, e caseina, come suggerito dall'ASPA (1995). I dati sono stati elaborati mediante ANOVA e il confronto tra le medie è stato operato impiegando il Tukey-test (SAS, 2000).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'impiego dei lieviti non ha determinato variazioni significative della produzione media di latte, in accordo con quanto riportato per ovini allevati al pascolo da Masek et al., 2008. Al contrario, rispetto al gruppo controllo, sono state registrate diminuzioni significative (P<0,01) della percentuale di grasso quando è stato addizionato il *Saccharomyces cerevisiae* (gruppo SV) e di quelle di proteine, grasso e caseina nel caso di aggiunta alla dieta della miscela di *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* (gruppo VL) (Tab. 1). Per tutti i suddetti parametri, i valori più bassi sono stati riscontrati per il gruppo VL. L'analisi dei dati in funzione della distanza dal parto ha evidenziato, tuttavia, che le differenze riscontrate per le percentuali di grasso e di proteine, che venivano ad annullarsi col progredire della lattazione, erano da ascrivere essenzialmente ai valori ottenuti al primo prelievo (4,19 vs 4,41 vs 4,87, e 2,96 vs 3,13 vs 3,26 per grasso e proteine, rispettivamente nei gruppi VL, SV e CTR; P<0,05). Infine, grazie ad un lieve incremento della produzione media in entrambi i gruppi la cui dieta è stata addizionata con i lieviti, è da sottolineare che le quantità giornaliere (g/d) di grasso e di proteine fornite con il latte durante l'intero periodo sperimentale non sono risultate differenti tra i gruppi a confronto.

Tabella 1 - Produzione (kg/d), composizione chimica e caseina del latte.

	VL	SV	CTR	MSE
Produzione	1,63	1,63	1,48	0,13
Caseina, *%*	2,67^{B}	2,74^{AB}	2,81^{A}	0,05
Proteine, *g/d*	51,47	52,42	49,91	134
Grasso, *g/d*	69,92	72,08	70,44	361
Proteine, *%*	3,19^{B}	3,26^{AB}	3,41^{A}	0,13
Grasso, *%*	4,31^{B}	4,38^{B}	4,78^{A}	0,43
Lattosio, *%*	4,02	4,07	4,09	0,04
Caseina/proteine	84	84,4	82,8	12,9

MSE = varianza dell'errore.

The influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on milk yield of cilentana grazing dairy goat

Key words: live yeast, goat, milk.

Bibliografia

Abd El-Ghaniemail A.A. (2004), Influence of diet supplementation with yeast culture (S. cerevisiae) on performance of Zaraibi goats. Small Rum. Res. 52 (3): 223-229.

ASPA (1995), Metodi di analisi del latte delle principali specie zootecniche.

Campanile G., Zicarelli F.,Vecchio D., Pacelli C., Neglia G., Balestrieri A., Di Palo R., Infascelli F. (2008), Effects of S. cerevisiae on in vivo organic matter digestibility and milk yield in buffalo cows. Liv. Sci. 114 (2-3):358-361.

D'Urso S., Cutrignelli M.I., Calabrò S., Bovera F., Tudisco R., Piccolo V., Infascelli F., (2008), Influence of pasture on fatty acid profile of goat milk. J. An. Phys. An. Nutr. 92 (3):495-410.

Mašek T., Mikulec Z., Valpotić Z, Kušć e L, Mikulec V., Antunac N. (2008), The influence of live yeast cells (S. cerevisiae) on the performance of grazing dairy sheep in late lactation Veterinarski Arhiv 78 (2):95-104.

SAS (2000) SAS/STAT_ Software: SAS Institute Inc, Cary, NC.

Tudisco R., Cutrignelli M.I., Calabrò S. , Piccolo G., Bovera F., Guglielmelli A., Infascelli F. (2010), Influence of organic systems on milk fatty acid profile and CLA in goats. Small Rum. Res. 88:51-155.

Tudisco R., Calabrò S., Cutrignelli M.I, Moniello G., Grossi M., Gozalez O.J., Piccolo V., Infascelli F. (2012), Influence of organic systems on Stearoyl-CoA desaturase gene expression in goat milk. Small. Rum. Res. 106:37-42.

Yoon I.K., Stern M.D. (1996), Effects of Saccharomyces cerevisiae and Aspergillus oryzae cultures on ruminal fermentation in dairy cows. J Dairy Sci. 79(3): 411-7.

Sessione poster

La selezione genetica per la resistenza alla scrapie a tutela della capra *Girgentana* e della biodiversità

S. AGNELLO, S. MIGLIORE, S. MIGNACCA, F. DI PAOLA, V. DI MARCO LO PRESTI, M. VITALE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

Parole chiave: caprini, scrapie, selezione genetica, biodiversità.

INTRODUZIONE - La scrapie è un'encefalopatia spongiforme trasmissibile (EST) che colpisce gli ovi-caprini. L'unico strumento di controllo della scrapie nella capra si basa sull'individuazione dei capi positivi e sul conseguente abbattimento totale dei capi presenti nel focolaio, con notevoli ripercussioni negative nel settore dell'allevamento caprino e sulle razze autoctone a rischio di estinzione.
La capra *Girgentana* è una razza autoctona siciliana ottima produttrice di latte di altissima qualità. Dagli anni '70, si è assistito, purtroppo, a una consistente contrazione numerica dei soggetti allevati in purezza. A seguito di questo declino, oggi questa pregiata razza è considerata a rischio di estinzione, infatti i capi iscritti al Libro Genealogico (LG) sono in totale 390, di cui 324 capre. (Dati ASSO.NA.PA. 2013).
Studi di campo e sperimentali hanno messo in luce l'associazione tra resistenza alla scrapie e il polimorfismo del gene *PRNP* 222K.
Lo scopo di questo studio è quello di analizzare il gene *PRNP* nella razza *Girgentana*, in modo da identificare la frequenza dell'allele 222K e valutare la possibilità di ipotizzare un piano di selezione genetica per la resistenza alla scrapie anche nella specie caprina.
MATERIALI E METODI - Il presente studio ha interessato 8 aziende. Il sangue intero in EDTA è stato prelevato in 136 soggetti di razza *Girgentana* (101 femmine e 35 maschi), il campionamento è stato esteso anche ai soggetti non iscritti al LG. L'area interessata è stata quella dove la razza è maggiormente diffusa, tra le province di AG, CL ed CT.
Da ogni campione è stato estratto il DNA genomico e si è proseguito mediante PCR con l'amplificazione e il sequenziamento della regione che codifica il gene *PRNP.* I risultati sono stati in seguito interpretati e da ogni campione è stato estrapolato il genotipo.
Successivamente si è proseguito con l'analisi della frequenza degli alleli mutati, tra cui il 222K.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'analisi del gene *PRNP* nella razza *Girgentana* ha messo in evidenza 6 siti polimorfici: 37V, 143R, 154H, 168Q, 222K e 240P. La mutazione 240P si è mostrata la più diffusa nella razza in studio, seguita da 168Q (0,19), 143R (0,04), 154H (0,008) e 37V (0,004). Queste mutazioni seppur presenti non hanno mai messo in luce un'associazione con la resistenza alla scrapie in studi scientifici precedenti.
La mutazione 222K, per la quale è stata già descritta un'associazione con la resistenza alla scrapie, ha registrato una frequenza dello 0,19% ed è stata rinvenuta in 46 soggetti (33,8% del campione), tra questi, 5 soggetti presentavano la mutazione in omozigosi (K222K).
La selezione genetica per la resistenza alla scrapie rappresenta oggi l'unico metodo utile per eradicare la scrapie dai greggi ovi-caprini. La presenza endemica della scrapie caprina nel territorio siciliano e la mancanza di un relativo piano di controllo potrebbero vanificare l'intero piano attuato per l'eradicazione della scrapie nella pecora. Tutto ciò denota l'importanza di studi di genotipizzazione della PrP nelle popolazioni caprine.
Poco si conosce infatti, sui polimorfismi del gene *PRNP* nei caprini autoctoni siciliani, ma la caratterizzazione genetica può essere un valido aiuto sia nei progetti di valorizzazione e di recupero delle razze meno diffuse che per supportare la salvaguardia della biodiversità.
La capra *Girgentana* ha sia un enorme valore ambientale, culturale e scientifico che un grande valore economico, è l'unica razza caprina autoctona siciliana iscritta al Libro Genealogico e le sue produzioni sono considerate di pregio e di altissima qualità. Questa preziosa razza, oggi a rischio di estinzione, necessita di un'attenta protezione e di una maggiore salvaguardia.
Per evitare l'estinzione di questa razza, diverse organizzazioni a vari livelli, mirano al rilancio attraverso la caratterizzazione e la valorizzazione del latte e dei formaggi; in particolar modo "Slow Food" mira ad elevare la qualità dei cibi e dei prodotti zootecnici a tutela e salvaguardia delle razze e della diversità biologica. Una maggiore diffusione del latte e dei prodotti caseari di sola *Girgentana* potrebbe contribuire a ridare importanza e sostenibilità economica all'allevamento, portando gradualmente all'auspicata auto sostenibilità economica della razza.
Questa antica razza può ancora contribuire notevolmente a uno sviluppo sostenibile dell'agro-ecosistema in cui essa è inserita, realizzando uno stretto legame con l'ambiente, le tradizioni e la cultura circostante.
Il risultato ottenuto nel nostro studio, seppur preliminare, arricchisce ulteriormente la capra *Girgentana*. Infatti una l'elevata frequenza dell'allele 222K, lascia ipotizzare una buona resistenza alla scrapie su base genetica. Tale resistenza, oltre a rappresentare un ulteriore elemento pro diffusione e valorizzazione della razza, rappresenta anche un dato di partenza per ipotizzare un piano di selezione genetica per l'eradicazione della scrapie anche nella specie caprina.

Genetic selection for scrapie resistance to preserve girgentana goat and biodiversity

Key words: goats, scrapie, genetic selection, biodiversity.

Bibliografia

Migliore, S., Agnello, S., Mignacca, S., Amato, B., Di Marco Lo Presti, V., Vitale, M. (2014), Food Safety And Scrapie Control Through Genetic Selection. Prion Gene Analysis In "Girgentana": A Sicilian Goat Breed. IAFP's European Symposium on Food Safety, Budapest, 7-9 May th, 2014.

Questo studio è stato finanziato da:
- ***EMIDA ERA-NET project:*** *"GOAT-TSE-FREE - Towards breeding of goats for genetically determined TSEs resistance"*
- ***Ricerca corrente IZSSI 16/11:*** *"Selezione genetica per la resistenza TSE in Popolazioni ovine autoctone siciliane per le produzioni TSE free"*

Effetto del contenuto in cellule somatiche sull'attività degli enzimi proteolitici endogeni nel latte ovino

M. ALBENZIO, A. SANTILLO, M. CAROPRESE, D. RUGGIERI, R. MARINO, A. SEVI

Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi di Foggia, 71122 Foggia, Italia

Parole chiave: latte ovino, cellule somatiche, enzimi.

INTRODUZIONE - Gli enzimi endogeni del latte ovino sono principalmente rappresentati dal sistema enzimatico plasmina-plasminogeno, dalla catepsina D, dall'elastasi e dalle lipasi. Nell'ambito degli enzimi proteolitici endogeni il sistema plasmina-plasminogeno risulta essere il più indagato, al contrario la catepsina e l'elastasi nelle produzioni ovicaprine hanno ricevuto minore attenzione (Albenzio e Santillo, 2011). Le infezioni intramammarie sono responsabili del passaggio dal sangue al latte di alcuni componenti quali neutrofili, citochine ed enzimi endogeni (Albenzio et al., 2009; Albenzio e Caroprese, 2011). Tali enzimi risultano essere associati alle cellule leucocitarie e sono coinvolti nel processo di degradazione della caseina. Pertanto, la conta delle cellule somatiche del latte rappresenta, tutt'oggi, il parametro di valutazione sia dello stato di salute degli animali sia della qualità del latte. L'attività di ricerca è stata effettuata al fine di valutare l'effetto del contenuto in cellule somatiche sugli enzimi proteolitici endogeni nel latte ovino.

MATERIALI E METODI - L'esperimento è stato effettuato in un'azienda zootecnica situata nel territorio di Capitanata (Foggia) su 700 ovini di razza Comisana. Il contenuto in cellule somatiche del latte ovino è stato determinato secondo le metodiche IDF e i campioni sono stati classificati in funzione del contenuto in cellule somatiche. Sono state definite cinque classi: <300.000 cellule/mL (CS300); da 300.000 a 500.000 cellule/mL (CS500); da 501.000 a 1.000.000 cellule/mL (CS1000); da 1.001.000 a 2,000,000 cellule/mL (CS2000); e >2.000.000 cellule/mL (CS>2000). Il periodo di durata dell'esperimento è stato di 6 mesi; sono stati effettuati 4 cicli di campionamento, ciascun ciclo della durata di 3 settimane. I campioni di latte individuale che hanno mostrato un contenuto in cellule somatiche ricadente sempre nella stessa classe di cellule somatiche, per almeno tre giorni consecutivi, sono stati inclusi nello studio. Sui campioni di latte ovino sono state determinate le attività degli enzimi proteolitici endogeni quali plasmina, elastasi e catepsina D mediante saggio colorimetrico (Albenzio et al., 2009).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'attività degli enzimi proteolitici endogeni in funzione del contenuto in cellule somatiche del latte ovino è riportata in Tabella 1. L'attività della plasmina aumenta all'aumentare del contenuto in cellule somatiche del latte. In particolare, il valore più basso è stato registrato nella classe con un contenuto in CS inferiore a 300.000 CS/ml. Valori intermedi sono stati osservati nella classe SC500. A partire da 1.000.000 di CS/ml il valore dell'attività della plasmina si è attestata su livelli più elevati. Molti autori riportano un aumento dell'attività della plasmina all'aumentare del numero di leucociti neutrofili polimorfonucleati (PMNL; Moatsou, 2010). L'incremento nella conversione dello zimogeno in plasmina può essere attribuito all'incremento della produzione di attivatori urochinasici associati alle popolazione leucocitarie, in particolare dei macrofagi e dei PMNL (Albenzio et al., 2011). La catepsina D presenta il valore più elevato nei campioni appartenenti alla classe SC2000; l'andamento dell'attività di questo enzima è complesso e non è linearmente correlato al contenuto in cellule somatiche (Albenzio et al., 2009). L'elastasi non risultata essere influenzata dal contenuto in cellule somatiche del latte ovino. Tale enzima contribuisce in misura minore all'attività proteolitica endogena totale. Lo studio del pattern degli enzimi proteolitici endogeni contribuisce, in associazione al contenuto in cellule somatiche, alla valutazione dello stato di salute della ghiandola mammaria dell'animale e alla valutazione della qualità della frazione proteica del latte ovino. Quest'ultimo aspetto risulta essere particolarmente importante per il latte ovino poiché completamente destinato alla lavorazione lattiero-casearia per la produzione di formaggi tipici.

Effect of somatic of somatic cell count on indigenous enzymes in ewe milk

Key words: ewe milk, somatic cell count, proteolytic enzymes.

Bibliografia

Albenzio M., Santillo A., Caroprese M., d'Angelo F., Marino R., and Sevi A. (2009), Role of endogenous enzymes in proteolysis of sheep milk. J. Dairy Sci. 92:79-86.

Albenzio M., Santillo A., Caroprese M., Schena L., Russo D.E., and Sevi A. (2011), composition, indigenous proteolytic enzymes and coagulation behaviour of ewe milk as affected by somatic cell count. J.. Dairy Res. 78:442-447.

Albenzio M. e Santillo A. (2011), Biochemical characteristics of ewe and goat milk: effect on the quality of dairy products. Small Rum. Res. 101: 33-40.

Albenzio, M. e. Caroprese M.(2011), Differential leuukocyte count for ewe milk with low and high somatic cell count. J. Dairy Res. 78:43-48.

Moatsou, G. (2010), Indigenouys enzymatic activities in ovine and caprine milks. Int. J of Dairy Tech. 63:16-31.

Tabella 1 - Effetto del contenuto in cellule somatiche sull'attività enzimatica del latte ovino.

			CCS				P
	CS300	CS500	CS1000	CS2000	CS > 2000	ESM	CCS
Plasmina, U/mL	6,46[a]	8,42[b]	10,44[c]	11,71[c]	10,72[c]	0,6	***
Catepsina D, U/mL	4,98[a]	5,06[a]	5,13[a]	5,61[b]	5,01[a]	0,15	**
Elastasi, U/mL	0,15	0,14	0,13	0,14	0,15	0,01	NS

CCS: < 300.000 cellule/mL (CS300); da 300.000 a 500.000 cellule/mL (CS500); da 501.000 a 1.000.000 cellule/mL (CS1000); da 1.001.000 a 2.000.000 cellule/mL (CS2000); e > 2.000.000 cellule/mL (CS>2000).
ESM: errore standard medio. *** P<0,001, ** P<0,01. NS, non significativo.

Analisi di campioni di latte per la ricerca di Aflatossina M1 mediante metodo analitico di conferma HPLC/FLD

A. ARMENTANO, S. SUMMA, M. MUSCARELLA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Parole chiave: aflatossina M1, latte ovi-caprino, HPLC/FLD.

INTRODUZIONE - Un importante problema dell'igiene degli alimenti è rappresentato dalle aflatossine, metaboliti tossici, teratogeni e cancerogeni derivati da funghi saprofiti: *Aspergillus flavus ed Aspergillus parasiticus.* L'ingestione, da parte di animali in lattazione, di alimenti contaminati da Aflatossina B1 (AFB1) provoca l'escrezione con il latte di un metabolita idrossilato, l'aflatossina M1 (AFM1). A causa dei suoi effetti tossici, teratogeni e cancerogeni l'AFM1 è inserita nella categoria B dell'allegato 1 della Direttiva 96/23/CE e per tale sostanza è stato fissato un livello massimo residuale nel latte pari a 0.05 µg/kg (Regolamento CE N. 165/2010).

Le tecniche di trasformazione degli alimenti, come la preparazione del formaggio, non distruggono l'AFM1, anzi la tossina si concentra, legandosi alla frazione proteica, in particolare alla caseina.

Il problema dell'AFM1 nel latte è stato da anni affrontato dal punto di vista analitico con un approccio di screening ELISA ed uno di conferma HPLC. Presso la Struttura semplice Farmaci e Tossicologia dell'IZS della Puglia e della Basilicata è stato ottimizzato un metodo quantitativo di conferma HPLC con rivelazione fluorimetrica.

Su tale metodo è stata verificata la conformità delle prestazioni secondo i requisiti vigenti (Reg. 401/2006; Dec. 657/2002/CE; Linea guida II.ZZ.SS. Micotossine).

MATERIALI E METODI

Preparazione del campione: Si effettua una centrifugazione preliminare (10°, 3500 giri, 10 minuti), mediante centrifuga refrigerata. Si pesano 10 g di latte precedentemente trattato e si procede alla purificazione mediante colonnine di immunoaffinità (RIDA Aflatoxin column, R-Biopharm, Darmstadt). Si porta a secco l'eluato in TURBOVAP sotto flusso di azoto e si riprende con 500 µl di fase mobile.

Apparecchiatura: Cromatografo liquido Agilent Technologies SL 1200 Series (Waldbronn, Germania).

Reagenti: Acqua per HPLC, Metanolo per HPLC (Baker, Deventer, Olanda); Acetonitrile (Carlo Erba, Italia); soluzione standard di AFM1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Condizioni cromatografiche: Colonna cromatografica per HPLC ZORBAX ECLIPSE XDB-C_{18} (250 mm, diametro: 4.6 mm, dimensioni particelle 5 µm). Eluizione in gradiente, fase mobile Acqua, Acetonitrile, Metanolo (55:40:5).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Una dettagliata descrizione delle performances validative del metodo è stata riportata in precedenti lavori condotti nei nostri laboratori. Gli studi validativi sono stati effettuati su campioni di latte bovino. Poiché in tutto il Mezzogiorno la produzione lattiero-casearia in specie ovi-caprine ha un'importanza rilevante nell'alimentazione e nell'economia, la validazione del metodo è stata successivamente integrata con studi di robustezza per variazioni marcate, dimostrando l'applicabilità del metodo anche al latte ovi-caprino e bufalino. Negli anni 2013-2014 sono stati analizzati, mediante metodo di conferma HPLC/FLD, 57 campioni di latte, risultati positivi all'analisi di screening ELISA. Tra tutti i campioni analizzati solo uno (1,7%) era costituito da latte caprino. L'analisi di conferma di questo campione ha stabilito la presenza di AF M1 pari a 0.110 ± 0.015 µg/kg. In Fig.1 è riportato il cromatogramma del campione di latte caprino non conforme. Il latte proveniva da capre allevate nella provincia di Foggia ed alimentate con mais contaminato. Infatti, le analisi sul mais hanno fornito una concentrazione di AFB1 pari a 32.6 ± 3.6 µg/kg, di gran lunga superiore al limite di legge.

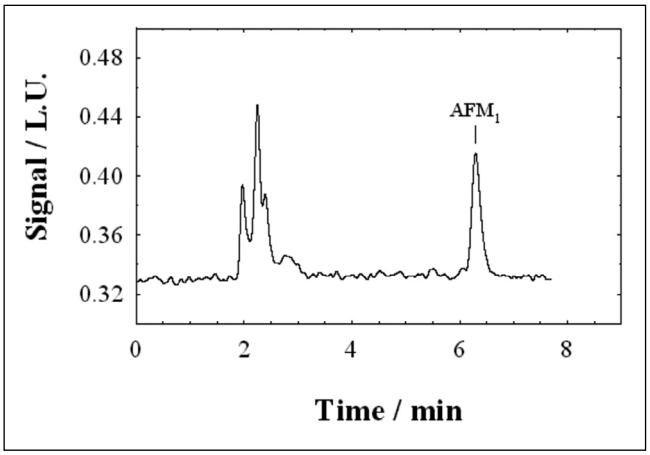


Figura 1 - Cromatogramma ottenuto da un campione di latte caprino alla concentrazione di 0.110 ± 0.015 µg/kg.

La presenza di AFM1 nel latte caprino a livelli preoccupanti suggerisce come sia necessario, per garantire la sicurezza alimentare e migliorare la qualità dei prodotti tradizionali, intensificare i controlli e le analisi per le specie ovi-caprine, allevate soprattutto nelle piccole aziende agricole.

Analysis of milk samples for the detection of aflatoxin M1 by HPLC /FLD confirmatory method

Key word: aflatoxin M1, milk, HPLC/FLD.

Bibliografia

Gruppo di lavoro dei Laboratori di Chimica degli IIZZSS. Linea guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova di conferma per la determinazione delle sostanze di categoria B in accordo con la Decisione 657/2002/CE (sezione Micotossine).

ISO 14501. (2007) Milk and milk powder-Determination of aflatoxin M1 content - Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid Chromatography. Geneve: International Organization for Standardization.

ISO 14675.(2003) Milk and milk products - Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays- Determination of aflatoxin M1 content. Geneva: International Organization for Standardization.

Muscarella M., Lo Magro S., Palermo C., Centonze D. (2007), Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Analytica Chimica Acta 594: 257-264.

Effetto dell'integrazione della dieta di pecore con *Rosmarinus officinalis* sullo stato ossidativo del formaggio Pecorino durante la stagionatura

R. BRANCIARI[1], C. FORTE[1], M. TRABALZA MARINUCCI[1], D. RANUCCI[1], M. ORRU[1], M. CODINI[2], R. ORTENZI[3], D. MIRAGLIA[1], A. VALIANI[3]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia
[2] Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia
[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Parole chiave: *Rosmarinus officinalis*, antiossidanti, formaggio Pecorino.

INTRODUZIONE - Numerosi studi hanno dimostrato che una vasta gamma di fitoderivati, qualora inclusi nella dieta degli animali di interesse zootecnico, sono in grado di migliorare le prestazioni produttive e la qualità del prodotto (Zhang et al., 2006). Tra i principali metaboliti attivi sono da ricordare quelli ad effetto antiossidante, classificabili dal punto di vista chimico in diterpeni, derivati caffeici e flavoni. Tali composti bioattivi espletano la loro attività antiossidante attraverso un effetto "*scavenger*" sulle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Aruoma et al., 1992). Il rosmarino (*Rosmarinus officinalis*) ha effetti benefici sulla salute dell'uomo e degli animali (tra gli altri, quelli antitumorali, antinfiammatori ed antireumatici). I componenti responsabili dell'azione antiossidante (90%) sono principalmente l'acido carnosico ed il carnosolo (Aruoma et al., 1992), presenti soprattutto nelle foglie. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l´effetto dell´integrazione di rosmarino nella dieta di pecore da latte sulla stabilità ossidativa ed il potere antiossidante del formaggio Pecorino.

MATERIALI E METODI - La prova si è svolta in un allevamento di pecore di razza Sarda, situato in una zona collinare del comune di Perugia, composto da 300 capi in lattazione. Il gregge è stato suddiviso in due gruppi: un gruppo trattato (R) ed un gruppo controllo (CTR). Entrambi i gruppi hanno ricevuto un mangime pellettato (PG: 18,4%; NDF: 29,7%) in ragione di 400 g/capo/die, somministrato durante le due mungiture giornaliere. Nel caso del gruppo R, il mangime era integrato in ragione del 2,5% con foglie di rosmarino essiccate e macinate. La sperimentazione ha avuto una durata di 50 giorni ed è stata preceduta da un periodo di adattamento alla dieta pari a 2 settimane. La caseificazione è stata effettuata separatamente per i due gruppi sperimentali ed ha previsto l'impiego di latte crudo inoculato con starter selezionati. I prodotti ottenuti sono stati posti a stagionare in cella condizionata (T 12°C, 85% U.R.) per 60 giorni. Sui formaggi, a partire dal tempo 0, è stata valutata la capacità antiossidante mediante ORACFL (Prior et al., 2004). La determinazione della stabilità ossidativa del formaggio è stata valutata mediante il metodo TBARS (sostanze reagenti con l'acido tiobarbiturico; Mele et al., 2011); la quantificazione è stata effettuata attraverso la costruzione di una curva standard con l'1,1,3,3-tetrametossipropano (Sigma Aldrich, St. Louis).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La somministrazione di rosmarino si è dimostrata in grado di influenzare lo stato ossidativo dei formaggi. I TBARs (Fig. 1) hanno fatto registrare valori inferiori nel gruppo R rispetto al gruppo CTR a partire da 30 giorni fino alla fine del periodo di stagionatura. Per quanto riguarda la capacità antiossidante del formaggio (Fig. 2), anch'essa è aumentata nel corso della stagionatura ed è risultata influenzata dal trattamento alimentare fin dal primo giorno. L'integrazione con rosmarino nella dieta di pecore in lattazione può rappresentare un metodo efficace per garantire un miglioramento della stabilità ossidativa del formaggio Pecorino a media stagionatura.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Ricerca corrente IZS UM 004/09RC

Effect of the inclusion of *Rosmarinus officinalis* in sarda sheep's diet on the oxidative status of pecorino cheese during ripening

Key words: *Rosmarinus officinalis*, antioxidants, Pecorino cheese.

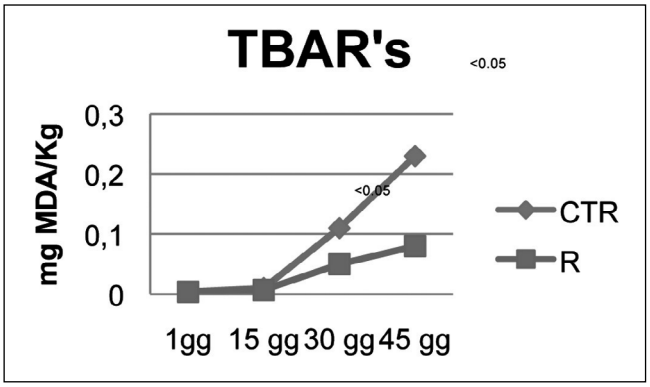


Figura 1 - Andamento della stabilità ossidativa (TBAR's) dei formaggi durante la stagionatura.

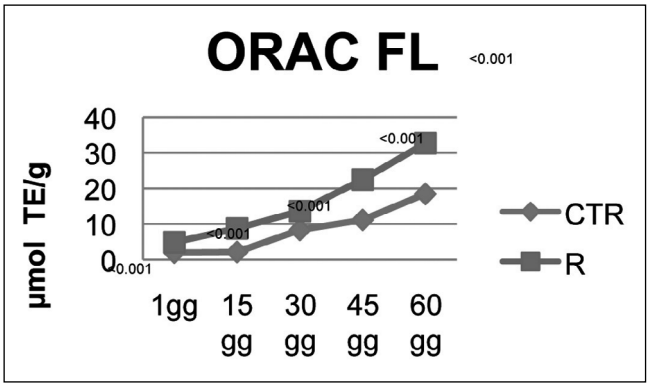


Figura 2 - Andamento della capacità antiossidante dei formaggi durante la stagionatura.

Bibliografia

Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R., Löligers J. (1992), Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. Xenobiotica, 22(2): 257-268.

Mele M., Contarini G., Cercaci L., Serra A., Buccioni A., Povolo M., Secchiari P. (2011), Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with extruded linseed: effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability. International dairy journal, 21(5):365-372.

Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., ... & Jacob, R. (2003), Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(11):3273-3279.

Zhang, R., Mustafa, A. F., & Zhao, X. (2006). Effects of flaxseed supplementation to lactating ewes on milk composition, cheese yield, and fatty acid composition of milk and cheese. Small ruminant research, 63(3): 233-24.

Identificazione e localizzazione immunoistochimica della leptina e del suo recettore nell'apparato digerente del cervo

C. DALL'AGLIO[1], L. PASCUCCI[1], P. SCOCCO[2], F. MERCATI[1], P. CECCARELLI[1]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia
[2] Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Camerino

Parole chiave: Ob, ObR, immunoistochimica, ruminanti selvatici.

INTRODUZIONE - La leptina, prodotto del gene *Ob*, è e un ormone proteico che svolge un ruolo fondamentale nel controllo dell'appetito e del metabolismo energetico. Uno dei principali produttori di leptina è il tessuto adiposo (Zhang et al., 1994; Considine et al., 1995). Il suo recettore è associato alla membrana plasmatica ed è presente in sei isoforme che differiscono per la lunghezza delle porzioni trans-membrana e citoplasmatica ma presentano la stessa affinità di legame per la leptina (Chen et al., 1996). La leptina è stata da subito considerata un importante sistema di comunicazione tra il tessuto adiposo e il sistema nervoso ed, essendo la sua concentrazione plasmatica proporzionale alla massa adiposa, un importante indicatore di sazietà o appetito (Campfield et al., 1995). Questa iniziale considerazione è stata successivamente ampliata dalle numerose osservazioni fatte nell'uomo, negli animali da laboratorio e in quelli domestici che hanno evidenziato la distribuzione di questa molecola e del suo recettore nei diversi organi e apparati tra i quali alcuni organi dell'apparato digerente, p.es. lo stomaco (Bado et al., 1998), il pancreas (Dall'Aglio et al., 2013) e le ghiandole salivari maggiori (Dall'Aglio et al., 2012[a]) ma anche organi anatomicamente e funzionalmente non correlati con l'apparato digerente, quali la placenta (Dall'Aglio et al., 2012[b]), l'ovidutto (Zerani et al., 2005), la ghiandola mammaria (Ressel et al., 2012) etc. Queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare che la stessa molecola oltre a svolgere il ruolo fondamentale che inizialmente le è stato assegnato, possa intervenire in maniera autocrina/paracrina nel controllo funzionale degli organi nei quali la sua presenza è stata rilevata.
In letteratura non ci sono dati relativi alla presenza e distribuzione di queste molecole nell'apparato digerente di animali selvatici, pertanto lo scopo di questo lavoro è stato quello di andare a ricercare l'eventuale loro presenza e distribuzione nei diversi tratti dell'apparato digerente del cervo, prendendo in particolare in esame l'abomaso, il duodeno e il retto, di animali adulti e sani.
MATERIALI E METODI - I prelievi sono stati effettuati presso un mattatoio locale adibito alla macellazione di animali selvatici. Il materiale prelevato è stato fissato in formalina tamponata e quindi regolarmente processato per l'inclusione in paraffina. Per la reazione immunoistochimica, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: un anticorpo policlonale di coniglio anti-Ob (sc-842, SCBT) e un anticorpo policlonale di coniglio anti-ObR (e sc-8325, SCBT) in idonea concentrazione. Il legame antigene-anticorpo è stato dimostrato mediante la tecnica dell'avidina-biotina e la reazione è stata sviluppata con l'uso della diaminobenzidina.
Controlli positivi e negativi sono stati inseriti nella ricerca.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Abbiamo osservato una forte immunopositività per la leptina e il suo recettore in tutti i tratti anatomici presi in esame: in particolare, nell'abomaso abbiamo evidenziato la presenza di numerose cellule positive tra le cellule epiteliali delle ghiandole tubulari semplici e ramificate. Queste cellule hanno dimostrato una forma spesso triangolare con il nucleo localizzato nella parte citoplasmatica basale e uno stretto prolungamento citoplasmatico dorsale che si spinge tra le cellule adiacenti fino a raggiungere il lume ghiandolare. Non è stata osservata positività tra le cellule dell'epitelio di rivestimento. Nel duodeno abbiamo osservato positività per la leptina e il recettore in alcune cellule delle ghiandole duodenali della sottomucosa, tipiche di questo tratto di intestino, mentre nessuna positività è stata riscontrata tra le cellule epiteliali di rivestimento o tra le cellule delle ghiandole intestinali della mucosa. Anche in questo caso le cellule positive hanno dimostrato nella maggior parte dei casi una chiara morfologia triangolare. Sia nel caso dell'abomaso che del duodeno la morfologia e la localizzazione delle cellule positive ci ha portato a concludere che le cellule interessate dalla immunoreazione siano quelle identificate come neuroendocrine e ad ipotizzare che la doppia positività sia l'espressione di una autoregolazione delle stesse cellule da parte della leptina che, con meccanismo autocrino/paracrino, interverrebbe nel controllo dell'attività funzionale delle stesse. Nel grosso intestino non abbiamo osservato positività per la leptina e il suo recettore tra le cellule epiteliali di rivestimento e tra le cellule degli epiteli ghiandolari. Tuttavia una forte positività per la proteina e il suo recettore è stata evidenziata nei neuroni dei plessi sottomucoso e mioenterico di tutti i tratti intestinali presi in esame e questo ci ha portato ad ipotizzare che la leptina possa intervenire sempre con meccanismo autocrino/paracrino anche nel controllo dell'attività funzionale dell'intestino e in particolare dell'attività contrattile dello stesso.

Immunohistochemical identification and localization of leptin and its receptor in the digestive tract of the deer

Key words: Ob, ObR, immunohistochemistry, wild ruminants.

Bibliografia

Bado A., Levasseur S., Attoub S, Kermorgant S., Laigneau JP., Bortoluzzi MN., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y., Lewin Mj. (1998), The stomach is a source of leptin. Nature 394: 790-793.

Campfield LA., Smith FJ., Guisez Y., Devos R., Burn P. (1995), Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science 269: 546-9.

Chen H, Charlat O., Tartaglia LA., Woolf EA., Weng X., Ellis SJ., Lakey ND., Culpepper J., Moore KJ., Breitbart RE., Duyk GM., Tepper RI., Morgenstern JP. (1996), Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell 84: 491-5.

Considine RV., Considine EL., Williams CS., Nyce MR., Magosin SA., Bauer TL., Rosato EL., Colberg J., Caro JF. (1995), Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. The Journal of Clinical Investigation. 95: 2986-8.

Dall'Aglio C., Maranesi M., Pascucci L., Mercati F., Ceccarelli P. (2012a), Immunohistochemical distribution of leptin receptor in the major salivary glands. Research in Veterinary Science 93: 1116-1118.

Dall'Aglio C., Polisca A., Boiti C., Ceccarelli P. (2012b), Immunolocalization of leptin and its receptor in the placenta of cats. Acta Histochemica 114: 719-22.

Dall'Aglio C., Mercati F., Pascucci L., Ceccarelli P. (2013), Immunolocalization of leptin and its receptor in the pancreas of the horse. Acta Histochemica 115: 757-760.

Ressel L., Finotello R., Innocenti VM., Vannozzi I., Poli A. (2012), Preliminary report on the expression of leptin and leptin receptor (ObR) in normal, hyperplastic and neoplastic canine mammary tissues. Research in Veterinary Science 93: 343-9.

Zerani M., Boiti C., Dall'Aglio C., Pascucci L., Maranesi M., Brecchia G., Mariottini C., Guelfi G., Zampini D., Gobbetti A. (2005), Journal of Endocrinology 185: 319-325.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman JM. (1994), Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-32.

Effetto degli Acidi Umici sull'infettività della Scrapie valutata sperimentalmente in un gruppo di agnelli: risultati preliminari

N. D'AVINO[1], G. FILIPPINI[1], M. BIAGETTI[1], M. CIULLO[1], G. PEZZOTTI[1], E. MANUALI[1], S. PAVONE[1], M. PANICCIÀ[1], G. GIACHIN[2], O. ANDREOLETTI[3], G. LEGNAME[2], L. LEITA[4]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche
[2] Department of Neuroscience, Laboratory of Prion Biology, Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati (SISSA), Trieste, Italy
[3] INRA, UMR 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France
[4] CRA - Consiglio per la ricerca e sperimentazione in agricoltura (Centro RPS), Gorizia, Italy

Parole chiave: scrapie, acidi umici, infettività.

INTRODUZIONE - La Scrapie è una malattia neurodegenerativa che colpisce i piccoli ruminanti, appartenente al gruppo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE). Crescenti evidenze sembrano dimostrare come il suolo possa rappresentare un *reservoir* importante per il prione ed influenzare, in base alla sua composizione, la capacità di diffusione dell'agente. Recentemente è stato preso in considerazione il ruolo delle sostanze umiche (molecole che si formano a seguito della biodegradazione microbica di substrati organici) quali fattori in grado di legare il prione nei terreni ricchi di materiale organico e, quindi, limitarne l'infettività. Risultati preliminari hanno evidenziato come le sostanze umiche estratte dal suolo, gli acidi umici e fulvici in particolare, manifestino la capacità di attenuare l'infettività nelle cellule cronicamente infettate con PrPSc in vitro. L'obiettivo del presente lavoro è stato verificare *in vivo* la capacità delle sostanze umiche di legare il prione e limitarne la capacità diffusiva a livello del tratto gastro intestinale degli agnelli.

MATERIALI E METODI - Sono stati selezionati 28 agnelli di razza bergamasca, di circa 2 mesi di età, suddivisi in quattro gruppi sottoposti ai seguenti inoculi:

Gruppo 1: 4 soggetti, cui sono stati somministrati acidi umici *per os* per 15 gg (controllo Negativo);

Gruppo 2: 8 soggetti, cui sono stati somministrati 5 grammi di omogenato di tessuto cerebrale infetto tramite sonda gastrica ed acidi umici *per os* per 15 gg;

Gruppo 3: 8 soggetti, cui sono stati somministrati 5 grammi di omogenato di tessuto cerebrale infetto (Controllo Positivo);

Gruppo 4: 8 soggetti, cui sono stati somministrati 5 grammi di omogenato di tessuto cerebrale infetto ed acidi umici *per os* per 15 gg.

Trascorso un periodo di 8 mesi i soggetti dei 4 gruppi sono stati sacrificati ad intervalli mensili e sottoposti al campionamento dei seguenti organi: Lingua, Rumine, Reticolo, Omaso, Abomaso, Duodeno, Digiuno, Ileo, Cieco, Colon, Retto, Fegato, Tonsille, Linfonodi Retrofaringei, Linfonodi Sottomandibolari, Timo, Linfonodi mesenterici, Milza, Terza Palpebra, Ganglio Stellato, Ganglio Nodoso, Ganglio Celiaco, Midollo Allungato, Midollo Spinale (tratto cervicale, toracico, lombare, sacrale), Gangli Spinali (cervicali, toracici, lombari, sacrali), Cervello, Cervelletto. Tutti i campioni prelevati sono stati processati tramite test ELISA (IDEXX HerdCheck® BSE-Scrapie Ag Test). Gli stessi campioni saranno successivamente sottoposti ad indagini istologiche (ematossilina-Eosina) e immunoistochimiche (IHC).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Ad oggi sono disponibili solo i risultati del test ELISA relativi ai primi quattro campionamenti (Tab. 1). I dati preliminari suggeriscono che la via di somministrazione (*per os* versus sonda gastrica) dell'omogenato di tessuto infetto sia in grado di influenzare la capacità di diffusione della proteina prionica. In particolare, la somministrazione per via orale si correla ad una più ampia distribuzione della proteina prionica nei tessuti dell'animale infettato sperimentalmente.

Per quanto riguarda l'effetto della somministrazione di acidi umici, questi dati preliminari non sembrano confermare il loro supposto effetto protettivo. I risultati che si otterranno dalle indagini ancora in corso serviranno a chiarire il quadro preliminare, permettendo di verificare con maggiore accuratezza l'effettivo ruolo degli acidi umici nel ridurre la capacità di infezione e diffusione della proteina prionica negli agnelli.

Tabella 1 - Risultati del test ELISA dei primi 4 campionamenti.

	CAMPIONAMENTO 1	CAMPIONAMENTO 2	CAMPIONAMENTO 3	CAMPIONAMENTO 4
GRUPPO 1 (AU *per os*)	/	ARR/ARQ **NEGATIVO**	/	ARQ/ARQ **NEGATIVO**
GRUPPO 2 (PrPsc via sonda +AC *per os*)	ARQ/ARQ **POSITIVO** LNF Retrofaringeo	Non campionato*	Non campionato*	ARQ/ARQ **POSITIVO** Ileo
GRUPPO 3 (PrPsc *per os*)	ARR/ARQ **POSITIVO** Ganglio Nodoso	ARQ/AHQ **POSITIVO** Ileo	ARQ/ARQ **POSITIVO** Digiuno	ARQ/ARQ **POSITIVO** Digiuno
GRUPPO 4 (PrPsc per os+ AU *per os*)	ARQ/ARQ **POSITIVO** LNF Retrofaringeo Digiuno Ileo	ARQ/ARH **POSITIVO** LNF Retrofaringeo Digiuno Ileo Midollo allungato Midollo spinale	ARQ/ARQ **POSITIVO** LNF Retrofaringeo Digiuno Ileo Milza LNF Sottomandibolare	ARH/ARH **NEGATIVO**

*Soggetti deceduti per cause naturali; il campionamento è stato omesso per prolungare i tempi dell'infezione

Effect of humic substances on scrapie infectivity experimentally evaluated in lamb: preliminary results

Key words: scrapie, humic substances, infectivity.

Bibliografia

Giachin, G.; Margon, A.; Narkiewicz, J.; Legname, G.; Leita, L. (2013). Antiprion activity of soil humic substances. Book of Abstracts of the Fourth International Conference on Environmental Management, Engineering, planning and Economics and SECOTOX Conference.

Giachin, G.; Narkiewicz, J.; Scaini, D.; Saha, R.; Margon, A.; Leita, L.; Legname, G. (2013) Humic Substances underlies the odds of environmental TSEs transmission Atti Prion.

Leita L., Fornasiera F., De Nobilib M., Bertolic A., Genovesic S., Sequid P. (2006), Interactions of prion proteins with soil, Soil Biology & Biochemistry 38: 1638-1644.

Leita, L.; Giachin, G.; Margon, A.; Narkiewicz, J.; Legname, G. (2013). Soil humic substances hinder the propagation of prions Atti EGU European Geoscience Union.

Ryder S.J., Dexter G. E., Heasman L., Warner R., Moore S.J., (2009), Accumulation and dissemination of prion protein in experimentalsheep scrapie in the natural host, BMC Veterinary Research: 5-9.

Van Keulen L.J.M, Bossers A., Van Zijderveld F., (2008) TSE pathogenesis in cattle and sheep Vet. Res: 39-24.

Van Keulen L.J.M, Vromans M.E.W., Van Zijderveld F., (2002),Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep, APMIS: 23-32.

Caratteri tipici della capra Nicastrese

F. DE NARDO

RARE - Associazione Italiana Razze Autoctone a Rischio di Estinzione

Parole chiave: capra Nicastrese, Calabria.

Insieme alla Capra dell'Aspromonte e alla Rustica di Calabria, la capra Nicastrese rappresenta un'importante tassello del variegato mosaico della biodiversità caprina calabrese. È con il D.M. n° 21206 dell'8.3.2005 art. 1 comma B che il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali decreta l'ammissione al registro anagrafico delle popolazioni ovine e caprine autoctone a limitata diffusione, successivamente al riconoscimento dell'Associazione Nazionale della Pastorizia (ASSO.NA.PA.) avvenuto nella riunione della Commissione Tecnica Centrale del Registro Anagrafico delle razze ovine e caprine autoctone a limitata diffusione riunita a Roma il 18 giugno 2003. Autoctona del territorio di Nicastro, erede dell'antica *Neocastrum* di origine bizantina (dal nome greco *Neòcastron* = castello nuovo), posta ai piedi del Monte Reventino, ora Lamezia Terme, per la spiccata attitudine lattifera, grande rusticità, frugalità, resistenza alle malattie e alle diverse situazioni ambientali, tutte caratteristiche molto apprezzate dagli allevatori, si è diffusa negli anni su tutto il territorio della Regione Calabria. I dati forniti (ASSO.NA.PA.) riferiti al 31.12.2013, riportano una consistenza di soli 4.975 capi iscritti ai registri anagrafici, distribuiti su 57 aziende, ricadenti nelle cinque province calabresi. L'Associazione Italiana Allevatori (AIA), nel medesimo periodo, riporta 1.750 capi sottoposti ai controlli funzionali su 27 allevamenti controllati. Tale numerosità la fa includere tra le razze a rischio di estinzione secondo quanto proposto dalla FAO Expert Consultation del 1992. Il modello di pigmentazione è ascrivibile al tipo eumelaninico ad estremità e ventre feomelaninici. Il mantello è nero con ventre arti e parte della testa di colore bianco (*Jèlino*); per questo motivo alcuni allevatori in alcune zone chiamano questa capra con l'appellativo di *jèlina*. La parte bianca del ventre può estendersi lungo i fianchi. Il pelo è lungo e liscio nelle femmine, più ruvido nei maschi. Presenta (41% della popolazione) un sottopelo di tipo cashmere o kashmir. La pelle è morbida, fine ed elastica, di colore grigio-nero nella zona a mantello eumelaninico, rosa nella zona a mantello feomelaninico. La testa è piccola, leggera, più grossa nel maschio, con profilo fronto-nasale rettilineo. Della peluria di colore nero con doppia striscia bianca sulla zona fronto-nasale, è uniformemente distribuita nella zona frontale nei maschi e nelle femmine, con un ciuffo di peli neri ben marcato nei maschi alla base delle corna. Gli occhi sono grandi, vivaci ed espressivi. Generalmente la testa è provvista di corna in ambo i sessi. Le caratteristiche corna a forma di lira aperta con punte divergenti sono più sviluppate nei maschi e, sempre presenti in ambo i sessi, piatte e larghe alla base. Le orecchie, di medie dimensioni, hanno portamento semi-pendente anteriore, con e senza arricciatura. Le tettole o lacinie e la barbetta sono in genere presenti in ambo i sessi, in particolare nei becchi la barbetta è marcatamente folta e lunga. Il collo è leggero nelle femmine, robusto nei maschi, di media lunghezza. Le tettole possono essere unilaterali e bilaterali. Il torace è profondo e l'addome è voluminoso. La regione dorso-lombare è rettilinea, la groppa è ben sviluppata e mediamente spiovente. La borsa scrotale è ampia con capezzoli grandi e sviluppati. L'apparato mammario è ampio con mammelle del tipo pecorino, raramente piriformi, con capezzoli ben sviluppati. Gli arti sono leggeri nelle femmine, robusti nei maschi, lunghi, con unghielli scuri solidi e compatti, di colore ardesia. Urgono dei piani volti a capitalizzare il notevole polimorfismo ai *loci* delle caseine $\alpha s1$ e β quale strumento per il miglioramento delle caratteristiche qualitative del latte, senza tralasciare possibili azioni sulla qualità della carne e della fibra del sottopelo.

Tabella 1 - Caratteri biometrici.

Caratteri biometrici	Maschi adulti	Femmine adulte
Altezza al garrese cm	78	71
Altezza alla croce cm	77	70
Lunghezza tronco cm	74	67
Larghezza torace cm	22	19
Altezza torace cm	35	33
Larghezza groppa cm	17	16
Lunghezza orecchie cm	18	17
Larghezza orecchie cm	7	7
Profondità toracica cm	44	40
Circonferenza stinco cm	11	9
Circonferenza toracica cm	93	83
Lunghezza tettole cm	8	7
Lunghezza barbetta cm	13	8
Lunghezza corna cm	49	37
Peso Kg	78	46

Tabella 2 - Caratteri riproduttivi.

Fertilià annuale	97%
Prolificità	182 %
Fecondità annuale	176 %
Età media al primo parto	16 mesi

Tabella 3 - Caratteri produttivi latte.

Categoria	Giorni	Latte
Primipare	180	150
Secondipare	220	210
Pluripare	260	210
Aspetti qualitativi del latte		
Grasso 4,30	Proteine 3,50	Lattosio 4,70
Residuo secco 13,50	Residuo secco magro 9,10	

Tabella 4 - Caratteri produttivi carne.

Peso capretti alla nascita	3,5 Kg
Peso capretti a 30 gg	10 Kg

Tabella 5 - Caratteri produttivi fibra.

MFD µm	MFD-sd µm	Y %	DL mm	GHL mm	CR score
13,29	4,03	9,1	31	125	3,0
Follicoli primari %			Follicoli secondari %		
88,83			43,92		

MFD: diametro medio della fibra, MFD-sd: deviazione standard del diametro della fibra, Y: resa in cashmere, DL: sottovello, GHL: fibra grossolana, CR: numero di ondulazioni.

Typical characteristics of goat Nicastrese

Key words: Nicastrese goats, Calabria.

Bibliografia

Asso.Na.Pa (2013) - Banca Dati. Consistenze della razza Nicastrese (Q2).
Bigi D., Zanon A. (2008). Atlante delle razze autoctone. Edagricole.
De Nardo F. (2011). Razze zootecniche in pericolo di estinzione: capra Nicastrese. Vita in Campagna, 12: 53.
De Nardo F. (2006). L'allevamento ovi-caprino in Calabria. La Settimana Veterinaria, Le Point Vétérinaire Italie - Edizioni veterinarie e agrozootecniche Milano, 537:II - IV.
De Nardo F. (2003). La razza caprina Nicastrese. News R.A.R.E. Dicembre, 16-18.
Di Trana A., Celi P., Sepe L., Desantis S., Rubino R. (2004). Fleece and skin traits of goats of different genetic types reared in southern Italy. South African Journal of Animal Science, 34 (Supplement 1).
Pulina G. (2005). L'alimentazione della capra da latte. Avenue media.

Profilo descrittivo della Capra dell'Aspromonte

F. DE NARDO

RARE - Associazione Italiana Razze Autoctone a Rischio di Estinzione

Parole chiave: capra dell'Aspromonte, Calabria.

La Capra dell'Aspromonte è autoctona dell'omonimo massiccio posto a sud della Calabria e, in particolare, del comprensorio grecanico dello stesso (Bigi e Zanon, 2008); successivamente si è diffusa su tutto il territorio della provincia di Reggio Calabria. Di ceppo mediterraneo è presente ed allevata in tutta la provincia di Reggio Calabria e, in particolare, nell'area dell'Aspromonte, dello Zomaro nonché nella fascia ionica della stessa provincia. È con il D.M. n° 21206 dell'8.3.2005 art. 1 comma B che il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (De Nardo, 2006[a]) decreta l'ammissione al registro anagrafico delle popolazioni ovine e caprine autoctone a limitata diffusione, successivamente al riconoscimento dell'Associazione Nazionale della Pastorizia (ASSO.NA.PA.) avvenuto nella riunione della Commissione Tecnica Centrale del Registro Anagrafico delle popolazioni ovine e caprine autoctone a limitata diffusione riunita a Roma il 21 luglio 2004. I dati forniti dall'ASSO.NA.PA. riferiti al 31.12.2013, riportano una consistenza di 27.164 capi iscritti al registro anagrafico, distribuiti su 194 aziende ricadenti esclusivamente nella provincia di Reggio Calabria. L'Associazione Italiana Allevatori (AIA), nel medesimo periodo, riporta 16.961 capi sottoposti ai controlli funzionali su 157 allevamenti controllati. L'attitudine produttiva prevalente è alla produzione di latte. Di taglia media, con profilo fronto-nasale rettilineo (De Nardo, 2012). La zona frontale nei maschi e nelle femmine è uniformemente distribuita di peluria, con presenza di un ciuffo di peli in ambo i sessi alla base delle corna. Gli occhi sono medi, vivaci ed espressivi. Generalmente la testa è provvista di corna in ambo i sessi. Le corna, di tipo mediterraneo, sono mediamente sviluppate nelle femmine a forma di lira aperta a punte divergenti, piatte e larghe alla base. Nei maschi le corna sono più sviluppate delle femmine, lunghe, a forma di lira aperta a punte divergenti, piatte e larghe alla base. Le orecchie sono di medie dimensioni, con portamento eretto o semi eretto senza arricciatura; una modesta percentuale di soggetti, in ambo i sessi, presenta orecchie cortissime o cenni di orecchie (*minde*). Le tettole o lacinie e la barbetta sono in genere presenti in ambo i sessi, in particolare nei becchi la barbetta è più folta e più lunga. Le tettole sono generalmente bilaterali, ma non si escludono soggetti con tettole unilaterali; assenza di wattle. Il collo è leggero nelle femmine e più robusto nei maschi, di media lunghezza e ben attaccato. Il torace e l'addome sono mediamente ampi; la regione dorso-lombare è rettilinea, la groppa è mediocremente sviluppata e spiovente. La borsa scrotale è ampia con capezzoli grandi e sviluppati. L'apparato mammario ben attaccato all'addome. Le mammelle sono del tipo pecorino, raramente piriformi, con capezzoli di media dimensione. Gli arti sono leggeri nelle femmine, più robusti nei maschi, lunghi, con unghielli scuri, solidi e compatti. Il modello di pigmentazione è ascrivibile al tipo feomelaninico (rosso) con sfumature e tonalità diverse; possono essere presenti soggetti con modelli di pigmentazione del tipo eumelaninico (bruno), mantellato anteriore e posteriore (bianco/nero, rosso/bianco, marrone/rosso) e cintati. Ai differenti tipi di mantelli sono attribuiti nomi particolari come *cápula* (capra con cinta bianca), *jérina* o *jérána* (pezzata di due colori, dal greco γεραυός), *rómana* (capra mezza bianca e mezza nera), *múrina* (capra che ha il muso bianco), *xédela* (capra nera con la pancia rossa o strisciata di bianco o marrone), *láfina* (capra nera con macchie rosse), *ródina* (capra con pelo rossastro, dal greco ρόδινος). Esistono inoltre una serie di mantelli variamente colorati, con il colore rosso alla base: i nomi di tali mantelli hanno come prefisso i termini di *ruso* o *riso* e sono: *rusofélina* (capra con mantello di due colori), *rusoláfina* (capra con mantello grigio e rossastro, dal greco μουρινός), *risocápula* o *rusocápula* (capra striata di rosso), *risocástina* o *rusocástina* (capra di un castagno rossastro), *risofávara* o *rusofávara* (capra con mantello pezzato), *risojérina* o *rusojérina* (capra con mantello bianco e rossastro), *risolívina* o *rusolívina* (capra con mantello grigio e macchie rossastre), *risomúrina* o *rusomúrina* (capra con mantello rossastro e muso bianco), *risopétrola* o *rusopétrola* (capra con mantello rossastro e macchie di un altro colore), *risorómina* o *rusorómina* (capra di diversi colori con macchie rossastre), *risoságripa* o *rususágripa* (capra con mantello nero, pezzato di rosso e muso bianco) (De Nardo, 2006[b]). Il pelo è lungo e liscio nelle femmine, leggermente più ruvido nei maschi. La pelle è morbida, fine ed elastica, dello stesso colore e tonalità del mantello, ovvero, di colore grigio-nero nelle zone a mantello eumelaninico, rosa nelle zone a mantello feomelaninico. Presenta in ambo i sessi un sottovello di tipo kashmir (Di Trana et al., 2004).

Tabella 1 - Caratteri biometrici.

Caratteri biometrici	Maschi adulti	Femmine adulte
Altezza al garrese cm	73	69
Altezza alla croce cm	71	68
Lunghezza tronco cm	72	66
Larghezza torace cm	21	17
Altezza torace cm	33	30
Larghezza groppa cm	20	15
Lunghezza orecchie cm	13	14
Larghezza orecchie cm	5,5	6
Profondità toracica cm	39	37
Circonferenza dello stinco anteriore cm	10	8
Circonferenza toracica cm	99	81
Lunghezza tettole cm	5	5
Lunghezza barbetta cm	22	9
Lunghezza corna cm	59	34
Peso Kg	64	43

Tabella 2 - Caratteri riproduttivi.

Fertilià annuale	98%
Prolificità	159 %
Fecondità annuale	148 %
Età media al primo parto	15 mesi

Tabella 3 - Caratteri produttivi latte.

Categoria	Giorni	Latte
Primipare	150	140
Secondipare	160	150
Pluripare	210	220
Aspetti qualitativi del latte		
Grasso 3,95	Proteine 3,57	Lattosio 4,63	Residuo secco 14,02

Tabella 4 - Caratteri produttivi carne.

Peso capretti alla nascita	3,2 Kg
Peso capretti a 30 gg	9 Kg

Descriptive profile of the aspromonte goat

Key words: Aspromonte goats, Calabria.

Bibliografia

Asso.Na.Pa (2013), Banca Dati. Consistenze della razza Capra dell'Aspromonte (Q3).

Bigi D., Zanon A. (2008), Atlante delle razze autoctone. Edagricole.

De Nardo F. (2006a), L'allevamento ovi-caprino in Calabria. La settimana Veterinaria, Le Point Vétérinaira Italie-Edizioni veterinarie e agro zootecniche Milano, 537:II-IV.

De Nardo F. (2006b), La Capra dell'Aspromonte. News RARE marzo 6-8.

De Nardo F. (2012), Razze zootecniche in pericolo di estinzione: Capra dell'Aspromonte. Vita in Campagna 1:55.

Di Trana A., Celi P., Sepe L., Desantis S., Rubino R. (2004), Fleece and skin traits of goats of different genetic types reared in southern Italy. South African Journal of Animal Science 34 (Supplement 1).

Aspetti morfo-funzionali della capra Rustica di Calabria

F. DE NARDO

RARE - Associazione Italiana Razze Autoctone a Rischio di Estinzione

Parole chiave: capra Rustica di Calabria, Sila.

Autoctona dell'altopiano della Sila, la capra Rustica di Calabria, è diffusa soprattutto nelle province di Cosenza e Crotone e, marginalmente, nelle province di Catanzaro e Vibo Valentia. La marcata rusticità e resistenza alle malattie la rendono molto gradita agli allevatori calabresi per l'utilizzazione delle zone interne e montane tale, da svolgere una grande funzione di tutela dell'ambiente e del paesaggio coniugata ad una preziosa ed insostituibile attività economica; per questi motivi, spesso, tale allevamento coesiste con quello del bovino Podolico (De Nardo, 2014). Precedentemente denominata Sciara Rustica Calabrese - Di Cosenza, con il D.M. n° 21206 dell'8.3.2005 art. 3 il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali ne decreta la sostituzione della denominazione in Rustica di Calabria successivamente all'approvazione da parte dell'Associazione Nazionale della Pastorizia (ASSO.NA.PA.), avvenuta nella riunione della Commissione Tecnica Centrale del Registro Anagrafico delle popolazioni ovine e caprine autoctone a limitata diffusione, riunita a Roma il 21 luglio 2004. I dati forniti dall'ASSO.NA.PA. riferiti al 31.12.2013, riportano una consistenza di 24.130 capi iscritti al registro anagrafico (attivato nell'anno 2004), distribuiti su 145 aziende, ricadenti soprattutto nelle province di Cosenza e Crotone. L'attitudine produttiva è da considerarsi a duplice attitudine, da latte e da carne (De Nardo, 2006). Trattasi di una popolazione molto eterogenea, di ceppo mediterraneo. Di taglia media, con profilo fronto-nasale rettilineo. La zona frontale nei maschi e nelle femmine è uniformemente distribuita di peluria, con presenza di un ciuffo di peli in ambo i sessi alla base delle corna. Gli occhi sono medi, vivaci ed espressivi. La testa è sempre provvista di corna in ambo i sessi. Le corna, di tipo mediterraneo, sono mediamente sviluppate nelle femmine a forma di lira aperta a punte divergenti, piatte e larghe alla base. Nei maschi le corna sono più sviluppate delle femmine, lunghe, a forma di lira aperta a punte divergenti, piatte e larghe alla base. Le orecchie sono di medie dimensioni, con portamento semi pendente con o senza apice ripiegato; una modesta percentuale di soggetti, in ambo i sessi, presenta orecchie cortissime o cenni di orecchie (cosiddette capre *zupe* o *minde* ovvero *zipre* in linguaggio albanese) (Rohlfs, 1977). Le tettole o lacinie e la barbetta sono in genere presenti in ambo i sessi, in particolare nei becchi la barbetta è più folta e più lunga. Le tettole sono generalmente bilaterali, ma non si escludono soggetti con tettole monolaterali; assenza di wattle. Il collo è leggero nelle femmine più robusto nei maschi, di media lunghezza e ben attaccato. Il torace e l'addome sono mediamente ampi; la regione dorso-lombare è rettilinea, la groppa è mediocremente sviluppata e spiovente. La borsa scrotale è ampia con capezzoli grandi e sviluppati. L'apparato mammario ben attaccato all'addome. La mammella prevalente è del tipo bifido, ma sono presenti anche i tipi ipoglobosa, semibifida e globosa. Gli arti sono leggeri nelle femmine, più robusti nei maschi, lunghi, con unghielli scuri, solidi e compatti. Il mantello generalmente è monocolore; prevale in particolare il colore nero con sfumature e pezzature varie (Bigi e Zanon, 2008). Possono essere presenti anche mantelli di colore bianco e marrone con tonalità e pezzature varie. Il pelo è lungo, sericeo e liscio, più ruvido nei maschi e, fluente su tutto il corpo. È presente in ambo i sessi un sottovello (down fibre) di tipo kashmir (Di Trana et al., 2004). Il latte prodotto è utilizzato in particolare per la realizzazione di formaggi tipici calabresi a coagulazione presamica (De Nardo, 2004[b]) come la cacioricotta, la caciotta, il canestrato, la felciata o filiciata di Calabria, il formaggio di capra, la giuncata di capra, il paddaccio, il pecorino crotonese, oltre alle apprezzatissime ricotte (De Nardo, 2004[a]).

Tabella 1 - Caratteri biometrici.

Caratteri biometrici	Maschi adulti	Femmine adulte
Altezza al garrese cm	75 - 80	60
Peso Kg	65 - 70	45 - 50

Tabella 2 - Caratteri produttivi latte.

Categoria	Giorni	Latte
Pluripare	180	200 - 250

Tabella 3 - Caratteri produttivi carne.

Peso capretti alla nascita	3,6 Kg
Peso capretti a 30 gg	9 Kg

Tabella 4 - Caratteri produttivi fibra.

MFD µm	MFD-sd µm	Y %	DL mm	GHL mm	CR score
13,03	2,42	9,6	30	119	2,5
Follicoli primari %			Follicoli secondari %		
82,51			57,99		

MFD: diametro medio della fibra, MFD-sd: deviazione standard del diametro della fibra, Y: resa in cashmere, DL: sottovello, GHL: fibra grossolana, CR: numero di ondulazioni.

Morpho-functional aspects of goat Rustica di Calabria

Key words: Rustica di Calabria goats, Sila.

Bibliografia

Asso.Na.Pa (2013), Banca Dati. Consistenze della razza Rustica di Calabria (N3).

Bigi D., Zanon A. (2008), Atlante delle razze autoctone. Edagricole.

De Nardo F. (2004a), La Regione Calabria punta alla tutela delle produzioni casearie tradizionali. Ovini e Caprini, 3: 12 -13.

De Nardo F. (2004b), La tradizione casearia è salva. Caseus, 3: 25 -28.

De Nardo F. (2006), L'allevamento ovi-caprino in Calabria. La Settimana Veterinaria, Le Point Vétérinaire Italie - Edizioni veterinarie e agrozootecniche Milano, 537:II - IV.

De Nardo F. (2014), Razze a rischio di estinzione: la capra Rustica di Calabria. Vita in Campagna, 1: 51.

Di Trana A., Celi P., Sepe L., Desantis S., Rubino R. (2004), Fleece and skin traits of goats of different genetic types reared in southern Italy. South African Journal of Animal Science, 34 (Supplement 1).

Rohlfs G. (1977), Nuovo dizionario dialettale della Calabria. Longo editore, Ravenna.

Programma di avvio di un piano di conservazione della popolazione ovina Altamurana: I. Indagine demografica e sanitaria della popolazione

N. DIBENEDETTO[1], A. CAPOGNA[2], P. DIRENZO[3], E. PIERAGOSTINI[2]

[1] Consorzio Murgia Viva; [2] Università di Bari; [3] Agronomo Libero Professionista

Parole chiave: Salvaguardia razze autoctone, controllo del benessere.

INTRODUZIONE - La razza Altamurana è autoctona di un areale il cui valore ecologico è testimoniato dalla sua inclusione nella perimetrazione delle aree SIC e Z.P.S., nella Rete ecologica Natura 2000, e nel Parco Nazionale dell'Alta Murgia, dove il sistema ecologico è anche il "prodotto" di una attività antropica susseguitasi nel corso dei secoli e dove, per la predominanza degli spazi ad uso agro-zootecnico, le specie e gli habitat di interesse conservazionistico risultano intimamente dipendenti dalle pratiche e dalle strategie delle aziende agro-zootecniche. La maggiore adattabilità dell'Altamurana agli agenti nosologici locali permetterebbe un ridotto approccio chemioterapico al controllo delle patologie infettive ed infestive, con conseguente riduzione del rilascio di residui ad azione farmacologica nell'ambiente e negli alimenti stessi. L'allevamento della pecora Altamurana sostanzierebbe, fortificandolo, il legame delle produzioni alimentari con il "*terroir*" d'origine. È sulla base di queste considerazioni, e del fatto che da anni la razza Altamurana viene annoverata tra le razze a rischio di estinzione, che prende lo spunto il Programma di avvio di un piano di conservazione della popolazione ovina Altamurana (INCIPIT) realizzato dall'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" e finanziato dall'Ente Parco Nazionale dell'Alta Murgia. Detto progetto ha come scopo principale la ricognizione degli individui della Razza ovina Altamurana per valutarne caratteristiche demografiche e sanitarie dei singoli soggetti e della popolazione. In questo lavoro vengono riportati i risultati relativi alla valutazione delle caratteristiche demografiche e sanitarie dei singoli soggetti e della popolazione.
MATERIALI E METODI - Aziende. L'indagine è stata effettuata avvalendosi *in primis* delle informazioni fornite dall'Associazione Regionale Allevatori di Puglia relative ai nominativi degli Allevatori detentori di soggetti di razza Altamurana in purezza. Una volta informati del contenuto del progetto, detti allevatori si sono dichiarati tutti disponibili a partecipare.

Tabella 1 - Elenco delle aziende che allevano soggetti di razza Altamurana in purezza ed aderiscono al progetto.

Azienda	n° capi
Az. Agr. S.S. Ciminiera	30
Colamonaco Valeria	31
Masseria Viti De Angelis Antonello	80
Verde Murgia Società Cooperativa a.r.l.	54
Tortorelli Rosa	109
Masseria Agricola Lacalcara srl Società Agricola	13
Picerno Nicola	47
Agrizootecnica Dibenedetto & C.	145
Totale	**509**

Nota: Dall'elenco sfugge solo il dato relativo al gregge di circa 200 capi presso l'Ovile nazionale di Segezia - Foggia i cui responsabili, nonostante i ripetuti solleciti, si sono mostrati riluttanti ad aderire al progetto possibilmente per un problema di aggravio organizzativo dal momento che il gregge delle Altamurane, costante nel numero da anni, è mescolato a diverse centinaia di altri ovini e separato solo al momento delle monte.
Analisi. Nella fase di controllo dello stato sanitario delle aziende è stata valutata la condizione corporea di ogni animale (BCS), è stato prelevato singolarmente un campione di sangue da utilizzare per eseguire l'esame emocromocitometrico completo, ed effettuata la raccolte delle feci a campione onde verificare la carica parassitaria dell'allevamento (Petazzi et al.2009).

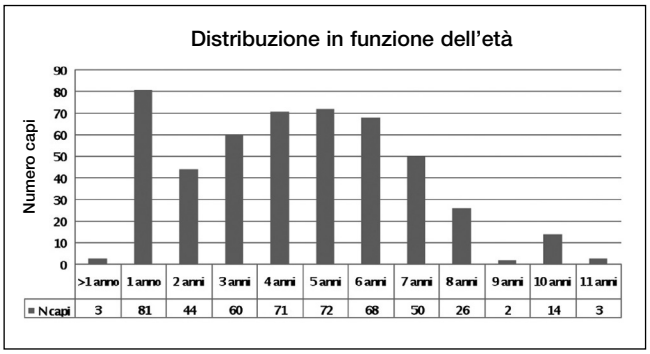


Figura 1 - Ripartizione della popolazione in funzione delle classi di età.

Tabella 2 - Evoluzione numerica del contingente di ovini di razza Altamurana nel corso del progetto INCIPIT.

Soggetti	2013	2014	Incremento%
Totale maschi	50	58	13,8
Totale femmine	457	606	24,6
Totale	507	664	23,6

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La tabella 1 fotografa la situazione della razza al momento dell'avvio del progetto e mostra una difformità nella consistenza del gregge che varia da un minimo di 13 ad un massimo di 145; inoltre si tratta per lo più di aziende plurirazza/specie, a parte il caso della masseria Viti-De Angelis in cui esiste solo il gregge di ovini Altamurani.
Dalla valutazione del BCS e dai risultati delle analisi ematologiche si evince un generale benessere dei soggetti, prova di una corretta conduzione allevatoriale, Anche l'indagine parassitologica dei greggi non ha rivelato situazioni al di là delle consuete parassitosi per le quali si è provveduto ad informare il proprietario e dare indicazioni circa il presidio farmacologico opportuno.
Osservando la figura 1 si osserva che accanto ad una distribuzione normale che indica come più frequenti le classi di età tra i tre ed i sei anni, la classe più numerosa è quella dei soggetti di un anno che dà conto della evoluzione numerica della popolazione riportato in tabella 2 e che conferma l'interesse degli allevatori nel voler proseguire nel mantenimento della razza e nel suo progetto di valorizzazione.

A conservation effort for the Altamurana local sheep breed: I. demographic survey

Key words: sheep, native breeds, welfare.

Bibliografia

Petazzi F., Rubino G., Alloggio, I., Caroli A., Pieragostini E. (2009), Relationships among functional markers, management, and husbandry in sheep: a Mediterranean case study. Vet. Res. Commun. 33, 865-874.

Effetto del genotipo al locus CSN1S1 e della dieta sul contenuto di alcuni oligosaccaridi nel latte di capra

A. DI TRANA[1] , M.A. DI NAPOLI[2], P. DI GREGORIO[1] , S. CLAPS[2], D. GIORGIO[1]

[1] SAFE, Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi della Basilicata, Viale dell'Ateneo Lucano 10, Campus di Macchia Romana, 85100 Potenza, Italia; [2] CRA-ZOE, Unità di ricerca per la zootecnia estensiva (Bella PZ), Via Appia, Bella Scalo 85054, Muro Lucano, Italia

Parole chiave: oligosaccaridi, genotipo CSN1S1, dieta, latte.

INTRODUZIONE - Il polimorfismo genetico al locus CSN1S1 nella capra influenza alcuni parametri del latte come il contenuto in caseina, urea, grasso e acidi grassi. La sintesi dei componenti del latte è regolata dall'apporto dei nutrienti (Ollier et al., 2007). Studi recenti hanno osservato una interazione tra polimorfismo al locus CSN1S1 e nutrizione animale sul livello produttivo e la resa in caseina (Pagano et al. 2010). Il polimorfismo al locus CSN1S1 influenza la presenza dei fucosilati nel latte caprino; questi componenti rappresentano una frazione degli oligosaccaridi (OS) del latte caprino (Meyrand et al., 2013). Gli OS sono formati da 3-12 molecole glucidiche sintetizzate a livello del reticolo endoplasmatico (RE) della cellula epiteliale mammaria, sede anche della sintesi della caseina. Gli OS presentano un notevole interesse perché sono caratterizzati da attività biologica in vitro e in vivo (Bode, 2006) e, nel latte caprino, il loro profilo è simile a quello umano (Viverge et al., 1997). A seguito delle relazioni riscontrate in letteratura, abbiamo ipotizzato l'influenza del polimorfismo al locus CSN1S1 e dell'apporto nutritivo sul contenuto di una classe di OS, i Sialyloligosaccaridi, nel latte caprino.

MATERIALI E METODI - Sono state utilizzate 12 capre di razza Derivata di Siria omogenee per produzione (1,3±0,3kg), giorni di lattazione (50±3), peso (42,1±1,2kg) e selezionate per genotipo al locus CSN1S1: 6 capre omozigoti per l'allele forte A (AA) e 6 capre omozigoti per l'allele debole F (FF). Tutte le capre presentavano lo stesso genotipo ai loci CSN1S2 (AA) e CSN2 (BB). Il genotipo degli animali è stato determinato come riportato da Pagano et al., (2010). È stato utilizzato un modello fattoriale 2 x 2 con due genotipi (G: AA e FF) e due diete in pellet (D: M, L) che coprivano il 100% e il 70% del fabbisogno energetico e il 105% e il 75% del fabbisogno proteico. Gli animali sono stati mantenuti in box singoli. La prova, relativa alla singola dieta testata, ha avuto la durata di 8 giorni preceduta da 15 giorni di adattamento. I campioni di latte sono stati prelevati nel quarto giorno del periodo sperimentale e conservati a -20°C. I singoli OS 3'-sialyllactose (3-SL), 6'-sialyllactose (6-SL) e disialyllactose (DSL) sono stati isolati dalle altre componenti del latte, separati mediante *high performance anion exchange chromatography*, identificati e quantizzati secondo quanto riportato da Claps et al., (2013). L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con la procedura ANOVA prendendo in esame il fattore genotipo CSN1S1 (G), la dieta (D) e l'interazione (G x D). I dati sono stati trasformati in Log prima dell'elaborazione statistica.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Dai risultati ottenuti è emerso che il genotipo e la dieta hanno influenzato il contenuto del 3-SL (P<0,05). L'interazione tra i fattori studiati ha manifestato solo una tendenza per il 3-SL. Per quanto concerne il 6-SL e il DLS è stata rilevata una riduzione, non significativa, nei soggetti che hanno ricevuto una dieta inferiore ai fabbisogni. La riduzione del 3-SL nel gruppo FF potrebbe essere messa in relazione all'accumulo di proteine immature, nel RE della cellula epiteliale mammaria (Chanat et al., 1999), che a cascata potrebbe generare una influenza negativa sugli enzimi responsabili della sintesi di OS nel latte (Ollier et al.,2008). Un effetto del genotipo è stato riscontrato su un altro gruppo di OS del latte caprino, i fucosilati, mentre la concentrazione totale di OS non è stata alterata dal genotipo (Meyrand et al., 2013). Per quanto concerne l'effetto della dieta, il gruppo alimentato al di sotto dei fabbisogni ha presentato una riduzione del contenuto di 3-SL pari al 58.5% rispetto al gruppo M. Questo risultato potrebbe avere un legame con la riduzione dell'espressione genica di geni implicati nella sintesi dei costituenti del latte in seguito ad un digiuno prolungato per 48h (Ollier et al., 2007). Inoltre, nella specie umana è stata riscontrata una riduzione del contenuto di OS nel latte di donne sottoalimentate (Jensen, 1995). Benché siano in corso ulteriori approfondimenti, questo studio ha messo in luce una influenza del genotipo e della sottoalimentazione sul contenuto di uno specifico Sialyl-OS nel latte di capra.

Tabella 1 - Effetto del genotipo al locus della CSN1S1 e della dieta sul contenuto di oligosaccaridi nel latte di capra (mg/l).

	Sialyloligosaccaridi		
	3-SL	6-SL	DSL
Genotipo (G)			
AA	90,21[a]	17,64	88,88
FF	57,45[b]	13,35	90,34
ESM	0,13	5,84	15,09
Dieta (D)			
M	79,27[a]	19,21	99,26
L	32,93[b]	8,59	79,30
ESM	0,15	7,25	18,39
Significatività			
G	*	ns	ns
D	*	ns	ns
GxD	&	ns	ns

ESM: errore standard della media; ns = non significativo; * P<0,05; & P= 0,10.

Ringraziamenti - *Finanziamento MIUR prot. 2007B4JBWN_003.*

Effect of genotype at CSN1S1 locus and diet on some oligosaccharides in goat milk

Key words: oligosaccharides, CSN1S1 genotype, diet, milk.

Bibliografia

Bode L., & Jantscher-Krenn, E. (2012), Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. Advances in Nutrition: An International Review Journal, 3(3): 383S-391S.

Chanat E., Marint P., Ollivier-Bousquet M. (1999), CSN1S1 is required for the efficient transport of β- and k-casein from the endoplasmatic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. Journal of Cell Science 112: 3399-3412.

Claps S., Di Napoli M. A., Sepe, L., Caputo A. R., Rufrano, D., Di Trana A., Annicchiarico G., Fedele V. (2013), Sialyloligosaccharides content in colostrum and milk of two goat breeds. Small Rum. Res. http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.024.

Jensen R.B. (1995), Handbook of milk composition. Academic Press.

Meyrand M., Dallas D.C., Caillat H., Bouvierd F., Martine P., Barile D. (2013), Comparison of milk oligosaccharides between goats with and without the genetic ability to synthesize αs1-casein. Small Rum. Res. 113 (2-3): 411-420.

Ollier S., Chauvet S., Martin P., Chilliard Y., Leroux C. (2008), Goat's αs1-casein polymorphism affects gene expression profile of lactating mammary gland. Animal 2 (4): 473-566.

Ollier S., Robert-Granie C., Bernard L., Chilliard Y., Leroux C. (2007), Mammary transcriptome analysis of food-deprived lactating goats highlights genes involved in milk secretion and programmed cell death. Journal of Nutrition 137: 560-567.

Pagano R.I., Pennisi P., Valenti B., Lanza M., Di Trana A., Di Gregorio P., De Angelis A., Avondo M. (2010), Effect of CSN1S1 genotype and its interaction with diet energy level on milk production and quality in Girgentana goats fed ad libitum. J. Dairy Res. 77: 245-251.

Viverge D., Grimmonprez L., Solere M., (1997), Chemical characterization of sialyl oligosaccharides isolated from goat (Capra hircus) milk. Biochem. Biophys. Acta: Gen. Sub. 1336: 157-164.

Effetti genetici dell'αs1-caseina caprina sulla resa casearia

S. FRATTINI[1], B. COIZET[1], L. NICOLOSO[1], L. RAPETTI[2], S.CHESSA[3], A. TALENTI[1], G. PAGNACCO[1], P. CREPALDI[1]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano,20122 Milano, Italia
[2] Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, 20122 Milano, Italia
[3] Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, Consiglio Nazionale delle Ricerche UOS di Lodi, 26900 Lodi, Italia

Parole chiave: capra, gene α_{s1}-caseina, resa in formaggio.

INTRODUZIONE - Diversi studi hanno dimostrato l'associazione tra i polimorfismi dell'α_{s1}-caseina e i caratteri quali-quantitativi del latte. Ad oggi, sono state identificate almeno 23 varianti al *locus* dell'α_{s1}-caseina (*CSN1S1*). Considerando il contenuto nel latte di α_{s1}-caseina, queste possono essere raggruppate in 4 classi: "alleli forti" (A, A', A2, A3, B1, B2, B3, B4, B', C, H, L, ed M); "alleli intermedi" (D1,E ed I); "alleli deboli" (D,F e G) ed "alleli nulli" (01, 02, 04 e N) (Martin et al., 1999; Caroli et al. 2007; Garro et al., 2012; Mestawet et al., 2013; Selvaggi et al., 2014). Negli ultimi anni la selezione genetica ha aumentato la frequenza degli alleli associati a migliori rese in formaggio, in particolar modo nelle razze Saanen e Camosciata delle Alpi. Le recenti indicazioni selettive per i becchi destinati all'inseminazione strumentale, premiano allo stesso modo soggetti con genotipo omozigote o eterozigote per gli alleli forti e intermedi. Questo non tiene conto del fatto che agli alleli forti sono associate migliori rese casearie, dovute a micelle caseiniche più piccole (Martin et al. 1999). Con l'intento di analizzare le recenti indicazioni selettive nella capre da latte, abbiamo valutato l'effetto di sostituzione allelica (α) e l'effetto di dominanza (d) degli alleli e dei genotipi *CSN1S1* più rappresentati sulla resa teorica stimata di formaggio fresco.

MATERIALI E METODI - La ricerca è stata condotta su 214 capre di razza Camosciata delle Alpi e 101 di razza Saanen, allevate intensivamente in 8 aziende in Lombardia. Per le 315 capre analizzate erano disponibili i seguenti dati di produzione: grasso (%, GRA) e contenuto di proteina grezza (%, PRO). I dati dei 2207 controlli funzionali sono stati forniti dall'Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (ARAL). Le rese in formaggio fresco teoriche (RF1 e RF2) sono state stimate partendo dall'equazione proposta da Zeng et al. (2007) e da quella usata dalle associazioni regionali degli allevatori (comunicazione personale, 2014):

$$RF1 = 5{,}72 \times GRA + 0{,}29 \times TP + 0{,}76$$
$$RF2 = 0{,}9 \times GRA + 3{,}8 \times PRO + 1{,}47$$

dove RF = resa in formaggio (resa in formaggio kg/ 100 L di latte); GRA = grasso %, TP = proteine totali %, PRO = proteine %.

Il seguente modello ANOVA è stato utilizzato sulle rese casearie stimate:

$$y_{ijkl} = m + CSN1S1_i + Razza_j + Allevamento_k(Razza_j) + Capra_l + e_{ijkl}$$

dove y_{ijkl} = variabile RF1 e RF2; m = media; $CSN1S1_i$ = effetto fisso dell'i-esimo genotipo (i=1,..10); $Razza_j$ = effetto fisso per la j-esima razza (Saanen, Camosciata); $Allevamento_k(Razza_j)$ = j-esima razza nidificata nel k-esimo allevamento; $Capra_l$ = effetto casuale della l-esima capra; e_{ijkl} = effetto residuo. Su un campione ridotto (1915 controlli su 277 capre) che considera gli alleli più rappresentati nel maggior numero di allevamenti, si è analizzato l'effetto di sostituzione allelica α e di dominanza d, sostituendo nel modello l'effetto *CSN1S1* con una covariata per gli alleli (A,E ed F) e peri genotipi (AF, AE ed EF) in accordo con quanto riportato da Dagnachew et al. (2011). Le analisi statistiche sono state realizzate mediante il software JMP del SAS Institute (JMP 9.0.2, 2010).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Entrambe le rese teoriche stimate sono risultate significativamente influenzate da razza, allevamento e genotipo, con valori compresi fra P<0,001 e P<0,01. La resa in formaggio secondo Zeng (RF1) è risultata più alta per il genotipo AA (21,83 ± 0,26 kg di formaggio/100 L di latte) e significativamente diversa rispetto ai genotipi FF e BF (P<0,05 al Tukey's HSD test). Per la resa casearia RF2 il genotipo AA (18,46 ± 0,14 kg di formaggio/100 L di latte) ha mostrato valori significativamente più elevati rispetto ad AF, EF, EE, AE, FF e BF. L'effetto di sostituzione allelica (α) è risultato significativamente maggiore (P<0,001) per l'allele A con entrambe le rese casearie, con valori rispettivamente pari a 0,75 e 0,66 kg di formaggio/100 L di latte. L'effetto di sostituzione allelica dell'allele E è invece risultato pari a -0.11 e -0.35 kg, rispettivamente per RF1 e RF2. L'effetto più penalizzante si è osservato per l'allele F (-1,13 e -0,82 kg di formaggio/100 L di latte). I genotipi AF ed AE hanno mostrato un effetto di dominanza significativamente negativo (-1,03 kg e -0,78 kg di formaggio/100 L di latte) su RF1, mentre solo per il genotipo AF si è osservato un effetto d negativo altamente significativo su RF2 (Tab.1). I risultati confermano quindi differenze significative degli alleli *CSN1S1* sulle rese teoriche stimate. Le migliori produzioni risultano associate in particolar modo all'allele A rispetto all'allele F ma anche rispetto all'allele E. Va inoltre sottolineato come i genotipi EE ed AE determinino una resa in formaggio penalizzante quando la proteina % è il fattore chiave della stima. Questi dati suggeriscono che le indicazioni selettive dei becchi destinati alla inseminazione strumentale, che assegnano lo stesso valore a becchi omozigoti per alleli forti (AA) ed intermedi (EE) e per gli eterozigoti (AE), sono da utilizzare con attenzione soprattutto negli allevamenti che hanno curato da tempo gli aspetti produttivi e selettivi.

Tabella 1 - Effetto di sostituzione allelica (α) ed effetto di dominanza (d) (media ± ES) sulla resa teorica di formaggio (RF1, RF2).

		RF1, kg/100L latte		RF2, kg/100L latte	
		Effetto	P	Effetto	P
α	A	0,75 ± 0,19	<0,001	0,66 ± 0,1	<0,001
	E	-0,11 ± 0,22	N.S.	-0,35 ± 0,12	<0,01
	F	-1,13 ± 0,29	<0,001	-0,82 ± 0,15	<0,001
d	AF	-1,03 ± 0,46	<0,05	-1,02 ± 0,24	<0,001
	AE	-0,78 ± 0,33	<0,05	-0,34 ± 0,18	N.S.
	EF	-0,50 ± 0,71	N.S.	-0,59 ± 0,30	N.S.

Ringraziamenti - *Gli autori ringraziano ARAL per I dati forniti.*

Genetic effects of goat α_{s1}-casein on cheese yield

Key words: goat, α_{s1}-casein gene, cheese yield.

Bibliografia

Caroli A., Chiatti F., Chessa S. et al. (2007), J. Dairy Sci. 90:2989-2996.
Dagnachew, B.S., Thaller, G., Lien, S. et al. (2011), Gen. Sel. Evol. 43: 1-31.
Garro G., Ferranti P., De Pascale S., Nicolai M.A., Mauriello R., Quarto M., Pilla F., Chianese L. (2012), The occurrence of genetic polymorphism and related non-allelic proteins increases the compositional complexity of goat αs1-CN. Electrophoresis 33(15): 2337-2344.
Martin P., Ollivier-Bousquet M., Grosclaude F. (1999), Int. Dairy J. 9: 163-171.
Mestawet T.A., Girma A., Adnøy T., Devold T.G., Vegarud G.E. (2013), Newly identified mutations at the CSN1S1 gene in Ethiopian goats affect casein content and coagulation properties of their milk. J. Dairy Sci. 96(8): 4857-4869.
Selvaggi M., Laudadio V., Dario C., Tufarelli V. (2014), Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. Mol. Biol. Rep. 41: 1035-1048.
Zeng S. S., Soryal K., Fekadu B. et al.(2007), Small Rumin. Res. 69:180-186.

Diagnosi microscopica e caratterizzazione genetica di *Parapoxvirus* rilevati in focolai di Ectima contagioso in Italia meridionale (Puglia e Basilicata): risultati preliminari

D. GALANTE, G. MANCINI, D. RAELE, N. CAVALIERE, D. CHIOCCO, M.A. CAFIERO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata - S.S. Diagnostica Virologica e Entomologia Sanitaria (S.C. Virologia)

Parole chiave: *Parapoxvirus*, microscopia elettronica, gene 045, analisi filogenetica.

INTRODUZIONE - I *Parapoxvirus* (Poxviridae), noti anche come ORF Virus, sono DNA virus a spiccato epiteliotropismo che colpiscono ruminanti domestici e selvatici. Tra questi, il *Parapoxvirus ovis* (PPVO) è responsabile di una malattia infettiva e contagiosa degli ovi-caprini, nota come Ectima contagioso. Tale patologia risulta caratterizzata dalla comparsa di papule, vescicole e croste esuberanti a livello di labbra, narici, occhi, mammella e parte distale degli arti. Le lesioni muco-cutanee si risolvono, di norma, spontaneamente nel giro di 1-2 mesi (McKeever *et al.*, 1998), ma nelle forme più severe è possibile osservare infezioni batteriche secondarie, febbre alta e mortalità con impatto economico anche elevato. Il virus può colpire anche l'uomo, determinando la comparsa di noduli dolorosi per lo più su mani e braccia ma raramente anche sul viso (Fenner, 1996). Ne sono maggiormente colpiti gli individui a stretto contatto con gli animali infetti (allevatori, tosatori, mungitori, veterinari) e, per tale motivo, la patologia rappresenta una zoonosi occupazionale. Con questo lavoro si è inteso studiare le relazioni genetiche esistenti tra i *Parapoxvirus* circolanti in Italia meridionale.

MATERIALI E METODI - Nel periodo 2011-2014 sono stati conferiti all'IZSPB 23 campioni clinici (croste cutanee) da altrettanti ovini. I campioni erano stati prelevati in 12 sospetti focolai di Ectima contagioso in allevamenti di differenti province della Puglia e della Basilicata.
La diagnosi di *Parapoxvirus* è stata effettuata su base morfologica attraverso microscopia elettronica (TEM Philips 208S) previa preparazione dei campioni con la metodica della goccia e colorazione negativa. Successivamente, il DNA virale è stato estratto dai campioni e amplificato mediante PRC specifica per una porzione del gene 045 ORF, che codifica per il fattore di trascrizione VLTF-1, utilizzando la coppia di primers 045F 5'-CCTACTTCTCGGAGTTCAGC-3' e 045R 5'-GCAGCACTTCTCCTCGTAG-3' (Kottaridi *et al.,* 2006). Tutti i prodotti di PCR sono stati analizzati su gel di agarosio, purificati usando Kit di commercio e sequenziati con il primer forward (045F) dalla ditta Eurofins (Edsberg, Germany). Il programma di comparazione di sequenze BLAST (http//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) è stato usato per trovare sequenze omologhe nelle banche dati presenti in internet (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank). Si è poi proceduto all'allineamento delle sequenze per l'analisi filogenetica utilizzando il software Phylogeny.fr. (www.phylogeny.fr).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Lo studio al TEM ha permesso di rilevare in tutti i 23 campioni (23/23) (100%), particelle virali tipiche riferibili al genere *Parapoxvirus* (Fig. 1). Le analisi molecolari hanno confermato la presenza di DNA di ORF virus su tutti i campioni analizzati e permesso di ottenere un amplicone di 392 paia basi. L'analisi delle sequenze ha evidenziato che i *Parapoxvirus* rilevati in 20 campioni (20/23) da 9 allevamenti (9/12), risultavano identici tra loro, mentre i rimanenti 3 (3/23) campioni, tutti provenienti da aziende diverse, mostravano modeste differenze nucleotidiche (Fig. 2). Esse consistevano in 3 e 4 siti variabili, rispettivamente nei 2 campioni lucani (10278PZ e 10279PZ) e nel campione pugliese (3472FG). Il BLAST nucleotidico, inoltre, ha evidenziato che i 20 *Parapoxvirus* con identica sequenza mostravano un'elevatissima omologia (99,43%) con il ceppo ORF B029 (KF837136.1) isolato in Germania in ovini (Friederich et al., 2014) mentre i rimanenti 3 apparivano più simili (99,14% i campioni lucani e 99,43% il campione pugliese) al genoma parziale dell'isolato Shiraze3, rinvenuto in ovi-caprini nell'omonima regione dell'Iran (KC534488.1) (Davari et al., 2013). L'indagine filogenetica improntata sul gene 045 ORF ha permesso di rilevare che i *Parapoxvirus* degli allevamenti esaminati risultano complessivamente abbastanza omogenei tra loro, sebbene sia stata evidenziata una leggera, ma pur significativa diversità. I dati a disposizione non permettono al momento valutazioni conclusive ma, tuttavia, è possibile ipotizzare l'introduzione di popolazioni di ORF virus da alcuni paesi terzi (es. Medio-Oriente), presumibilmente in seguito a scambi commerciali. Tale lavoro rappresenta un primo contributo alla conoscenza della epidemiologia dei *Parapoxvirus* nel nostro territorio; ulteriori regioni genomiche da questi e da altri campioni sono allo studio per una migliore comprensione dell'epidemiologia, della circolazione e della evoluzione dei *Parapoxvirus.*

Figura 1 - *Parapoxvirus* visualizzati al TEM in uno dei campioni analizzati.

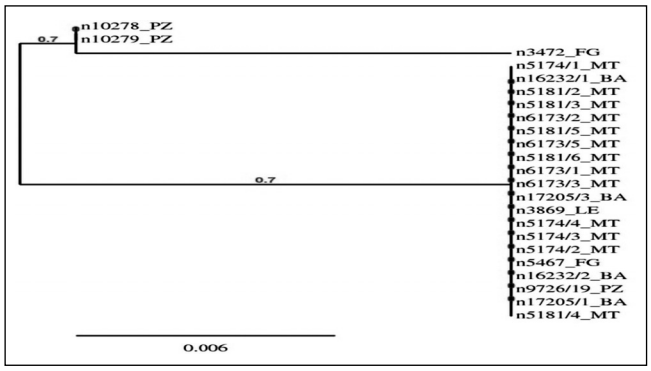


Figura 2 - Albero filogenetico delle sequenze parziali del gene 045 ORF dei 23 campioni analizzati.

Microscopic diagnosis and molecular characterization of parapoxviruses detected in outbreaks of contagious echtyma in Italy (Apulia and Basilicata regions): preliminary results

Key words: *Parapoxvirus,* electron microscopy, 045 ORF gene, phylogenetic analysis.

Bibliografia

Davari S.A., Sayyari M., Mohammadi A., 2013. Genetic analysis of the viral agents causing muzzle crust in small ruminant of Shiraz, Iran. Bulgarian Journ. of Vet. Med.16; 3, 159-169.

Fenner, F., 1996. Poxviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2673-2702.

Friederichs S., Krebs S., Blum H., Wolf E., Lang H., von Buttlar H., Buttner M., 2014. Comparative and retrospective molecular analysis of Parapoxvirus (PPV) isolates. Virus Res. 181, 11-21.

Kottaridi C., Nomikou K., Lelli R., Markoulatos P., Mangana O., 2006. Laboratory diagnosis of contagious ecthyma: Comparison of different PCR protocols with virus isolation in cell culture. Journ. of Virol. Meth., 134, 119-124.

McKeever D.J., Jenkinson D.M., Hutchinson G., Reid H.W., 1988. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. J. Comp. Pathol. 99, 317-328.

Nuove evidenze sulla diffusione di *Wohlfahrtia magnifica* negli ovini in Italia

A. GIANGASPERO[1], E. BRIANTI[2], D. TRAVERSA[3], M. MARANGI[1], F. BERTANI[4], M.J.R. HALL[5]

[1] Università di Foggia; [2] Università di Messina; [3] Università di Teramo;
[4] Libero professionista; [5] Natural History Museum, London, UK

Parole chiave: *Wohlfahrtia magnifica,* GIS, epidemiologia.

INTRODUZIONE - *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) è una mosca, agente di miasi obbligatoria, che infesta diverse specie di vertebrati, in particolare ovini, ed è responsabile di gravi danni alla salute e di significative perdite economiche. La wohlfahrtiosi è segnalata nei paesi del bacino del Mediterraneo e dell'Europa orientale con prevalenze fino al 90% (Hall e Farkas, 2000). In Italia, i dati su *W. magnifica* sono molto frammentari. Benché la presenza dell'insetto adulto sia stata documentata circa 20 anni fa (Ruiz-Martinez e Lecquercq, 1994), solo recentemente, casi di wohlfahrtiosi sono stati rilevati n allevamenti del Lazio e del Molise (Giangaspero *et al*., 2011) e della Sicilia (Gaglio *et al*., 2011).

Il presente lavoro ha l'obiettivo di fornire un contributo alla conoscenza dell'epidemiologia della wohlfahrtiosi in un'area di probabile recente colonizzazione da parte dell'insetto. In particolare, attraverso un'indagine retrospettiva e ispettiva diretta, lo studio ha inteso indagare sulla prevalenza, sui fattori di rischio, sulla distribuzione spaziale della parassitosi e, in maniera predittiva, sulla sua possibile espansione nel territorio italiano.

MATERIALI E METODI - L'indagine, condotta in Molise, ha coinvolto 46 comuni della provincia di Isernia, dove sono presenti 794 allevamenti ovini. Mediante un sistema di *Geographical Information Systems* (GIS), l'area di studio è stata preliminarmente suddivisa in 95 unità di campionamento di 3 km^2 e, sulla base di una prevalenza attesa del 10%, all'interno delle unità, sono stati selezionati *random* un totale di 138 allevamenti. Tra aprile e ottobre 2011, tutte le aziende selezionate sono state visitate; agli allevatori è stato sottoposto un questionario sulla storia della miasi cutanea nelle loro aziende, e, successivamente, gli ovini sono stati ispezionati per la presenza della miasi cutanea. Dai soggetti parassitati sono state raccolte larve a diverso stadio di sviluppo, immerse in alcool a 80% e trasferite presso il Laboratorio di Parassitologia dell'Università di Foggia, per l'identificazione. I dati raccolti mediante il questionario e l'ispezione diretta sono stati importati nel sistema GIS per la rappresentazione geografica e analizzati mediante un algoritmo di autocorrelazione spaziale LISA (GIS OpenGeoDa © (https://geodacenter.asu.edu/software/ downloads). Le relazioni tra wohlfahrtiosi, allevamenti e variabili ambientali sono state analizzate per la significatività statistica mediante il test di Fisher o il *t*-test. Tutti i test statistici sono stati eseguiti mediante software SPSS 13.0.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - In 14 (10,1%) dei 138 allevamenti oggetto di indagine, gli allevatori hanno dichiarato di aver rilevato casi di miasi traumatica a partire dal 2007 - con un tasso di infestazione compreso tra 0,7% (2007) e 8,7% (2010), di aver rilevato la presenza di larve sulla vagina, prepuzio, orecchio, unghielli, base delle corna e sulle ferite cutanee, e negli animali infestati, irrequietezza, prurito, anoressia, perdita di peso, riluttanza al movimento, ipermotilità della coda e ripetuti tentativi di cercare rifugio all'ombra.

Gli studi di correlazione spaziale condotti tra le 138 aziende oggetto di indagine hanno permesso di individuare la presenza di tre *cluster* di aggregazione spaziale situati in 8 comuni ($p < 0,05$). Gli allevamenti positivi erano localizzati in 11 (11,6%) delle 95 unità di campionamento e 158 allevamenti, risultati non infestati al momento dell'indagine, sono stati considerati ad elevato rischio di infestazione, a causa della loro vicinanza agli allevamenti positivi.

L'analisi statistica non ha dimostrato alcuna relazione tra presenza della miasi e altitudine del pascolo ($p = 0,223$) o dimensione del gregge ($p = 0,370$). I maschi sono, invece, risultati a maggiore rischio di infestazione rispetto alle femmine (RR = 4,2, $p < 0,0001$). Sulla base dei risultati ottenuti con il questionario, è stato dimostrato un aumento significativo ($\chi^2 = 15$, $p < 0,010$) del numero degli allevamenti positivi nel corso degli ultimi anni.

L'osservazione diretta ha consentito di rilevare la presenza di casi di wohlfahrtiosi nel 5,8% degli allevamenti esaminati con una prevalenza di infestazione tra gli animali compresa tra il 2,2% e il 14,3%, sovrapponibile, insieme alla sede di localizzazione delle larve e ai sintomi mostrati dagli animali, a quella ottenuta mediante l'analisi del questionario. Il numero massimo di larve presenti in una singola lesione è risultato pari a 60. Tutte le larve raccolte (n = 166), a diverso stadio di sviluppo, sono state identificate come *Wohlfahrtia magnifica.*

I risultati ottenuti, oltre a fornire una fotografia aggiornata della diffusione della miasi da *W. magnifica* in Italia meridionale, suggeriscono la recente colonizzazione dell'area da parte dell'insetto e la sua possibile espansione geografica. In Italia sono stati identificati due ceppi genetici di *W. magnifica*, di provenienza orientale e occidentale (Marangi *et al*., 2014), correlati con molta probabilità al commercio degli animali. L'introduzione negli anni '90 della Merinos, razza molto suscettibile a *W. magnifica,* può aver favorito il mantenimento e la diffusione della wohlfahrtiosi in Italia. Tuttavia, il rilievo della miasi in razze autoctone (Gentile di Puglia e incroci) suggerirebbe la natura ormai endemica della parassitosi. La diffusione di *W. magnifica*, il riconoscimento di aree a rischio nelle regioni dell'Italia meridionale e le più recenti acquisizioni sulla presenza di questo insetto anche in Puglia, impongono un monitoraggio costante della parassitosi e una conoscenza più approfondita dell'epidemiologia della wohlfahrtiosi, azioni, queste, indispensabili per promuovere lo sviluppo di adeguati programmi di controllo.

New evidences on the spreading of *Wohlfahrtia magnifica* in sheep in Italy

Key words: *Wohlfahrtia magnifica,* GIS, epidemiology.

Bibliografia

Hall M.J. e Farkas R. (2000), Traumatic myiasis of humans and animals. Contributions to a Manual of a Palaearctic Diptera (ed. By L. Papp & B. Darvas), pp. 751-768. Science Herald, Budapest.

Ruíz-Martínez R., Lecquercq, M. (1994), Data on distribution of screwworm fly *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner) in south-western Europe (Diptera: Sarcophagidae). Notes Fauniques de Gembloux, 28;53-60.

Giangaspero A., Traversa D., Trentini R., Scala A., Otranto, D. (2011), Traumatic myiasis by *Wohlfahrtia magnifica* in Italy. Veterinary Parasitology, 175: 109-112.

Gaglio G., Brianti E., Abbene S., Giannetto S. (2011), Genital myiasis by *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera, Sarcophagidae) in Sicily (Italy). Parasitology Research, 109; 1471-1474.

Marangi M., Ready P.D., Hall M.J.R., Gaglio G., Giangaspero A. (2014), Origine degli isolati di *Wohlfahrtia magnifica* in Italia. Atti Sipaoc, Foggia, 9-12 Settembre 2014.

Theileria sp. OT3 e altri agenti patogeni trasmessi da zecche negli ovini e nelle zecche in Italia: caratterizzazione molecolare e analisi filogenetica

A. GIANGASPERO[1], M. MARANGI[1], R. PAPINI[2], B. PAOLETTI[3], M. WIJNVELD[4], F. JONGEJAN[4]

[1] Università di Foggia; [2] Università di Pisa; [3] Università di Teramo; [4] Utrecht University, The Netherland

Parole chiave: *Theileria* sp. OT3, agenti patogeni trasmessi da zecche, ovini, zecche, RLB/PCR, sequenziamento

INTRODUZIONE - Le malattie trasmesse da zecche (MTZ) sono oggetto di crescente interesse da parte della comunità scientifica, anche in considerazione delle continue modificazioni climatiche e ambientali. Negli ultimi anni, negli ovini, si registra un aumento della MTZ, e nelle zone endemiche questi animali possono albergare più di un agente patogeno trasmesso da zecche. Le infezioni più diffuse sono l'anaplasmosi, la theileriosi e la babesiosi, responsabili di gravi danni alla salute dei piccoli ruminanti domestici e all'economia del comparto. In Italia, le indagini molecolari sugli agenti patogeni trasmessi da zecche negli ovini sono limitate alla Sicilia (de la Fuente *et al*., 2005; Torina *et al*., 2008; Torina *et al*., 2010).

Con l'obiettivo di ampliare le conoscenze epidemiologiche delle MTZ in Italia, il presente lavoro ha inteso:

a) valutare, mediante PCR/RLB e sequenziamento, la dinamica di infezione da *Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia, Babesia* e *Theileria* nelle pecore e nelle zecche raccolte sugli animali e sul pascolo;
b) comparare le sequenze ottenute con le sequenze disponibili in letteratura;
c) analizzare le relazioni filogenetiche degli isolati caratterizzati.

MATERIALI E METODI - L'indagine è stata condotta nel Parco Nazionale del Gran Sasso in Abruzzo (Italia). Nel 2010, da 100 pecore, apparentemente sane, presenti in un allevamento sperimentale di Castel del Monte (AQ) sono stati prelevati campioni di sangue, prima dell'inizio della stagione di pascolo (inizio giugno) e dopo la stagione di pascolo (fine agosto). I campioni di sangue in EDTA sono stati conservati a -20°C. In occasione di entrambi i prelievi di sangue, gli ovini sono stati ispezionati per la presenza di zecche e dagli animali positivi sono stati raccolti campioni di zecche. Tra la metà di luglio e la metà agosto, sono state effettuate catture di zecche sui pascoli utilizzati dagli stessi animali. Le zecche, conservate in etanolo al 70%, sono state identificate e conservate a -20°C.

Tutti i campioni di sangue e di zecche sono stati sottoposti all'estrazione del DNA e all'amplificazione in PCR-RLB per: *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all, *Theileria/Babesia* catch-all, *Rickettsia* catch all, *Anaplasma centrale, Anaplasma ovis, Anaplasma marginale, Anaplasma phagocytophilum Ehrlichia ovina*, *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia ovis, Babesia motasi, Theileria, lestoquardi, Theileria ovis, Theileria uilembergi.*

Gli amplificati dei campioni risultati positivi a *Ehrlichia/Anaplasma* e/o *Babesia/Theileria* catch-all e negativi alle specie elencate, sono stati sottoposti a purificazione e a reazione di sequenziamento utilizzando i BigDye Terminator kit e sequenziati con il sequenziatore ABI PRISM 3130. Tutte le sequenze ottenute sono state allineate tra di loro mediante il programma BioEdit e comparate con le sequenze di riferimento specifiche per le diverse specie disponibili in GenBank mediante il programma Clustal W (BioEdit software). Successivamente, su tutte le sequenze ottenute in questo studio e le sequenze di riferimento è stata eseguita l'analisi filogenetica mediante il programma Mega v.5.1 per rilevare possibili varianti delle specie studiate e/o nuove specie/ceppi.

I valori di prevalenza con i rispettivi intervalli di confidenza (IC 95%) sono stati determinati prima e dopo il pascolo e quindi confrontati con il test del chi-quadro. Differenze con $P<0,05$ e $P<0,01$ sono state considerate significative o altamente significative. Il calcolo dei valori di odd ratio con i corrispondenti IC 95% è stato utilizzato per la valutazione del rischio.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Prima del pascolo, il 56% degli animali è risultato positivo a: *Anaplasma ovis* (41%) o a *A. ovis* in associazione con *Theileria* sp. OT3 (14%). Dopo il pascolo, l'87% delle pecore sono risultate positive a *A. ovis* (41%), a *A. ovis* e *Theileria* sp. OT3 (8%) o a *A.ovis* in associazione con *Babesia motasi* (5%). Altri soggetti sono risultati positivi ad *Anaplasma phagocytophilum* (20%), *A. phagocytophilum* e *B. motasi* (7%) oppure *A.phagocytophilum* in associazione con *Theileria* sp. OT3 (5%) ($p<0.001$). Gli esemplari di zecche sono stati identificati come *Haemaphysalis punctata* (n: 89); il 35,5% albergava *A. ovis, Ehrlichia ovina* o *A. ovis*/*A. phagocytophilum*.

Le sequenze nucleotidiche di *Theileria sp OT3*, *A.ovis* e *A. phagogitophylum* sono state depositate in GenBank con i rispettivi numeri di accesso: KF270715-KF270742, KF293699-KF293720 e KF293667-KF293698

L'analisi filogenetica degli isolati ha evidenziato, all'interno dei Paesi del Mediterraneo, la circolazione delle stesse varianti di *Theileria* sp. OT3 mentre, nella stessa area geografica, la presenza di due possibili rotte di *A. ovis* e *A. phagocytophilum*.

In questo studio, il rilievo di *Theileria* sp. OT3 nelle pecore rappresenta la prima segnalazione in Italia, mentre si conferma, anche molecolarmente, la presenza nel nostro paese di *B. motasi*. Di interesse appare l'isolamento nelle pecore e nelle zecche di *E. ovina*, ora inclusa nel 'gruppo *Ehrlichia canis*', il cui ruolo patogeno, analogamente a *Theileria* sp. OT3, non è noto. Infine, l'isolamento di *A. phagocytophilum* nelle pecore e nelle zecche, oltre a rappresentare un potenziale rischio per la salute pubblica, pone interrogativi interessanti relativi al ruolo epidemiologico di *H. punctata* nella diffusione e mantenimento di questo agente patogeno, nell'area indagata.

Theileria sp. OT3 and other tick-borne pathogens in sheep and ticks in Italy: molecular characterization and phylogeny

Key words: *Theileria* sp. OT3, Tick-borne pathogens, sheep, ticks, RLB/PCR, sequencing.

Bibliografia

de la Fuente, J., Torina, A., Caracappa, S., Tumino, G., Furlá, R., Almazán, C., Kocan, K.M. (2005), Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. Vet. Parasitol. 133, 357-362.

Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Estrada-Peña, A., Vicente, J., Scimeca, S., Marino, A.M.F., Salina, F., Caracappa, S., de la Fuente, J. (2008), Prevalence and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a Mediterranean ecosystem. Appl. Env. Microbiol. 74, 7578-7584.

Torina, A., Galindo, R.C, Vicente, J., Di Marco, V., Russo, M., Aronica, V., Fiasconaro, M., Scimeca, S., Alongi, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortazar, C., de la Fuente. J. (2010), Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition Trop Anim Health Prod. 42:1327-1331.

Performance produttive di agnelli Gentile di Puglia alimentati con diete contenenti sottoprodotti dell'industria molitoria del grano duro

F. GIANNICO, M.A. COLONNA, M. RAGNI, P. CAGNETTA, A.M. RUSSO, A. CAPUTI JAMBRENGHI

Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

Parole chiave: performance, agnelli Gentile di Puglia, grano duro, sottoprodotti.

INTRODUZIONE - La coltivazione del grano duro ha una notevole importanza in termini quanti-qualitativi nell'ambito della cerealicoltura meridionale. Tra i sottoprodotti che derivano dall'industria molitoria, crusca, cruschello e farinetta sono validi ingredienti per l'alimentazione dei ruminanti (Tufarelli et al., 2011), sia in termini di composizione chimica, sia per i benefici derivanti dalla riduzione dei costi alimentari e dalla valorizzazione delle risorse locali (Hartwell et al., 2010). In particolare, crusca e cruschello presentano un contenuto simile di proteine (14,8; 15,4%), grassi (3,5; 5,2%) e fibra (14; 12,7%) grezzi, rispettivamente. La farinetta, invece, per il buon contenuto in amido (55%) e scarso contenuto in fibra (0,7%), può essere impiegata come ingrediente di base per il suo valore energetico. La presente ricerca, svolta nell'ambito del Progetto PON ISCOCEM "Sviluppo tecnologico e innovazione per la sostenibilità e competitività della cerealicoltura meridionale" (PON01_01145/8), ha avuto come obiettivo quello di valutare l'effetto di razioni contenenti farinetta, in associazione con crusca o cruschello, sulle performance produttive in agnelli autoctoni in rapporto a due età di macellazione: 75 e 90 giorni.

MATERIALI E METODI - La prova è stata condotta presso la Masseria Salecchia sita in agro di Bovino (FG) durante il periodo gennaio-febbraio 2014 su 30 agnelli maschi di razza Gentile di Puglia nati da parto singolo. Gli agnelli, a circa 42 giorni di età, sono stati svezzati per una settimana con un mangime commerciale di svezzamento e successivamente suddivisi in 3 gruppi, omogenei per età e peso, alimentati *ad libitum* con i mangimi la cui composizione analitica e chimica è riportata in Tabella 1. Sono stati costituiti, inoltre, due sotto gruppi macellati rispettivamente a 75 e 90 giorni. Settimanalmente sono stati rilevati i pesi degli agnelli ed i consumi di gruppo di alimento al fine di valutare gli accrescimenti e l'indice di conversione alimentare (ICA). I dati sono stati analizzati mediante la procedura GLM del SAS considerando dieta ed età di macellazione quali effetti principali (3x2) e le interazioni tra essi. Le medie sono state confrontate con il test *t* di Student.

Tabella 1 - Composizione analitica e chimica dei mangimi sperimentali.

Ingredienti (%)	Controllo	Crusca	Cruschello
Medica disidratata	25	25	25
Mais	25	25	25
Orzo	10	10	10
Soia FE (44%)	15	15	15
Polpa di barbabietole essicc.	10	0	0
Lievito di birra	2	2	2
Integratore vit. e min.	1,5	1,5	1,5
Olio di soia	1,5	1,5	1,5
Farinetta	10	10	10
Crusca	0	10	0
Cruschello	0	0	10
Sostanza secca (SS) (%)	87,8	88,1	88,4
Proteine grezze (% SS)	19,36	19,86	19,79
Grassi grezzi (% SS)	4,44	4,76	4,78
Fibra grezza (% SS)	11,39	10,33	9,95
Ceneri (% SS)	9,68	9,42	9,27

Tabella 2 - Perfomance degli agnelli macellati a 75 e 90 giorni.

Parametri	Controllo		Crusca		Cruschello		DSE GL=24
	75 d	90 d	75 d	90 d	75 d	90 d	
Peso iniziale (kg)	20,45	20,45	20,92	20,92	21,00	21,00	0,42
Peso finale (kg)	25,90	28,20	26,56	27,95	26,54	29,05	0,55
Incremento medio giornaliero (kg/d)	0,166	0,161	0,170	0,146	0,168	0,167	0,008
Consumo alimentare (kg/d)	1,02	1,12	1,05	1,15	1,05	1,14	0,01
ICA (g/g)	6,14	6,95	6,17	7,87	6,25	6,82	0,18
Peso vivo stallato (kg)	24,84	27,06	25,73	27,02	25,30	28,12	0,52
Peso carcassa a caldo (kg)	12,75	12,54	13,75	12,28	12,69	12,92	0,48
Peso carcassa a freddo (kg)	12,56	12,38	13,52	12,10	12,52	12,84	0,25
Resa netta (%)	54,0^{a}	50,0^{b}	56,6^{a}	49,1^{b}	53,3^{a}	49,5^{b}	1,28
Calo di refrigerazione (%)	1,49	1,27	1,53	1,46	1,34	1,02	0,08

a *vs* b: P<0,05.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I risultati relativi alle prestazioni produttive *in vitam* e *post mortem* sono riportati in Tabella 2. Relativamente alle prestazioni *in vitam*, non sono emerse differenze significative tra le diete a confronto per nessuno dei parametri studiati, dimostrando che l'integrazione con crusca o cruschello non condiziona sfavorevolmente le performance degli agnelli. Tali risultati confermano quanto osservato anche da Tufarelli et al. (2011) in agnelli di razza Comisana.

Per quanto attiene ai rilievi *post mortem*, la macellazione a 90 giorni ha determinato una diminuzione significativa (P<0,05) della resa netta in tutti i gruppi sperimentali. Ciò potrebbe essere ascritto ad una maggiore incidenza di apparato gastro-enterico, testa, corata, vello e corna, ossia delle componenti definite "non carcass" da Peña et al. (2005), che hanno osservato un aumento di dette componenti in funzione dell'età e del peso vivo alla macellazione. In questa prova, pertanto, il posticipo della macellazione di due settimane ha portato ad una riduzione della resa netta in carne.

Feeding durum wheat by-products in gentile di Puglia lambs: effects on growth performances

Key words: performances, Gentile di Puglia lambs, durum wheat, by-products.

Bibliografia

Hartwell B.W., Iñiguez L., Knaus W.F., Madsen J. (2010), Awassi lamb growth responses and carcass traits, and economic benefits associated with reduced-cost diets made from locally available feed resources. Small Rum. Res., 93: 48-52.

Peña F., Cano T., Domenech V., Alcade M.J., Martos J., Garcia-Martinez A., Herrera M., Rodero E. (2005), Influence of sex, slaughter weight and carcass weight on "non carcass" and carcass quality in Segureña lambs. Small Rum. Res., 60: 247-254.

Tufarelli V., Khanb R.U., Laudadio V. (2011), Feeding of wheat middlings in lamb total mixed rations: effects on growth performance and carcass traits. Anim. Feed Sci. Tech., 170: 130-135.

Valutazione degli indicatori di benessere in un gregge di ovini di razza Massese

M. GOBBI[1], G. FILIPPINI[1], E. SCOCCIA[1], M. TENTELLINI[1], S. BOTO[1], A. ANTOLINI[1], M. CUGUSI[2], C. MARESCA[1], L. MOSCATI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche; [2] Medico Veterinario libero professionista

Parole chiave: benessere, immunità innata, Visna/Maedi.

INTRODUZIONE - I parametri di immunità innata o acquisita si sono dimostrati essere, per diverse specie di animali da reddito, un utile strumento prognostico e di sostegno alla diagnosi, oltre a costituire un valido indicatore di benessere zootecnico. Ad oggi, pochi studi in tal senso sono stati fatti per quanto riguarda il settore ovi-caprino. Si rendono quindi opportuni lavori *ad hoc* per arrivare a delineare uno schema di monitoraggio affidabile e utilizzabile come strumento di valutazione oggettivo dello stato sanitario e di benessere del bestiame per l'applicazione delle misure di sviluppo rurale. In quest'ambito si è scelto come obiettivo quello di individuare parametri ematici che possano fungere da indicatori dell'effettivo stato di benessere sanitario in un gregge di ovini di razza Massese e la loro utilizzabilità nella pratica zootecnica nazionale.

MATERIALI E METODI - Per il progetto ci si è concentrati su un gregge di 318 animali di razza Massese. Nella fase iniziale del lavoro si è proceduto a compilare una scheda clinica al momento della visita atta a valutare nel singolo animale, sulla base dell'esame obiettivo generale e per singolo apparato le seguenti variabili:

- Mastopatie cliniche e subcliniche, rilievo del numero di cellule somatiche (SCC). Il prelievo di latte è stato effettuato durante la mungitura routinaria degli animali;
- Patologie del piede evidenziate clinicamente;
- Forme patologiche a carico dell'apparato respiratorio;
- Grado di infestione parassitaria individuale. L'esame coprologico quali-quantitativo è stato effettuato tramite tecnica Flotac® Dual Tecnique;

Per ciascuna variabile sono stati definiti i cut-off in maniera tale da definire lo stato fisiopatologico del singolo animale (malato/sano).

È stato inoltre effettuato un prelievo ematico dalla vena giugulare per la valutazione sierologica della presenza all'interno del gregge di anticorpi contro il virus del complesso Visna/Maedi (MVV) tramite Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e per la determinazione dei parametri ematici di immunità aspecifica. I parametri scelti per la valutazione sono stati i seguenti:

- Il lisozima sierico, la cui titolazione permette di conoscere lo stato di funzionalità del sistema monocitario macrofagico ed è indice di presenza di stati flogistici.
- L'attività battericidica del siero, che consente di valutare la capacità del siero di inibire la crescita batterica.
- La titolazione del complemento, la cui prova si effettua per valutare la competenza immunitaria dell'ospite nei confronti dei patogeni ambientali.

Inoltre in questo studio si è cercato di valutare le variazioni dell'aptoglobina (Hb). La concentrazione di questa proteina di fase acuta nel siero è proporzionale alla gravità della patologia in atto e quindi la sua quantificazione fornisce un utile strumento per l'individuazione, la prognosi e il monitoraggio della malattia.

I dati sono stati analizzati con Stata 11.2 (StataCorp, College Station, TX USA) per valutare eventuali associazioni tra le variabili ed i valori degli indicatori di benessere tramite analisi bivariata. Sono stati calcolati gli OR ed i relativi Intervalli di Confidenza (I.C. 95%) al 95%; sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p \leq 0,05$.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Gli animali con problemi di mastopatia sono stati 206 su un totale di 250. Nessun animale ha presentato lesioni podali. Gli animali che presentavano difficoltà respiratorie sono risultati essere 33 su un totale di 313. Solo 5 (2%) hanno evidenziato un alto grado di infestazione parassitaria mentre 247 (98%) un basso grado. Gli animali sierologicamente positivi al MVV sono stati 193 (64%) e 109 (36%) sono risultati sieronegativi.

La significatività dei dati ottenuti è stata analizzata valutando singolarmente la presenza o no di una patologia riscontrata all'esame clinico e/o di laboratorio. Non è stata trovata alcuna associazione significativa per quel che riguarda i valori alterati di battericida, lisozima e complemento e animali con mastopatia, sintomatologia respiratoria e alto grado di infestazione parassitaria; per quanto riguarda gli animali sierologicamente positivi agli anticorpi del MVV, essi risultati statisticamente associati alla sintomatologia respiratoria (OR=6,25; IC95% 1,81-21,56) con un valore di p pari a 0,0009. La positività al MVV è stata inoltre associata allo stato patologico riscontrato e valutata rispetto ai parametri di immunità innata. In questo caso non è stata rilevata variazione statisticamente significativa in relazione alla *status* considerato.

Per quanto riguarda l'aptoglobina (Hb), si è tentato di definire dei *range*, non esistenti per gli ovini, associando il valore rilevato allo stato sanitario del singolo animale. Tuttavia non sono state riscontrate differenze significative tali da poter giustificare la definizione di range di normalità.

L'allevamento oggetto dello studio ha mostrato un buon grado di management aziendale, come è possibile desumere da alcuni parametri evidenziati, come il basso grado di infestazione parassitaria, la scarsa incidenza di patologie respiratorie, o l'assenza di lesioni podali. In questo caso i risultati ottenuti mostrano che alcuni parametri ematici possono non mostrare differenze tra animali sani ed animali malati per le principali patologie tipiche dell'allevamento ovino, mentre una loro variazione può spingere il veterinario ad approfondire infezioni croniche meno evidenti e perciò più insidiose quali la sindrome Visna/Maedi. In futuro potrebbe essere interessante valutare lo stesso set di parametri per altre razze lattifere o razze a diversa attitudine. Non ultimo potrebbe essere interessante valutare la relazione tra immunità innata, stato sanitario e quantità/qualità delle produzioni.

Assessment of welfare indicators in a Massese's sheep flock

Key words: welfare, innate immunity, Visna/Maedi.

Bibliografia

Barta O. (1993), In: Barta O., (ed.) Vet. Cl. Imm. Lab., Bar-Lab, Blacksburg, USA. SAS Institute Inc. (2001), version 8.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli MP., Utzinger J. (2010), FLOTAC: new multivalent tecniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. Nat Prot.

Dorn W. et al. (1980), Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin 34: 635-50.

Giammarioli M., Rutili D., Farneti S., De Giuseppe A., Vitelli F., Rosati S., Marini C., Perugini G., Feliziani F. (2006), Validazione di un test ELISA per la diagnosi sierologia di Lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV), VIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Perugia, Volume degli atti pp. 191.

Osserman E.F., Lawlor D.P. (1966), J. Exp. Med. 124: 921-52. oc, 5: 503-15, 2010.

Pepin M., Vitu C., Russo P., Mornex Jf., Peterhans E. (1998), Maedi-Visna virus infection in sheep: a review. J. Vet. Res. 29: 341-36.

Quaye IK. (2008), Haptoglobin, inflammation and disease. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 102: 735-742.

Improvement of reproductive efficiency in sohagi ewes using different hormones

H. HAMDON[1] AND D.R. DERAR[2]

[1] Animal production Department, Faculty of Agriculture, Assuit University, New Valley, El Karga, New Valley, Egypt
[2] Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Assiut, Egypt

The objective of this study was to compare the effects of GnRH, prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) and oxytocin treatments at the time of natural mating on the conception rate (CR) of non lactating pluriparous ewes, where estrus was detected by visually. All ewes (n = 56) were served naturally by fertile rams every 12 hours after the beginning of estrus. After natural mating, ewes were alternately assigned to four treatment groups treated as: (G1) PGF (n = 12); (G2) GnRH (n = 12); (G3) oxytocin (n = 12) and (G4) control (n= 20).
Pregnancy diagnosis was performed 25 days post-insemination by transrectal ultrasonography.
Pregnancy rate was higher ($P<0.05$) for all the treatment groups (69.33%) compared with G4 (55.54%). Litter size did not differ between groups except for oxytocin group. Ewe lambs dominate male in this study and the sex ratio unexpectedly preferred them. Total antioxidants did not differ significantly between groups in the present study but they were at their lowest values during estrus in all the studied groups. It could be concluded that treatments with GnRH and PGF and oxytocin at the time of service could improve conception rate.

Key words: Sohagi, ewe, pregnancy, antioxidants, hormones.

Effetto della dose di energia nell'irraggiamento con He-Ne laser sulla qualità e carica energetica di spermatozoi crioconservati di ariete

N. IAFFALDANO[1], M. DI IORIO[1], G. PAVENTI[2], R. PIZZUTO[2], S. PASSARELLA[2], A. MANCHISI[1]

[1] Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università degli Studi del Molise
[2] Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute, Università degli Studi del Molise

Parole chiave: Ariete, Spermatozoi, Congelamento, He-Neon laser.

INTRODUZIONE - I moderni sistemi di conduzione degli allevamenti ovini richiedono l'acquisizione di efficaci tecnologie per il controllo dell'attività riproduttiva (Martemucci et al., 1994). L'inseminazione artificiale (IA) effettuata con seme congelato offre la possibilità di sfruttare nel modo più razionale gli arieti riproduttori estendendo il loro impiego nel tempo e nello spazio. Durante il processo di congelamento le variazioni sia di temperatura che osmotiche sono responsabili di danni strutturali e metabolici negli spermatozoi che si traducono in una diminuzione del loro potere fecondante con conseguente ridotta fertilità. Pertanto risulta importante lo sviluppo di procedure aventi lo scopo di migliorare la qualità del seme post-scongelamento del seme di ariete (Cirit et al., 2013). In precedenti ricerche è stato dimostrato nell'uomo che l'irraggiamento con laser He-Neon biostimolava la motilità degli spermatozoi (Karu, 2012). L'effetto positivo dell'irraggiamento con laser è stato anche riscontrato sia nel seme refrigerato di coniglio e di tacchino (Iaffaldano et al., 2005, 2010), sia nel seme congelato di alcune specie avicole (Iaffaldano et al., 2013a). In un preliminare studio, nell'ariete, dimostrammo un tendenziale miglioramento della qualità del seme post-scongelamento in seguito all'irraggiamento laser He-Ne alla dose di 6.12 J/cm^2 ma non a quella di 3,96 J/cm^2 (Iaffaldano et al., 2013b). Scopo di questo lavoro è stato quello di confermare l'efficacia della dose di 6,12 J/cm^2 e di valutare l'effetto di una maggiore dose di energia, 9 J/cm^2, sulla qualità e la carica energetica degli spermatozoi post congelamento di ariete.

MATERIALE E METODI - Il seme congelato di ariete di razza Merinizzata, fornito gentilmente dall'APA di Potenza, è stato scongelato a 37°C per 30". Sono stati usati 7 pools di seme scongelato, ogni pool è stato ottenuto miscelando 16 paillettes provenienti da 4 arieti. Ogni pool è stato diviso in tre aliquote una di controllo e due irraggiate con He-Ne laser (lunghezza d'onda 632,8 nm; 6mW) rispettivamente con le dosi di energia di 6,12 e 9 J/cm^2. La motilità totale e progressiva (valutazione soggettiva), la vitalità (SYBR-14, PI), l'integrità della membrana spermatica (HOS test), l'integrità acrosomiale (PSA-FITC) e del DNA (Acridine Orange), sono state valutate sia sul controllo che sul seme irraggiato. La carica energetica (CE), indice dello stato energetico della cellula spermatica, è stata misurata mediante HPLC (Iaffaldano et al., 2010). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza con procedura ANOVA e le differenze tra trattamenti sono state comparate tramite test di Duncan, la significatività è stata settata al 5% (P<0,05), (SPSS 14.0, Chicago, Ill).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI- I risultati ottenuti confermano l'efficacia della dose di energia di 6,12 J/cm^2 nel migliorare i parametri qualitativi, probabilmente attraverso l'aumento della carica energetica. Infatti, i valori di motilità, vitalità e carica energetica a 6,12 J/cm^2 risultavano significativamente incrementati rispetto al controllo. Inoltre, è stato osservato che una dose più alta, 9 J/cm^2, non migliorava né la carica energetica né la qualità del seme post-scongelamento rispetto al controllo, risultando addirittura significativamente peggiore per l'integrità del DNA (Tab. 1). Quindi, questo ci porta a confermare l'efficacia dell'irraggiamento laser He-Ne e a concludere che esiste un effetto dose-dipendente.

Ringraziamenti: il lavoro è stato finanziato dal progetto Marie Curie Actions (FP7-PEOPLE-2011-IRSES). Gli autori ringraziano l'APA di Potenza per averci fornito gentilmente il seme congelato.

Effect of energy dose of he-ne laser irradiation on the quality and energetic charge of cryopreserved ram spermatozoa

Key words: Ram, Sperm, Cryopreservation, He-Neon laser.

Bibliografia

Cirit, Ü., Bağiş, H., Demir, K., Agca, C., Pabuccuoğlu, S., Varişli, Ö., Clifford-Rathert, C., Agca, Y., (2013), Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. Anim Reprod Sci., 139: 38-44.

Iaffaldano, N., Meluzzi, A., Manchisi, A., Passarella, S., (2005), Improvement of stored turkey semen quality as a result of He-Ne laser irradiation. Anim. Reprod. Sci., 854: 317-325.

Iaffaldano, N., Rosato, MP., Paventi, G., Pizzuto, R., Gambacorta, M., Manchisi, A., Passarella, S., (2010), The irradiation of rabbit sperm cells with He-Ne laser prevents their in vitro liquid storage dependent damage. Anim. Reprod. Sci., 119: 123-129.

Iaffaldano, N., Paventi, G., Pizzuto, R., Passarella, S., Cerolini, S., Zaniboni, L., Marzoni, M., Castillo, A., Rosato, M.P., (2013a), The post-thaw irradiation of avian spermatozoa with He-Ne laser differently affects chicken, pheasant and turkey sperm quality. Anim. Reprod. Sci., 142: 168-172.

Iaffaldano N., Di Iorio M., Rocco M., Manchisi A., Rosato M.P., Paventi G., Pizzuto R., Passarella S., (2013b), He-Ne laser irradiation effects on cryopreserved ram semen. XX national congress ASPA Bologna (Italy), 11-13 June 2013.

Martemucci, G., Bramante, G., D'Alessandro, A., Gambacorta, M., Facciolongo, A.M., Iaffaldano, N., (1994), Valutazione della inseminazione intrauterina con seme congelato: effetto della dose sul tasso di concepimento. Risultati preliminari. In: Proc. of the VI Meeting on Studio dell'efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico. Bergamo, Italy, pp. 87-91.

Karu, T.I., (2012), Lasers in infertility treatment: Irradiation of oocytes and spermatozoa Photomed. Laser Surg., 30(5): 239-241.

Tabella 1 - Parametri qualitativi e carica energetica del seme scongelato di ariete irraggiato e non irraggiato. [a-b] P<0,05.

Trattamento	Motilità totale	Motilità progressiva	Vitalità	Integrità della membrana	Integrità dell'acrosoma	Integrità del DNA	Carica energetica*
controllo	48,78±1,30^b	40,71±1,15^b	47,77 ± 1,63^b	39,56 ± 1,57^{ab}	42,44 ± 1,99^{ab}	98,53 ± 0,15^a	100 ± 0^b
6.12 J/cm^2	57,28 ±1,76^a	48,71 ±1,55^a	52,65 ± 1,59^a	43,62 ± 1,79^a	45,20 ± 1,67^a	98,58 ± 0,10^a	123,86 ± 5,24^a
9 J/cm^2	51,60 ±1,02^b	42,78 ±1,16^b	45,58 ± 0,45^b	38,53 ± 0,69^b	40,05 ± 0,63^b	97,82 ± 0,27^b	107,14 ± 1,66^b

*I valori della carica energetica sono espressi come percentuale dei valori di controllo (settati al 100%).

Performance di accrescimento in capretti sottoposti ad una nuova tecnica di svezzamento

F. IANNACCONE[1], A. BALESTRIERI[1], R. CIMMINO[1,2], A. SALZANO[1], F. RUSSO[2], C. AMENDOLA[1], G. BIFULCO[1], G. CAMPANILE[1]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli studi di Napoli "Federico II" Napoli, Italia
[2] Dipartimento di Scienze e Tecnologie - Università degli Studi del Sannio, Benevento, Italia

Parole chiave: capretti, svezzamanto, latte.

INTRODUZIONE - Nell'allevamento caprino da latte, i capretti vengono in genere macellati subito dopo lo svezzamento, al raggiungimento del peso di macellazione. Ciò comporta che per almeno due mesi il latte prodotto è interamente destinato alla prole e non può essere commercializzato dall'allevatore a scopo alimentare o trasformato in derivati. La crescente richiesta di latte e prodotti lattiero-caseari caprini, pertanto, si scontra con le attuali tecniche di allevamento. Studi recenti effettuati in pecore di razza Comisana (Morittu et al., 2010) hanno dimostrato come la riduzione della quantità di latte somministrata agli agnelli in fase di accrescimento determini una riduzione dell'incremento ponderale giornaliero, ma risulti economicamente conveniente per la maggior quantità di latte a disposizione degli allevatori. Scopo del presente studio, quindi, è stato quello di valutare le performance di accrescimento in capretti meticci (Saanen x Cilentana) sottoposti ad una differente tecnica di svezzamento e di effettuare un analisi economica dei costi/benefici.

MATERIALI E METODI - La prova è stata condotta in un'azienda commerciale della Campania su 10 capretti meticci (Saanen x Cilentana). Subito dopo il parto, i soggetti sono stati mantenuti con le madri fino all'età di 14 giorni, quando sono stati suddivisi in due gruppi omogenei per peso ed età, nonché per produzione di latte della madre. Ai capretti del Gruppo A (n=5) è stato somministrato il latte prodotto dalla madre durante l'intera mungitura (1,8 l), mentre a quelli del gruppo B (n=5) una quantità pari alla metà del latte prodotto dalla madre (0,9 l), destinando il latte rimanente alla caseificazione. Ad inizio, metà e fine prova il latte è stato sottoposto ad analisi per valutarne le caratteristiche chimiche e giornalmente sono state valutate le produzioni delle madri. A partire dall'inizio della prova, i capretti avevano sempre a disposizione fieno di medica e mangime (24% proteine grezze, 7,7% grasso, cellulosa grezza 12% ceneri 8,3%; UFL= 1,03/kg) e giornalmente venivano pesati i residui di mangiatoia per valutare la capacità di ingestione. Gli animali sono stati pesati a 0, 14, 30, 40 e 60 giorni di età e per ciascun periodo sono stati valutati l'incremento ponderale giornaliero (IPG) e l'indice di conversione alimentare (ICA). Infine, è stata valutata la convenienza economica della tecnica attuata, valutando i costi per il maggior consumo di alimento solido ed il ricavo per la vendita di formaggio. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante l'analisi della varianza per misure ripetute.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Le analisi effettuate sul latte delle madri hanno evidenziato un contenuto medio in grasso del 3,2% e in proteine del 2,9%, con una resa al caseificio del 14%. La tecnica di svezzamento utilizzata ha ridotto l'accrescimento dei capretti soltanto negli ultimi 20 giorni ed in maniera non significativa (Fig. 1). I capretti del gruppo A hanno raggiunto a 60 giorni un peso leggermente maggiore rispetto a quelli del Gruppo B (11,2±0,5 vs. 9,7±0,5 nei Gruppi A e B, rispettivamente). Anche l'IPG medio è risultato simile tra i due gruppi, sia dalla nascita allo svezzamento (132±0,1 vs. 106±0,1 nei Gruppi A e B, rispettivamente) che a partire dai 14 giorni, quando ai capretti del Gruppo B è stata limitata l'assunzione di latte (132±0,1 vs. 96±0,1 nei Gruppi A e B, rispettivamente). L'ICA non ha mostrato differenze per tutta la durata del periodo sperimentale (3,6 vs. 3,26 nei Gruppi A e B, rispettivamente).

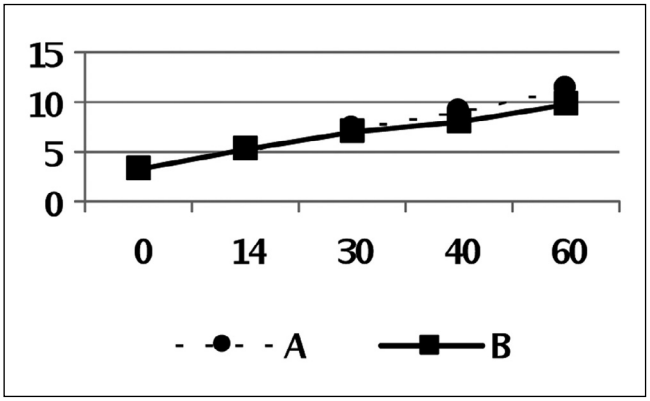


Figura 1 - Peso vivo dei capretti registrato durante l'intero periodo sperimentale.

Nel periodo sperimentale (14-60 giorni), ciascuna capra del gruppo B ha prodotto 0,9 l di latte in più rispetto a quelle del gruppo A, pari a circa 41 litri/capo. Considerando un prezzo medio del latte di 0,70 €, è possibile affermare che ciascuna capra ha consentito un introito economico di circa 29 €. Quest'ultimo dato risulta addirittura maggiore se il latte è destinato alla caseificazione, considerando la resa del 14% e quindi una produzione di formaggio di circa 5,7 Kg, venduto sul mercato al prezzo di 12 €. In questo caso quindi ciascuna capra ha consentito all'allevatore/trasformatore un guadagno di circa 69 €. Il consumo di alimento solido/capretto nel Gruppo B è risultato di 5,6 kg di fieno di medica e 1,7 kg di mangime, con un costo di circa 2,70 € per tutto il periodo sperimentale. Va comunque sottolineato che i capretti del gruppo B hanno presentato un peso alla macellazione leggermente inferiore rispetto a quelli del Gruppo A di circa 1,5 kg. Agli attuali prezzi di mercato (5 €/kg di peso viso), ciascun capretto del Gruppo B ha consentito un guadagno di circa 7,50 € in meno rispetto al Gruppo A. Nonostante la perdita economica riferita al peso alla vendita dei capretti, la tecnica di svezzamento applicata è risultata economicamente conveniente, senza inficiare il benessere degli animali e le performance di accrescimento.

Growth performance in kids undergone new weaning technique

Key words: kids, Weaning, milk.

Bibliografia

Morittu V.M., Neglia G., Tarantino G., Rossi P., Campanile G. (2010), Prova di svezzamento precoce dell'agnello di razza Comisana: primi risultati. Proc. XIX SIPAOC In: Large Animal Review; 5 (Suppl. 1): 93.

Identificazione delle frazioni caseiniche caprine mediante uno studio elettroforetico multidimensionale

B. LA GATTA, A. DI LUCCIA

Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi di Foggia, 71122 Foggia, Italia

Parole chiave: latte di capra, caseine, elettroforesi multidimensionale.

INTRODUZIONE - Sebbene l'elettroforesi bidimensionale IPG/DALT rappresenti uno degli strumenti più risolutivi per lo studio di proteine, l'identificazione di quest'ultime avviene con un uso estensivo della spettrometria di massa "full scan" e/o con frammentazione "MS/MS" del digesto triptico *in situ*, estratto da pezzetti di gel che contengono le proteine. Nel caso dello studio delle proteine del latte è stata impiegata sia la tecnica IPG/DALT sia l'urea PAGE/IEF accoppiata alla spettrometria di massa LC-MS/MS o MALDI-ToF. Il limite della seconda dimensione della IPG/DALT è la separazione per massa molecolare in presenza di SDS in quanto i pesi molecolari delle caseine sono abbastanza simili e in molti casi l'eterogeneità delle caseine produce delle sovrapposizioni. L'urea PAGE/IEF permette una migliore risoluzione delle frazioni caseiniche in quanto sia la prima che la seconda dimensione separano le frazioni caseiniche in base alla loro carica netta a pH alcalino, nella prima dimensione e per punto isoelettrico in seconda dimensione. La mappa bidimensionale che si ottiene è divisa nelle varie frazioni α_{s1}, α_{s2}, β e κ evidenziando tutta la loro eterogeneità dovuta a varianti genetiche, modifiche post-trascrizionali (delezioni o inserzioni) e post-traduzionali (fosforilazioni, glicosilazioni e lipidazioni). L'esatta identificazione degli spot generati dalla seconda dimensione deve eseguita con misure di spettrometria di massa. Il presente lavoro vuole dimostrare che una terza dimensione svolta per massa molecolare è in grado di stabilire e confermare l'appartenenza degli spot alle varie frazioni caseiniche caprine.

MATERIALI E METODI - La caseina intera è stata preparata secondo il protocollo di Aschaffenburg e Drewry (1959). I campioni di caseina sono disciolti in urea 8M e DTT 1%. L'elettroforesi in gel di poliacrilammide (T= 6,5% e C=2,6%) è stata eseguita secondo le indicazioni di Andrews (1983) in tampone alcalino a pH 8,6 e urea 8 M. La focalizzazione isoelettrica in gel di poliacrilammide (T=5%, C=2,6) nell'intervallo di pH 2,5-8,0 è stata eseguita secondo le indicazioni di Addeo *et al.*, (1988). I gel sono stati colorati con il coomassie G-250 Blue Silver seguendo il protocollo di Candiano *et al.* (2004). L'elettroforesi bidimensionale è stata realizzata svolgendo in prima dimensione l'urea/PAGE; dal gel è stata tagliata una striscia in cui si sono separate le frazioni caseiniche e caricata orizzontalmente sul gel di focalizzazione isoelettrica previa equilibrazione. La soluzione di equilibrazione è composta di urea 8 M, DTT 1% e iodoacetammide 4%. La mappa bidimensionale, composta ancora di bande, distribuite in zone ben definite per ogni singola frazione caseinica, dopo la colorazione sono escisse saldate con agarosio all'1% nei pozzetti di un gel poliacrilammide per un'elettroforesi verticale SDS/PAGE secondo la procedura di Laemmli (1970). I componenti delle varie frazioni caseiniche sono stati evidenziati ed identificati colorando all'argento la mappa tridimensionale ottenuta con soluzioni già pronte della GE-Heathcare Life Science (PlusOne Silver Staining Kit).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'impiego dell'elettroforesi monodimensionali non risolvono completamente la complessità delle forme proteiche in un campione di caseina intera. In Figura 1 è mostrata la combinazione di tre tecniche elettroforetiche. La Figura 1a mostra il profilo di una caseina intera caprina, dove è possibile osservare solo alcune forme proteiche delle frazioni caseiniche α_{s1}, α_{s2}, β e κ. In questo caso le proteine sono state separate per carica netta negativa a pH alcalino. La Figura 1b mostra la mappa risultante dopo la focalizzazione isoelettrica svolta in seconda dimensione, ortogonale alla prima. In questo caso si può osservare come le diverse frazioni caseiniche focalizzano in aree diverse della mappa e che la maggiore risoluzione dei punti isoelettrici ci permette di studiare la complessa eterogeneità delle caseine dovuta essenzialmente alle varianti genetiche e alla loro fosforilazione (α_{s1}, α_{s2}, β) e glicosilazione (κ). Tuttavia i componenti minori, indicati come A e B nella Figura 1b, anche se focalizzano nell'area della β-CN non è possibile identificarli subito come appartenenti a tale frazione. Questi componenti comigrano in prima dimensione mostrando una carica netta pari a quella della β1 e β2. La terza dimensione SDS/PAGE delle quattro bande ci mostra come i componenti A e B hanno lo stesso peso molecolare sia delle due β-CN (β1 e β2) sia della β-CN presente nella caseina intera esaminata utilizzata come riferimento. Questi risultati sono in accordo con il lavoro di Chianese et al. (1993) che definisce la natura dell'eterogeneità della β-CN mediante uno studio elettroforetico accoppiato alla spettrometria di massa. Le forme più abbondanti, β1 e β2, sono le più fosforilate (punti isoelettrici più acidi) mentre i componenti A e B rappresentano le forme β associate con minor grado di fosforilazione. Pertanto uno studio elettroforetico multidimensionale può riconoscere le varie forme caseiniche del latte caprino.

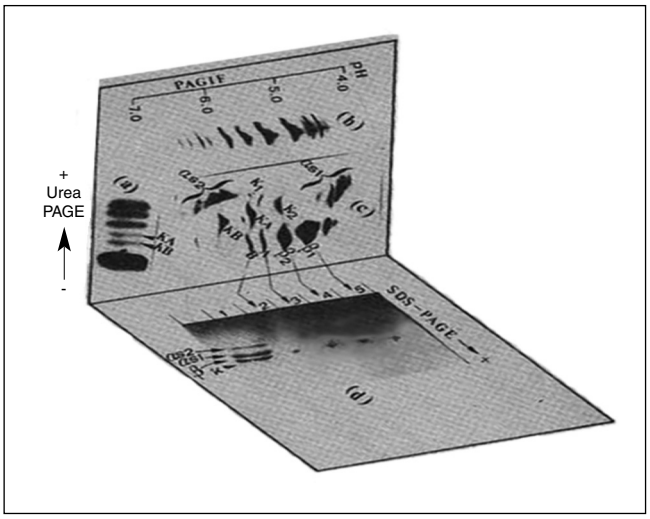


Figura 1 - Elettroforesi tridimensionale di una caseina intera caprina: (a) Urea-PAGE; (b) IEF; (c) SDS-PAGE.

Identification of caprine casein by multidimensional electrophoresis

Key words: multidimensional electrophoresis, caprine casein, β-CN phosphorilation.

Bibliografia

Addeo F., Mauriello R., Di Luccia A. (1986), A gel electrophoretic study of caprine casein. Journal of Dairy Research, 55: 413 - 421.

Andrews A. T. (1983), Proteinases in normal bovine milk and their action on the caseins. Journal of Dairy Research, 5: 45-55.

Candiano, G., Bruschi M., Musante L., Santucci, L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G. (2004), Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis, 25: 1327-1333.

Chianese L., Garro G., Nicolai M.A., Mauriello R., Ferranti P., Pizzano R., Cappuccio U., Laezza P., Addeo F., Ramunno L., Rando A., Rubino R., (1993), The nature of β-casein heterogeneity in caprine milk. Lait, 73: 533-547.

Laemmli U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

La paratubercolosi negli ovini e caprini: II. Elettroforesi bidimensionale del proteoma di ovini sierologicamente positivi e negativi

P. LOIZZO[1], A. CASSONE[1], S. WEIGL[1], E. CIANI[2]

[1] DETO-Sez. Cliniche veterinarie e Produzioni Animali - Università degli studi di Bari "Aldo Moro"
[2] Dip. Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica - Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

Parole chiave: Paratubercolosi, ovini, proteomica.

INTRODUZIONE - Nel contesto del "Programma per sviluppare metodologie per l'identificazione ed il controllo di infezioni micobatteriche animali - EpiSud" (PON "Ricerca e Competitività" 2007-2013) l'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" (DETO - Sez. Cliniche Veterinarie e Produzioni Animali) ha avviato un'attività di ricerca sulla Paratubercolosi (o malattia di Johne) in ovini e caprini, determinata da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e causa di enterite granulomatosa, linfadeniti mesenterici, deperimento e morte, con perdite economiche per gli allevatori (Dennis *et al.*, 2011). Un obiettivo del progetto consiste nell'identificare, mediante elettroforesi bidimensionale (2-DE) e spettrometria di massa (MS), bio-marcatori proteici da utilizzare per la produzione di kit diagnostici capaci di identificare animali infetti prima della fase clinica conclamata, periodo in cui il test ELISA attualmente disponibile non si rivela efficace. In questo lavoro sono riportati i primi risultati del confronto dei pattern proteici di ovini risultati positivi al test ELISA con quelli di soggetti negativi.

MATERIALI E METODI - *Campionamento.* A partire dai risultati di una ampia indagine sierologica, sono stati raccolti 236 campioni di sangue da ovini e caprini come da tab.1. Dopo separazione del siero, i campioni sono stati stoccati a -80°C fino al momento dell'analisi 2D-E.

Preparazione del campione per le analisi elettroforetiche. Da tutti i sieri raccolti è stata allontanata la frazione albuminica che maschera gran parte delle proteine presenti in percentuali minori. mediante colonne per affinità HiTrap Blue HP della GE Healthcare (de Morais-Zan *et al.*, 2011).

SDS-PAGE, 2D-E ed analisi di immagine. I 52 sieri (26+26) di cui sopra, privi di albumina, dopo dosaggio proteico mediante kit DCprotein assay (Biorad) sono stati analizzati in SDS-PAGE al 6-12% in gradiente di acrilamide e 2-DE (Faccia *et al*. 2014). I profili SDS-PAGE e le mappe 2-DE sono stati analizzati, rispettivamente, con il software Quantity One (Biorad) e Image Master 2D Platinum (GE Healthcare Life Sciences).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Analizzando i profili SDS-PAGE sono state riscontrate numerose differenze fra campioni, probabilmente non solo relazionate alla variabilità individuale, ma anche alla positività o negatività dei soggetti alla Paratubercolosi. Per meglio individuare le variazioni proteiche è stato necessario effettuare una analisi 2-DE. La maggior parte delle proteine del siero ovino ha pI acido (Chiaradia *et al*., 2012); per una loro migliore risoluzione sono state utilizzate strip di focalizzazione isoelettrica a pH 4-7. Le proteine predominanti sono albumine (MW 65 kDa) e immunoglobuline (MW 160 - 165 kDa); molte proteine mostrano la classica disposizione orizzontale delle forme glicosilate o fosforilate. Da un primo confronto delle mappe 2-DE di soggetti positivi e negativi, si rilevano differenze fra gli spot in termini di livelli di fosforilazione e maggiore o minore espressione. In figura 1 è riportata una mappa 2-DE di riferimento con alcune porzioni di gel ingrandite in cui le principali differenze sono state evidenziate.

Molte porzioni sono state identificate in precedenti lavori (Chiaradia *et al*., 2012) come la 1 (associabile alla transferrina), 2 (fetuina-A e suoi precursori), 3 (immunoglobuline), 4 (transtiretina), 6 (apolipoproteina-A), 7 (sieroproteine-aptoglobina). Dagli spot localizzati in quest'ultima zona, per la quale si rilevano maggiori differenze fra i due gruppi, si procederà ad analisi MS al fine di individuare biomarker per la paratubercolosi ovicaprina.

Tabella 1 - Schema di campionamento e stato di avanzamento dell'indagine proteomica.

	Analisi sierologica	2D-E	
Campioni	Tot	Positive	Negative
Valle Del Belice	85	17	17
Comisana	81	9	9
Garganica	70	0	0
Totale	236	26	26

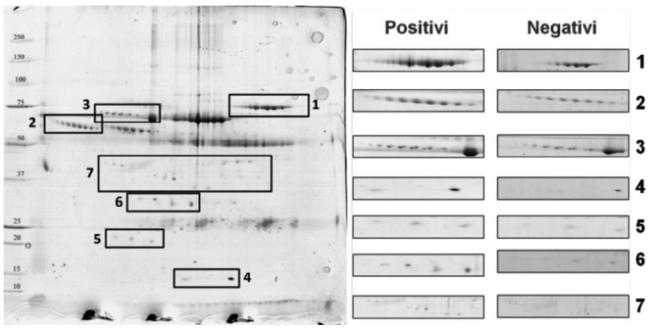


Figura 1 - Analisi tipo di elettroforesi bidimensionale (a sinistra). Particolari di elettroforesi bidimensionale da soggetti positivi e negativi alla paratubercolosi (a destra).

Paratuberculosis in sheep and goats: II. 2d-e proteome of seropositive and seronegative sheep

Key words: Paratuberculosis, sheep, proteomics.

Bibliografia

Chiaradia E., Avellini L., Tartaglia M., Gaiti A., Just I., Scoppetta F., Czentnar Z., Pich A. (2012), Proteomic evaluation of sheep serum proteins. BMC Veterinary Research, 8: 66-78.

de Morais-Zani K., Grego K.F., Tanaka A.S., Tanaka-Azevedo A.M. (2011), Depletion of Plasma Albumin for Proteomic Analysis of Bothrops jararaca Snake Plasma. Journal of Biomolecular Techniques 22, 67-73.

Dennis M.M., Reddacliff L.A., Whittington R.J. (2011), Longitudinal Study of Clinicopathological Features of Johne's Disease in Sheep Naturally Exposed to Mycobacterium avium subspecies Paratuberculosis. Veterinary Pathology 48(3): 565-575.

Faccia M., Trani A., Loizzo P., Gagliardi R., La Gatta B., Di Luccia A. (2014), Detection of as1-I casein in mozzarella Fiordilatte: A possible tool to reveal the use of stored curd in cheesemaking. Food Control 42: 101-108.

Gao J., Garulacan L.A., Storm S.M., Opiteck G.J., Dubaquie Y., Hefta S.A., Dambach D.M., Dongre A.R. (2005), Biomarker discovery in biological fluids. Methods 35: 291-302.

Good D.M., Thongboonkerd V., Novak J., Bascands J.L., Schanstra J.P., Coon J.J., Dominiczak A., Mischak H. (2007), Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. Journal of Proteome Research 6: 4549-4555.

Sierodiagnosi di *Coxiella burnetii* in fase acuta: problematiche nella messa a punto di un ELISA per il dosaggio delle IgM negli ovi-caprini

C. LUZZAGO[1], V. BORROMEO[1], F. RIZZO[2], N. VITALE[3], C. LO VECCHIO[2], L. CHIAVACCI[3], M.L. MANDOLA[2]

[1] Dip. di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano
[2] I.Z.S. P.L.V., S.C. Virologia, S.S. Lab. Spec. Diagnostica molecolare virologica e ovocoltura
[3] I.Z.S. P.L.V., S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico, S.S. Osservatorio Epidemiologico

Parole chiave: febbre Q, ovi-caprini, IgM, infezione acuta.

INTRODUZIONE - *Coxiella burnetii,* agente di febbre Q, è un batterio intracellulare obbligato a carattere zoonosico, in grado di infettare l'uomo e numerose specie animali. Le infezioni umane avvengono più frequentemente per via inalatoria in seguito a contaminazione ambientale da parte di ovi-caprini eliminatori. Nell'uomo, per la diagnosi di infezioni acute e croniche, si valutano le variazioni temporali dei diversi isotipi di immunoglobuline, in particolare IgM e IgG (Boden *et al.*, 2010). In campo veterinario i test sierologici ELISA attualmente in commercio, validati per la sierodiagnosi nei ruminanti, misurano solo le IgG e non permettono quindi considerazioni sul decorso dell'infezione. Una possibilità è adattare metodi per il dosaggio di altri isotipi di immunoglobuline negli ovi-caprini o di IgM in altre specie (Kittelberger *et al.*, 2009; Roest *et al.,* 2013).
Lo scopo del presente lavoro è stato mettere a punto un test ELISA indiretto per il dosaggio di IgM anti *C. burnetii* in siero ematico di ovicaprini, adattando un kit disponibile in commercio per il dosaggio delle IgG nei ruminanti. In tale test, la proteina G utilizzata per la rilevazione degli anticorpi ha infatti bassissima affinità per le IgM. In generale, uno dei principali ostacoli nella messa a punto dei test immunochimici è che la specificità dei test dipende in modo significativo non solo dalle caratteristiche degli anticorpi, ma anche dalla composizione del campione, dalla matrice e dai reattivi e formato del test (Tate e Ward, 2004).
MATERIALI E METODI - Sono stati utilizzati 24 sieri, selezionati tra quelli prelevati durante lo screening sierologico della popolazione ovicaprina piemontese (Mandola *et al.*, 2013). Il criterio di selezione si è basato sull'esito sierologico dell'animale e sulla sieroprevalenza dell'allevamento di appartenenza determinati utilizzando il test ELISA indiretto (LSIVetRuminant Q Fever-Serum/Milk, LSI, Francia), individuando: 12 soggetti sieronegativi (6 pecore e 6 capre) da allevamenti in cui tutto l'effettivo era risultato sieronegativo; 12 animali (6 pecore e 6 capre) di 1-2 anni altamente positivi all'ELISA di screening e provenienti da allevamenti con sieroprevalenza elevata. Tale criterio di selezione è stato applicato non avendo a disposizione controlli negativi e positivi a IgM anti *C. burnetii*. Per il dosaggio delle IgM sono state utilizzate piastre a 96 pozzetti con antigene adsorbito in fase I e II (ceppo ovino*Cb*01), incluse nel kit LSI. I test sono stati condotti seguendo le istruzioni del produttore, sostituendo la proteina G coniugata con HRP con due diversi anticorpi anti-IgM. Ogni siero è stato dosato in doppio e con i due diversi anticorpi in contemporanea nella stessa piastra. In breve, 100 mL di siero diluito 1:400 in "sample buffer" sono stati incubati a 37°C per 1h. Dopo i lavaggi, sono stati aggiunti 100 mL di: (a) Policlonale di coniglio anti-IgM di capra coniugato con HRP (Bethyl Laboratories, USA), diluito 1:10000; (b) Monoclonale anti-IgM di pecora (Clone 25.69; AbD-Serotec, UK), diluito 1:300. Le piastre sono state quindi incubate a 37°C per 1h. Per i pozzetti incubati con (a), dopo i lavaggi è stato aggiunto il substrato, seguito da letture a 630 nm. Per i pozzetti incubati con (b), dopo i lavaggi, sono stati aggiunti 100 mL di un anticorpo anti-IgG di topo marcato con HRP (Jackson Laboratory, USA) e dopo 1 h, aggiunto il substrato e fatte letture a 630 nm. Per le prove di inibizione di interferenti i sieri sono stati trattati con diversi protocolli: diluizione con LowCross-Buffer (Candor Bioscience, Germany); pre-incubazione con Charcoal (2 mg/mL); pre-incubazione con IgG di topo (10 mg/mL).
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Hanno mostrato significativa reattività al test ELISA indiretto per IgM anti *C. burnetii* sia sieri di animali sieropositivi al precedente screening per IgG (9/12), sia quelli di soggetti sieronegativi alle IgG (8/12). Non sono state evidenziate differenze significative tra i risultati ottenuti con i due diversi anticorpi secondari anti IgM (protocolli a e b), tra ovini e caprini, ne correlazioni tra l'entità di sieropositività alle IgG e alle IgM. Inoltre, anche il siero fornito dal kit LSI come controllo negativo per le IgG anti *C.burnetii* ha mostrato una reattività significativa. Il riscontro di un elevato numero di sieri reattivi alle IgM anche fra i controlli sieronegativi alle IgG evidenzia la presenza di interferenze responsabili di false positività. Infatti, mentre l'utilizzo di *C. burnetii* in entrambe le fasi antigeniche (I e II) potrebbe aver contribuito all'elevato numero di campioni positivi alle IgM tra i soggetti positivi alle IgG, il criterio di selezione dei controlli sieronegativi permette di escludere la presenza di possibili soggetti IgM positivi in questo gruppo. Infatti i campioni provenivano da allevamenti in cui tutto l'effettivo è stato testato ed è risultato sieronegativo al test di screening per IgG, che presenta una elevata specificità diagnostica (98.8%). Infine, i protocolli per la riduzione di possibili interferenze specifiche e aspecifiche adottati non hanno ridotto l'errore analitico. In conclusione, la presenza di reazioni false positive in entrambi i protocolli applicati non ha consentito di mettere a punto un dosaggio attendibile delle IgM anti *C. burnetii*, ma sottolinea come adattare kit ad utilizzi differenti a quelli per cui sono stati validati richieda un attento studio preliminare, per evitare di incorrere in errori di interpretazione dei risultati.

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

Serological diagnosis of *Coxiella burnetii* acute infection: problems in the development of an ELISA for IgM detection in small ruminants

Key words: Q-fever, IgM, small ruminants, acute infection.

Bibliografia

Boden K., Wagner-Wiening C., Seidel T., Baier M., Bischof W., Straube E., Kimmig P. (2010), Diagnosis of acute Q fever with emphasis on enzyme-linked immunosorbent assay and nested polymerase chain reaction regarding the time of serum collection. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 68: 110-116.

Kittelberger R., Mars J., Wibberley G., Sting R., Henning K., Horner G.W., Garnett K.M.,

Hannah M.J., Jenner J.A., Pigott C.J., O'Keefe J.S.. (2009), Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against Coxiella burnetii (Q-fever) in ruminants: Recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal 57(5): 262-268.

Mandola M.L., Ameri D., Rizzo F., Bianchi M., Decastelli L., Chiavacci L., Vitale N., Luzzago C. (2013), Sviluppo di un programma di monitoraggio per febbre Q in allevamenti ovi-caprini. Large Animal Review 5(suppl.1):36.

Roest H.I.J., Post J., van Gelderen B., van Zijderveld F.G., Rebel J.M.J. (2013), Q fever in pregnant goats: humoral and cellular immune responses. Veterinary Research 44:67-75.

Tate J., Ward G. (2004), Interferences in Immunoassay. The Clinical Biochemist Reviews 25(2):105-120.

Coxiella burnetii: sieroprevalenza e fattori di rischio in ovi-caprini piemontesi

M.L. MANDOLA[1], F. RIZZO[1], N. VITALE[2], C. LO VECCHIO[1], M. BALLARDINI[1], V. BORROMEO[3], L. CHIAVACCI[2], C. LUZZAGO[3]

[1] I.Z.S. P.L.V., S.C. Virologia, S.S. Lab. Spec. Diagnostica molecolare virologica e ovocoltura
[2] I.Z.S. P.L.V., S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico, S.S. Osservatorio Epidemiologico
[3] Università degli Studi di Milano, Dip. di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica

Parole chiave: febbre Q, sieroprevalenza, fattori di rischio, ovi-caprini.

INTRODUZIONE - *Coxiella burnetii,* agente di febbre Q, è un batterio intracellulare obbligato in grado di infettare l'uomo e numerose specie animali. Le sue forme simil-sporigene, molto resistenti a condizioni ambientali estreme, sono veicolabili con il vento anche a molti km di distanza. Gli ovi-caprini sono la specie animale più frequentemente associata a focolai umani di febbre Q. L'infezione nei ruminanti, di solito asintomatica, può provocare problemi a livello riproduttivo. Le infezioni nell'uomo sono per lo più causate da inalazione di polvere contaminata da batteri presenti negli invogli fetali, secreti vaginali o feci di animali infetti (EFSA). Nell'uomo circa il 40% delle infezioni evolve in forma simil-influenzale, di cui il 2-5% dei casi cronicizza in endocardite (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). Nei piccoli ruminanti, le indagini diagnostiche sono condotte in caso di evidente rischio per l'uomo ovvero in presenza di problemi riproduttivi in un'elevata percentuale di animali. La frammentaria e difficoltosa acquisizione di dati nelle greggi di ovi-caprini e il loro ormai noto coinvolgimento nella trasmissione all'uomo, ha motivato la predisposizione di uno screening sierologico per la definizione su base regionale della sieroprevalenza negli ovi-caprini a livello di popolazione, allevamento e intra-allevamento e l'analisi statistica dei potenziali fattori di rischio.

MATERIALI E METODI - Per la stima della sieroprevalenza di *C. burnetii* è stato estratto un campione di 411 allevamenti, applicando un metodo di campionamento casuale a doppio stadio stratificato per area geografica e allevamento. A livello regionale la numerosità campionaria è stata fissata ipotizzando una prevalenza attesa del 35%, mentre a livello di allevamento è stata fissata in modo da definire una prevalenza intra-allevamento del 10% (CI 95%) (Guatteo *et al.*, 2011): per allevamenti di dimensioni medio-grandi un campione di 30 capi, per i piccoli, tutto l'effettivo. Il campionamento è stato eseguito utilizzando la procedura *procsurveyselect* del software SAS v9.2. I campioni di sangue sono stati prelevati ai soggetti > di 6 mesi e i sieri sono stati testati con il kit ELISA indiretto *LSIVet Ruminant Q Fever-Serum/Milk* (*LSI, Lissieu France*), che utilizza un antigene adsorbito in fase I e II (ceppo ovino *Cb*01). In base ai valori di accuratezza del kit, forniti per ogni specie, è stata calcolata la sieroprevalenza reale (Rogan e Gladen, 1978). Un allevamento è stato definito sieropositivo con almeno un campione positivo al test sierologico. Una scheda anamnestica, compilata dai medici veterinari ASL durante il prelievo, è stata predisposta ai fini della raccolta dei dati epidemiologici di tipo gestionale/sanitario. L'analisi dei fattori di rischio è stata condotta con un modello di regressione logistica (software SAS v9.2).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I campionamenti sierologici, condotti nell'arco del 2012, hanno coinvolto un totale di 5729 capi (2545 pecore e 3184 capre) di 411 allevamenti dei quali 111 di pecore, 207 di capre e 93 aziende miste (pecore+capre). Il 13.7% (CI 95%:13.2-14.2) dei capi testati è risultato sieropositivo con valori simili sia nelle pecore che nelle capre. Il 28.9% degli allevamenti è risultato sieropositivo (CI95%: 23.4-34.2) con valori più elevati nelle greggi miste (52.6%, CI 95%:46.3-56.9) e in quelle di sole pecore (33.6%, CI 95%:28.4-38.8), rispetto alle greggi di sole capre (18.5%, CI 95%:14.8-21.3). L'ipotesi che le caratteristiche gestionali di allevamento favoriscano la diffusione dell'infezione è supportata dai risultati dell'analisi dei fattori di rischio, che evidenziano nell'analisi univariata un'associazione statisticamente significativa fra allevamenti sieropositivi e parametri quali la transumanza, il pascolo, le dimensioni e il contatto con altre greggi. Sono risultati correlati anche l'utilizzo di antibiotici, il trattamento con antiparassitari e i disordini della sfera riproduttiva. Nelle aziende sieropositive, i risultati evidenziano una sieroprevalenza intra-allevamento del 23,2% (CI 95%:19.9-26.4). Tale parametro, di rado considerato negli studi epidemiologici, risulta invece cruciale per l'ottimizzazione degli schemi di controllo. A livello geografico non sono state registrate differenze significative, nonostante nelle province di Torino, Vercelli e Verbania si sia evidenziata una percentuale del 46.6% e 48% di allevamenti sieropositivi, con valori tra il 12.5% e 23.8% a Novara, Alessandria e Asti. A livello di singolo animale, l'analisi univariata ha evidenziato un'associazione significativa tra sieropositività ed età, come già osservato da altri AA (Ruiz-Fons *et al.*, 2010); nessuna associazione è stata dimostrata con il sesso. Nel modello di regressione logistica multivariata le variabili associate alla sieropositività sono risultate il contatto con altre greggi (O.R. 2.3, CI 95%:1.4-3.8) e le dimensioni del gregge (O.R. 4.2, CI 95% 2.6-6.7).

Lo studio, evidenziando la circolazione per via indiretta di *C. burnetii* nell'area considerata, conferma la diffusione dell'infezione nei piccoli ruminanti, anche in Piemonte. I dati di sieroprevalenza ottenuti a livello di allevamento e di animale sono sovrapponibili a quelli descritti in numerosi paesi europei (Guatteo *et al.*, 2011). Le pecore e le greggi miste mostrano i valori più elevati, confermando l'importante ruolo epidemiologico della pecora nel ciclo d'infezione del batterio nell'area mediterranea (Manfredi-Selvaggi *et al.*, 1996). Lo studio ha permesso di ottenere risultati confrontabili su base internazionale, come raccomandato dall'EFSA, grazie all'ottimizzazione dei metodi di campionamento, alla raccolta armonizzata dei dati e alla stima accurata della prevalenza di infezione.

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

Coxiella burnetii seroprevalence and risk factors in small ruminants in piedmont, Italy

Key words: Q-fever, seroprevalence, risk factors, small ruminants

Bibliografia

EFSA site http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/qfever.htm

Guatteo R., Seegers H., Taurel A.F., Joly A., Beaudeau F. (2011). Prevalence of Coxiella burnetii infection in domestic ruminants: a critical review. Veterinary Microbiology 149(1-2):1-16.

Manfredi-Selvaggi T., Rezza G., Scagnelli M., Rigoli R., Rassu M., De Lalla F., Pellizzer G.P., Tramarin A., Bettini C., Zampieri L., Belloni M., Pozza E.D., Marangon S., Marchioretto N., Togni G., Giacobbo M., Todesca to A., Binkin N. (1996). Investigation of a Q-fever outbreak in northern Italy. European Journal of Epidemiology 12(4): 403-8.

Rogan W.J. and Gladen B. (1978). Estimating prevalence from the results of a screening test. American Journal of Epidemiology 107 (1): 71-6.

Ruiz-Fons F., Astobiza I., Barandika J.F., Hurtado A., Atxaerandio R., Juste R.A., García-Pérez A.L. (2010). Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. BMC Veterinary Research 6: 3.

Sidi-Boumedine K., Rousset E., Henning K., Ziller M., Niemczuck K., Roest H.I.J.,Thiéry R. (2010). Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Scientific Report on Question No EFSA-Q-2009-00511: 48.

Latte fermentato mesofilo: effetto del genotipo di latte di capra al locus dell'alfa-s1 caseina (CSN1S1) sulla vitalità dei lattobacilli mesofili

N.P. MANGIA[1], M. COTTU[1], S. CHESSA[2], O. BULGARI[3], G. BATTACONE[4], A. NUDDA[4]

[1] Dipartimento di Agraria, Istituto di Microbiologia, Viale Italia 39, Sassari
[2] Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR Milano, Via Bassini 15, Milano, 20133 Italy
[3] Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli studi di Brescia
[4] Dipartimento di Agraria, Istituto di Scienze Zootecniche, Viale Italia 39, Sassari

Parole chiave: latte di capra, genotipo α_{S1}-caseina, latti fermentati, lattobacilli mesofili.

INTRODUZIONE - Il latte di capra è utilizzato in molti paesi come alternativa al latte bovino in bambini che manifestano intolleranza o allergia alle proteine del latte vaccino. Nella specie caprina esiste un elevato polimorfismo del gene alfa-s1 (CSN1S1). In particolare, in letteratura sono descritte 23 varianti genetiche delle quali alcune delle quali sono associate con nulla o bassa espressione della proteina. Sulla base del contenuto αS1-CN, gli alleli CSN1S1 possono essere classificati in alleli forti, intermedi, deboli e nulli. Per alcune di queste varianti il livello di sintesi non è stato verificato sperimentalmente, ma dedotto dalla variante da cui originano gli alleli identificati più di recente (ad esempio la *CSN1S1*A*') (Chessa e Caroli, 2014). Il latte proveniente dai differenti genotipi mostra differenze nella attitudine alla trasformazione casearia e nelle caratteristiche nutrizionali. In particolare studi su cavie (Bevilacqua et al., 2001) e sulle cellule mononucleari del sangue periferico (Albenzio et al., 2012), suggeriscono una minore allergenicità del latte con un basso contenuto in alfa-s1-caseina. Non si conosce la risposta di latti con alto e basso contenuto in αS1-CN nella produzione di latti fermentati, le cui caratteristiche dipendono, oltreché dalla materia prima usata, dalle colture starter impiegate. I lattobacilli, insieme ai bifidobatteri sono i microrganismi maggiormente impiegati come probiotici. Sebbene tra i ricercatori non esista un consenso unanime sulla minima concentrazione di batteri che deve essere consumata per produrre un effetto benefico sulla salute umana, vari autori sostengono che debbano essere presenti almeno 107ufc / mLal momento del consumo (Deiana e Torriani, 2012).Data l'ampia diffusione dei latti fermentati e il crescente interesse da parte dei consumatori nei riguardi di prodotti con elevato valore nutrizionale e dietoterapeutico, lo scopo di questo lavoro è stato di verificare la vitalità della coltura Lactobacillus casei 20 in latti di capra con differente genotipo al locus della CSN1S1.

MATERIALI E METODI - Sono stati prodotti latti fermentati di capra, impiegando come coltura microbica il *Lactobacillus casei20*, isolato da latte crudo e appartenente alla ceppo-teca dell'istituto di Microbiologia Agraria (università di Sassari). È stato utilizzato latte di massa ottenuto da 2 gruppi di capre Saanen: un gruppo il cui livello di CSN1S1 nel latte fosse debole-nullo (00, comprendente individui coi genotipi FF, 0_10_1, e $F0_1$) e un gruppo omozigote per l'allele forte A (*AA*). Il genotipo degli animali è stato tipizzato secondo la metodica di Caroli et al. (2006). I campioni di latte sono stati trattati a 90°C per 10 minuti, raffreddati fino a 30°C e inoculati con il *Lactobacillus casei20* nella concentrazione del 1% (w/v). A 0, 2, 4, 6, 8 e 24 ore di incubazione a 30°C è stata determinatala conta vitale in MRS (OXOID).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I risultati hanno mostrato una buona capacità di sviluppo del ceppo *Lactobacillus casei*20 sia nel latte 00 che nel latte AA. La vitalità del *Lactobacillus casei* non è stata influenzata dal diverso genotipo al locus CSN1S1 del latte di capra. I ceppi impiegati hanno evidenziato una notevole velocità di crescita in ambedue i substrati raggiungendo già alle 6 ore 10 mil di ufc/mL e oltre 100 mil di ufc/mL dopo 24 ore d'incubazione (Fig. 1). I risultati sono inoltre da ritenere incoraggianti in quanto ottenuti impiegando una sola specie lattica (Mangia et al. 2013).

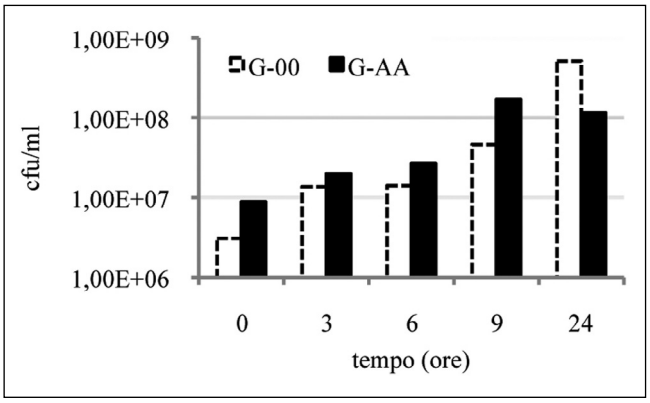


Figura 1 - Evoluzione temporale della concentrazione di *Lactobacillus casei* 20 in latte di capra con genotipo nullo (G-00) e forte (G-AA) al locus della CSN1S1.

Ringraziamenti: ricerca finanziata dalla Fondazione Banco di Sardegna con il progetto"Valorizzazione della specie caprina per la produzione di latte ad elevato valore nutrizionale".

Mesophilic fermented milk: effect of goat alpha-s1 casein genotype (CSN1S1) on the viability of mesophilic lactobacilli

Key words: goat milk, α_{S1}-casein genotype, fermented milk, mesophilic lactobacilli.

Bibliografia

Albenzio M., Campanozzi A., D'Apolito M., Santillo A., Pettoello Mantovani M., Sevi A. (2012), Differences in protein fraction from goat and cow milk and their role on cytokine production in children with cow's milk protein allergy. Small Rum. Res. 105: 202-205.

Bevilacqua C., Martin P., Candalh C., Fauquant J., Piot M., Roucayrol A.M., Pilla F., Heyman M. (2001), Goats' milk of defective alpha(s1)-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to beta-lactoglobulin in guinea pigs. J. Dairy Res. 68:217-227.

Caroli A., Chiatti F., Chessa S., Rignanese D., Bolla P., Pagnacco G. (2006). Focusing on the Goat Casein Complex. J. Dairy Sci. 89:3178-3187.

Deiana P., Torriani S. (2012), Latti fermentati. In: Microbiologia dei prodotti alimentari, a cura di Farris G., Gobbetti M., Neviani E., Vincenzini M. Casa Editrice Ambrosiana.

Mangia N.P., Garau G., Murgia M.A., Bennani A., Deiana P. (2014), Influence of autochthonous lactic acid bacteria and enzymatic yeast extracts on the microbiological, biochemical and sensorial properties of Lben. J. Dairy Res. 81:193-201.

Produzione, innocuità e utilizzo di un vaccino stabulogeno sperimentale per la profilassi delle infezioni da *Mycoplasma capricolum sub. capricolum* in pecore Sarde

G. MAROGNA[1], A. FIORI[1], C. LONGHEU[1], A. PATERNA[2], S. TOLA[1], G. SCHIANCHI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi" - Dipartimento di Produzioni
[2] Univ. Murcia, Fac. Vet. Sci., Dept. Anim. Hlth, E-30100 Murcia, Spain

Parole chiave: profilassi, immunizzazione, esame clinico.

INTRODUZIONE - I micoplasmi appartenenti al cluster mycoides sono patogeni sia per gli ovini che per i caprini. Il *Mycoplasma capricolum subsp. capriculum* può causare setticemie, artriti, mastite e polmoniti (Gomez-Martin et al., 2013). La trasmissione della malattia avviene per contatto diretto, la morbilità è elevata mentre la mortalità e variabile e dipende da fattori condizionanti. In Sardegna l'infezione si riscontra nelle capre mentre, finora, non era mai stata segnalata 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. Nei caprini si riscontra la sintomatologia respiratoria principalmente sui soggetti adulti mentre quadri setticemici, ad elevata mortalità, febbre e poliartrite sono rilevati principalmente nei capretti. Recentemente abbiamo avuto modo di diagnosticare un focolaio in ovini appartenenti ad un allevamento misto con capre. Questo lavoro descrive le azioni di profilassi sanitaria e immunizzante che sono state poste in essere per controllare ed eradicare la malattia.

MATERIALI e METODI - Il gregge era costituito da 205 pecore e 15 capre adulte nonché da una rimonta di 27 agnelle. I soggetti ovini adulti manifestavano sintomi respiratori gravi con dispnea, tosse e abbondante muco nasale. Si osservavano anche casi di poliartrite. Non abbiamo osservato forme di mastite clinica particolari o comunque ascrivibili ad infezione da micoplasma. Al 25% degli ovini adulti è stato prelevato sangue per esami sierologici pre vaccinazione e latte per diagnosi diretta. Sono stati eseguiti prelievi di liquido intrarticolare ed eseguiti tamponi auricolari alle capre che, peraltro, non manifestavano alcuna sintomatologia clinica. Il vaccino stabulogeno è stato allestito, dopo identificazione molecolare, a partire da un clone di *M. capricolum subsp. capriculum*. L'allestimento del vaccino ha previsto una prima amplificazione con 50 ml di PPLO arricchito con TC al 15% e siero equino al 10% incubato a 37°C per 24 ore. Da questa coltura si è provveduto alla preparazione di un inoculo su 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. 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 10^9 UFC/ml. La sospensione così ottenuta veniva omogenata in agitazione e quindi il prodotto veniva inflaconato. 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) Sabourod (Oxoid, U.K.) per verificare la crescita delle muffe; 3) Thioglycolate 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. Il protocollo di vaccinazione ha previsto l'inoculo di tutto l'effettivo delle pecore e capre. 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.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Per quanto concerne ai controlli specifici sul vaccino stabulogeno i risultati sono i seguenti:
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 si è re-isolato esclusivamente il *M. capricolum subsp. capriculum.*
Controllo della sterilità: non è stata evidenziata alcuna crescita nella semina sui terreni: Agar Sangue, Sabourod, Thioglicolate e Hayflick. Per quanto concerne alle reazioni post vaccinali, i risultati riportati sono:
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. Premesso che il monitoraggio dell'efficacia delle nostre profilassi è ancora in corso, è importante sottolineare come successivamente al richiamo non si sono più osservati nuovi casi clinici in allevamento. Profilassi sanitaria: tutti i capi con sintomi clinici sono stati isolati. È stata bloccata l'introduzione di nuovi capi in azienda. Per quanto concerne al protocollo vaccinale, l'intenzione è quella di 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 che di anno in anno verrà vaccinata tre volte. La nostra strategia prevede di continuare le vaccinazioni fino a quando tutti i capi adulti dell'allevamento non verranno sostituiti da capi di rimonta regolarmente vaccinati, si è preventivato di raggiungere questo obbiettivo in circa 3 anni, con una rimonta fra il 30 e il 35%.

Production of inactivated vaccine against *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capricolum* for contagious agalactia prophylaxis and control in a sardinian flock

Key words: *vaccine, Mycoplasma capricolum subsp. capricolum, sheep.*

Bibliografia

Gomez-Martin A., Amores J., Paterna A., de la Fe C (2013), Contagious agalactia due to Mycoplasma spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. Vet.J. 198: 48-56.

Effetto della supplementazione con semi di lino sul profilo metabolico della pecora Sarda

A. MARZANO[1], F. CORREDDU[1], M.F. LUNESU[1], P. NICOLUSSI[2], P. BONELLI[2], A. NUDDA[1]

[1] Dipartimento di Agraria, Sezione di Scienze Zootecniche, University of Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italy
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italy

Parole chiave: latte ovino, semi di lino, metabolismo del rene e del fegato.

INTRODUZIONE - La supplementazione lipidica è solitamente adottata per incrementare la concentrazione energetica della razione nei ruminanti in prima lattazione, che necessitano di alte richieste per la produzione di latte e i bassi consumi di sostanza secca. Molti studi hanno messo in evidenza come l'uso di supplementi lipidici, quali semi di lino estruso, nella dieta possa migliorare la qualità nutrizionale del latte ovino in termini di PUFA e CLA (Pulina et al., 2008; Mele et al., 2011). Tuttavia la supplementazione lipidica nella dieta dei ruminati può influenzare, non soltanto le performance produttive, ma anche la salute dell'animale (Petit et al., 2007); dalle nostre conoscenze bibliografiche non è mai stato valutato il suo impatto sul metabolismo del fegato e del rene. L'obiettivo di questo studio è di indagare, se la supplementazione di semi di lino nella dieta della pecora influenza le attività metaboliche del rene e del fegato e lo stato di salute dell'animale.

MATERIALI E METODI - La prova sperimentale è stata condotta presso un'azienda zootecnica della provincia di Sassari. Sedici pecore sane di razza Sarda, ad inizio lattazione, sono state suddivise in due gruppi isoproduttivi (1,75 Kg/die per capo), e assegnate a due diete sperimentali; per la durata di 60 giorni entrambi i gruppi hanno ricevuto una dieta base isoproteica ed isoenergetica (CON), integrata con 220 g/die di semi di lino estruso (LIN). I campioni di latte individuale sono stati analizzati per grasso, proteina, lattosio e urea con Milkoscan 6000 instrument (Foss Electric, Hillerød, Denmark), e per le cellule somatiche con Fossomatic 360 instrument (Foss Electric). È stato utilizzato un sistema chimico-clinico per quantificare (Dimension RXL, Dade Behring, Ventura, California) creatinina, bilirubina, albumina, proteina, BUN, alanina transaminasi (ALT), Transaminasi aspartato (AST), gamma glutil transpeptidasi (GGT) e fosfatasi alcalina (ALP) nel siero ovino. I dati della produzione e composizione del latte e dei parametri ematici e metabolici sono stati analizzati con misure ripetute lineari usando un modello mixed SAS (SAS Institute Inc., Cary, USA).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La supplementazione lipidica durante tutto il trattamento non ha migliorato significativamente né la quantità e né la qualità del latte prodotto, seppure le pecore alimentate con semi di lino mostrano performance produttive migliori (Tab. 1).

Lo studio dei parametri metabolici (Tab. 2) della funzione epatico-renale ha evidenziato come la supplementazione a base di semi di lino non influenzi negativamente lo stato di salute dell'animale, come confermato dall'assenza di differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda i parametri ematici (Emocromo,dato non riportato). Inoltre la dieta ha avuto una influenza positiva sugli enzimi epatici, riducendo, in particolare, i valori di transaminasi glutammico-ossalacetica (GOT) (P<0,10). I valori medii dell'Urea del latte (MUN) e del sangue (BUN) sono risultati significativamente più bassi (rispettivamente, P<0,01 e p<0,05) nelle pecore del gruppo LIN. Come suggerito da Nudda et al. (2013), la supplementazione di lino potrebbe aver aumentato l'efficienza di utilizzo dell'azoto. In ogni caso tutti i valori misurati rientrano nel range di riferimento per gli ovini da latte in Sardegna (Dimauro et al., 2008). In conclusione, l'impiego di 220 g/die di semi di lino nella dieta della pecora, non determina effetti sullo stato di salute degli animali.

Tabella 1 - Produzione e composizione del latte in pecore alimentate con diete a base di lino (LIN) o senza aggiunta di lino (CON).

Parametri	Dieta		s.e.m.[1]	Significatività *P*[2]		
	CON	LIN		D	S	D × S
Produzione (kg/d)	1,49	1,63	0,03	ns	**	ns
Grasso (g/kg)	5,95	6,08	0,07	ns	†	ns
Proteine (g/kg)	5,85	5,44	0,06	ns	**	ns
Lattosio	4,92	5,06	0,02	ns	**	ns
Log SCC	2,43	2,51	0,05	ns	**	ns
Caseina (g/100g)	4,56	4,23	0,04	ns	**	ns
MUN (mg/dl)	46,21[a]	36,74[b]	0,93	**	**	ns
Resa in grasso (g/d)	8,72	9,82	0,21	ns	*	ns
Resa in proteine (g/d)	8,62	8,76	0,17	ns	**	ns
Resa in Lattosio (g/d)	7,36	8,28	0,19	ns	**	ns
Resa in Caseina (g/d)	6,73	6,90	0,14	ns	**	ns

Tabella 2 - Parametri clinici e markers metabolici della funzione epatica e renale nel sangue di pecore da latte alimentate con diete a base di lino (LIN) o senza aggiunta di lino (CON).

Parametri	Dieta		s.e.m.[1]	Significatività *P*[2]		
	CON	LIN		D	S	D × S
Creatinina (mg/dl)	0,62	0.61	0,01	ns	ns	ns
Bilirubina (mg/dl)	0,20b	0,24a	0,01	†	ns	**
GOT/AST (U/l)	142,00	114,31	4,87	†	ns	ns
GPT/ALAT (U/l)	34,56	33,00	0,51	ns	**	ns
GGT (U/l)	77,81	73,53	2,57	ns	**	ns
ALP (U/l)	108,72	106,94	5,42	ns	**	ns
Albumina (g/dl)	2,56	2,51	0,02	ns	**	ns
Proteina (g/l)	7,17	7,20	0,05	ns	*	ns
BUN (mg/dl)	63,38a	56,78b	1,07	*	ns	ns

[1] s.e.m. = errore standard della media.
[2] D = effetto della dieta, S = effetto sperimentale del campionamento and D × S = effetto della interazione. Significatività: ¨*P* < 0,01; **P* < 0,05; † *P* < 0,10; ns = non significativo (*P* > 0,10). SCC = conta delle cellule somatiche. MUN= Milk Urea Nitrogen BUN= Blood Urea Nitrogen

Bibliografia

Dimauro C., Bonelli P., Nicolussi P., Rassu S. P. G., Cappio-Borlino A., Pulina G. (2008), Estimating clinical chemistry reference values based on an existing data set of unselected animals. Vet. J. 178 (2): 278-281.

Mele, M., Contarini G., Cercaci L., Serra A., Buccioni A., Povolo M., Conte G., Funaro A., Banni S., Lercker G., Secchiari P. (2011), Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with extruded linseed: Effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability. Int.Dairy J. 21: 365-372.

Nudda, A., Battacone G., Atzori A. S., Dimauro C., Rassu S. P., Nicolussi P., Bonelli P., Pulina G. (2013), Effect of extruded linseed supplementation on blood metabolic profile and milk performance of Saanen goats. Animal. 7: 1464-1471.

Petit HV, Palin MF, Doepel L. (2007), Hepatic lipid metabolism in transition dairy cows fed flaxseed. J. Dairy Sci. 90: 4780-4792.

Pulina G., Nudda A., Battacone G., Fancellu S., Francesconi AHD (2008), Nutrition and quality of goat's milk. In Dairy goats feeding and nutrition. (eds A Cannas and G Pulina), pp. 1-30. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Effect of extruded linseed supplementation on blood metabolic profile and milk performance of sarda sheep

Key words: sheep milk, extruded linseed, liver and kidney.

Diagnosi in vita di scrapie negli ovini: identificazione di nuovi biomarcatori mediante tecniche di proteomica

M. MAZZA[1], C. GUGLIELMETTI[1], F. MARTUCCI[1], M. PAGANO[1], S. CARRELLA[1], P. TROIANO[2], A. PETRELLA[2], P. MARCONI[3], F. PALMERINI[3], G. CANDIANO[4], A. SCALONI[5], C. D'AMBROSIO[5], P.L. ACUTIS[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle D'Aosta, S.C. Neuroscienze con annesso CEA, S.S Genetica ed Immunobiochimica, Torino
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia
[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana, Firenze
[4] Ospedale G. Gaslini, Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia, Genova
[5] ISPAAM-CNR, Napoli

Parole chiave: EST, scrapie, diagnosi in vita, fibrinogeno.

INTRODUZIONE - Il controllo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) risulta difficoltoso in quanto non è possibile effettuare una diagnosi in vita, strumento essenziale per l'attuazione di piani di eradicazione. Al fine di migliorare l'efficacia del controllo della scrapie negli ovini, si è tentato di isolare la proteina patologia Prp^{Sc} nel tessuto linfatico. Tuttavia questo approccio ha presentato difficoltà legate al prelievo del campione ed al fatto che la Prp^{Sc} in questa sede anatomica non è costantemente presente in tutti gli animali affetti da scrapie.
Nell'ambito del presente progetto si è cercato di fornire strumenti utili a superare i suddetti limiti del sistema di controllo concentrandosi sulla diagnostica in vita per la scrapie degli ovini. In particolare l'obiettivo è stato quello di indagare l'eventuale presenza di marcatori diagnostici indiretti nel sangue con l'applicazione di tecniche di proteomica.
MATERIALI E METODI - Sono stati prelevati campioni di sangue da ovini adulti di focolai di scrapie e, successivamente all'esito del test rapido per EST, sono stati selezionati:
10 campioni risultati positivi al test rapido e ai test di conferma e caratterizzati da un genotipo suscettibile;
10 campioni risultati negativi al test rapido e ai test di conferma, con genotipo resistente o semiresistente, appaiati con i positivi per razza, età, sesso, allevamento di origine, e rappresentanti il "gruppo di controllo".
Il plasma dei diversi animali è stato sottoposto ad elettroforesi bidimensionale (2DE) applicando diversi protocolli di estrazione delle proteine [Metodo standard; Aurum™ Serum Protein Kit (Bio-Rad); ProteoMiner™ Protein Enrichment Kit (Bio-Rad)]. Le immagini dei gel, ottenuti in triplicato da ogni campione, sono state analizzate con il software "BioNumerics® 2D Gel Types" (Applied Maths) per confrontare le mappe ottenute dai campioni scrapie positivi e negativi ed evidenziarne eventuali differenze in termini qualitativi e quantitativi. Le isoforme proteiche risultate significativamente sovra-espresse nei campioni affetti da scrapie sono state identificate con analisi di spettrometria di massa mediante nano-cromatografia in fase liquida (nanoLC) e successivamente ESI-LIT-MS/MS. Gli spettri sono stati acquisiti nella gamma *m/z* (massa/carica) compresa tra 400 e 2000. Gli spot sono stati identificati mediante software MASCOT® (Matrix Science UK).
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - L'elettroforesi bidimensionale eseguita sui campioni preparati con il ProteoMiner™ Protein Enrichment Kit (Bio-Rad) ha permesso di evidenziare, nel gruppo degli ovini affetti da scrapie, una sovra-espressione statisticamente significativa di due spot proteici caratterizzati da un punto isoelettrico (pI) compreso tra 6,5 e 7 ed un peso molecolare tra 65 e 70 kDa. Tali proteine sono state poi identificate, mediante spettrometria di massa, come due isoforme della catena β del fibrinogeno. Dai campioni preparati con gli altri metodi non sono state evidenziate differenze nel fenotipo proteico tra i due gruppi di animali, sani e affetti da scrapie.
Dallo studio emerge quindi che il fibrinogeno potrebbe rappresentare un marker indiretto per la diagnosi in vita di scrapie negli ovini. La sovra-espressione riscontrata negli animali affetti da scrapie è, con ampio margine di certezza, da imputare alla positività all'infezione, in quanto nel disegno dello studio sono stati eliminati confondenti quali età, razza, sesso, allevamento. È infatti noto che l'espressione proteica può variare in funzione dello stato fisiologico, della razza o delle differenze di gestione dell'animale, ma gli animali positivi studiati, seppur pochi dal punto di vista numerico, non erano accomunati da nessun fattore fisiologico, in quanto di età e razze diverse e provenienti da allevamenti diversi. Inoltre, i controlli sono stati appaiati 1:1 con i casi per le suddette caratteristiche, per cui un'eventuale influenza di queste sull'espressione proteica avrebbe impedito il riscontro di differenze significative tra il gruppo dei positivi e quello dei negativi. Essendo però il fibrinogeno un marker plasmatico appartenente al gruppo delle proteine della fase acuta, i suoi livelli possono variare in seguito a stimoli di varia natura (processi flogistici, patologici), pertanto ulteriori studi saranno necessari per valutare il suo specifico valore predittivo nei confronti della scrapie. Tuttavia è da notare che un aumento significativo dei livelli di fibrinogeno, unitamente a quello di altre proteine plasmatiche, è stato descritto anche in pazienti affetti da Creutzfeldt-Jakob sporadica [1] e alterazioni nell'espressione di proteine di fase acuta in ovini affetti da scrapie classica sono già riportate in letteratura [2].

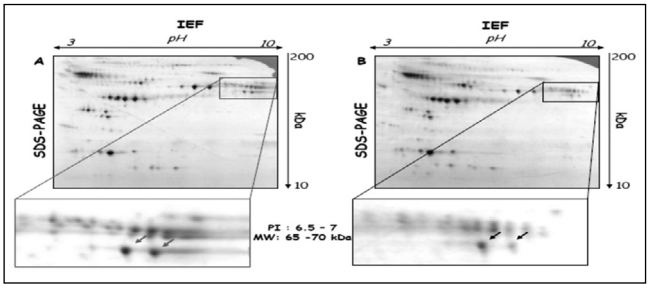


Figura 1 - Analisi 2DE rappresentativa dei campioni di plasma di ovini positivi (A) e negativi (B) per scrapie preparati con il Proteominer™ Protein Enrichment Kit (Bio-Rad).

Intra vitam diagnosis of scrapie in sheep: identification of novel biomarkers by a proteomic approach

Key words: TSE, scrapie, *intra vitam* diagnosis, fibrinogen.

Bibliografia

Fratini F., Principe S., Puopolo M., Ladogana A., Poleggi A., Piscopo P., Bruno G., Castrechini S., Pascone R., Confaloni A., Minghetti L., Cardone F., Pocchiari M., Crescenzi M. (2012), Increased levels of acute-phase inflammatory proteins in plasma of patients with sporadic CJD. Neurology 79(10): 1012-1018.

Meling S., Bårdsen K., Ulvund M.J. (2012), Presence of an acute phase response in sheep with clinical classical scrapie. BMC Vet Res. 8:113.

Identificazione del recettore della leptina nella cute di pecora e bovino tramite RT-PCR ed immunoistochimica

F. MERCATI[1], M. MARANESI[1], C. DALL'AGLIO[1], L. PASCUCCI[1], P. SCOCCO[2], C. BOITI[1], P. CECCARELLI[1]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia
[2] Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Camerino

Parole chiave: ObR, ruminanti, follicolo pilifero, RT-PCR.

INTRODUZIONE - La leptina (Ob) è un ormone secreto prevalentemente dal tessuto adiposo (Jane ková et al., 2001). Pur essendo conosciuto per il suo coinvolgimento nel metabolismo energetico, è ormai noto che esso esplica azioni differenti agendo a livello di numerosi tessuti ed organi attraverso l'attivazione di uno specifico recettore di membrana (Ob-R). Per quanto riguarda la cute, Ob è stato recentemente descritto da alcuni autori come uno dei principali attori implicati nei meccanismi fisiologici e patologici di questa struttura e dei suoi annessi (Poeggler et al., 2010). In particolare, è stato osservato che la sintesi locale di Ob aumenta in modo significativo in seguito ad una ferita cutanea stimolando la proliferazione dei cheratinociti. Ob, inoltre, stimola l'angiogenesi con un'azione diretta sulle cellule endoteliali e, complessivamente, svolge un ruolo funzionale critico nel processo di guarigione delle ferite con un meccanismo di tipo sia autocrino che paracrino. Ob e Ob-R sono stati identificati anche a livello del follicolo pilifero (FP) nell'uomo e negli animali da laboratorio (Hoggard et al. 1997; Iguchi et al. 2001), ed è stato ipotizzato un coinvolgimento di Ob nella morfogenesi del FP nonché nel controllo del ciclo follicolare (Poeggler et al., 2010). Non ci sono attualmente informazioni sull'azione di Ob nella cute degli animali domestici pertanto, in questo studio, è stata indagata la presenza di Ob-R nella cute di pecora e bovino per evidenziare le strutture potenzialmente reattive a questo ormone. In primo luogo è stata valutata la presenza dell'm-RNA attraverso RT-PCR e, successivamente, è stata eseguita un'indagine immunoistochimica per la localizzazione istologica del recettore.

MATERIALI E METODI - I campioni di cute sono stati prelevati da 5 ovini e 5 bovini sani durante la fase di macellazione. I campioni destinati alla immunoistochimica sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina. Da due soggetti per ciascuna specie è stato prelevato un campione, rapidamente immerso in azoto liquido, destinato alla RT-PCR.
Multiplex RT-PCR: 100 mg di tessuto sono stati omogeneizzati in trizol. L'RNA totale (5 µg) è stato sottoposto a retrotrascizione utilizzando la metodica dei random esameri. La sequenza dei primers utilizzati per la pecora è:
F-TGAAGCCTGATCCACCATT e
R-CAGATTCCTAGGCCATCCAA (n. accesso NCBI:
NM_001009763.1; 254 bp) e per il bovino:
F-CAATCACTTGCAGGAAGCAA e
R-TGACACAAGCTGGTGGAGAG (n. accesso NCBI:
NM_001012285.2; 226 bp).
I prodotti di PCR sono stati analizzati tramite elettroforesi in un gel di agarosio al 2% utilizzando come colorazione l'etidio bromuro. I prodotti amplificati sono stati purificati ed è stata confermata la loro identità tramite sequenziamento con il metodo di Sanger.
Immunoistochimica: le sezioni sono state sottoposte a smascheramento antigenico con forno a microonde ed inibizione delle perossidasi endogene con perossido di idrogeno. Dopo incubazione con un anticorpo policlonale di coniglio anti Ob-R (Sc-8325, SCB) e l'impiego di un anticorpo secondario biotinilato, la reazione è stata visualizzata tramite complesso avidina-biotina e rivelata con diaminobenzidina. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La tecnica di RT-PCR ha evidenziato la presenza del trascritto target Ob-R nella cute di pecora e bovino. L'analisi su gel di agarosio e successivamente il sequenziamento del prodotto di PCR, ha verificato la corrispondenza con l'esatto numero di paia di basi attese (254 bp Ob-R pecora; 226 bp Ob-R bovino).
Attraverso l'indagine immunoistochimica Ob-R è stato osservato nella pecora a livello di epidermide, FP, ghiandola sudoripara e ghiandola sebacea. Nel bovino, invece, il recettore era presente nel FP e nella ghiandola sebacea con un segnale più debole rispetto alla pecora.
A livello dell'epidermide la positività è stata evidenziata solo nello strato basale, lasciando supporre il coinvolgimento di Ob nel processo rigenerativo dell'epidermide.
Nel FP, la positività era presente nelle cellule della guaina esterna della radice durante tutte le fasi del ciclo follicolare. Tali cellule erano localizzate prevalentemente nella regione dell'istmo e nella regione soprabulbare. In queste regioni è localizzato il comparto staminale e le cellule direttamente coinvolte nel processo di crescita del FP. Tale localizzazione, pertanto, lascia supporre un coinvolgimento di Ob nei complessi meccanismi di controllo del ciclo follicolare, ipotesi già avanzata nell'uomo (Poeggler et al., 2010).
Infine, Ob-R è stato osservato nelle cellule della ghiandola sudoripara e nelle cellule dello strato basale della ghiandola sebacea, in prossimità del dotto escretore. Numerosi studi attestano il ruolo di Ob nella regolazione dell'attività ghiandolare in vari apparati ed organi ed è stato dimostrato che essa modula la secrezione del sebo nella ghiandola sebacea (Chen et al. 2002).
L'indagine eseguita ci consente di ipotizzare un coinvolgimento di Ob nella biologia della cute e delle sua appendici negli animali indagati. L'azione di Ob potrebbe tuttavia esplicarsi attraverso meccanismi differenti tra le varie specie animali come lasciano supporre le differenze di localizzazione ed espressione del suo recettore osservate nei campioni di pecora e di bovino.

Leptin receptor identification in the skin of sheep and cattle by means of RT-PCR and immunohistochemistry

Key words: ObR, ruminants, hair follicle,RT-PCR.

Bibliografia

Chen HC, Smith SJ, Tow B, Elias PM, Farese RV Jr. (2002), Leptin modulates the effects of acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase deficiency on murine fur and sebaceous glands. The Journal of Clinical Investigation 109 (2): 175-181.

Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. (1997), Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94(20):11073-11078.

Iguchi M, Aiba S, Yoshino Y, Tagami H. (2001), Human follicular papilla cells carry out nonadipose tissue production of leptin. Journal of Investigative Dermatology 117(6): 1349-1356.

Jane ková R. (2001), The Role of Leptin in Human Physiology and Pathophysiology. Physiological Research 50: 443-459.

Poeggeler B, Schulz C, Pappolla MA, Bodó E, Tiede S, Lehnert H, Paus R. (2010), Leptin and the skin: a new frontier. Experimental Dermatology 19(1):12-8.

Studio preliminare sulle endoparassitosi in allevamenti ovini che praticano l'alpeggio in un'area delle Alpi Marittime

L. MIDULLA[1], F. ARNAUDO[1], M. SANTANIELLO[2], M.E. MORGOGLIONE[2], I. GUARIGLIA[2], I. SARALE[1], L. RINALDI I[2,3] G. CRINGOLI[2,3], A. BOSCO[2]

[1] Agrilab Centallo (CN); [2] Unità di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Regione Campania
[3] Centro Interdipartimentale di Ricerca in Parassitologia - CIRPAR

Parole chiave: endoparassiti, ovini, alpeggio, FLOTAC.

INTRODUZIONE - Nelle aree montane la monticazione o alpeggio, consente agli animali al pascolo di avere a disposizione erbai freschi e condizioni climatiche favorevoli nei periodi estivi, oltre a rappresentare occasioni per la valorizzazione dei territori marginali ed il mantenimento di un ambiente fruibile nel tempo. La pratica dell'alpeggio nelle zone montane delle Alpi Marittime in provincia di Cuneo coinvolge la maggior parte degli allevamenti ovini. Considerata la stretta relazione parassita-ambiente soprattutto negli animali al pascolo, questo studio, del tutto preliminare, ha voluto monitorare il quadro parassitologico riferito ai più frequenti endoparassiti propri degli ovini, in un gruppo di allevamenti che pratica con regolarità l'alpeggio. Gli animali sono stati controllati prima dello spostamento ed al loro rientro, come fase iniziale per la definizione di opportuni protocolli di controllo.

MATERIALI E METODI - Lo studio ha riguardato la provincia di Cuneo e più precisamente le seguenti vallate delle Alpi Marittime: Stura, Gesso, Pesio, Ellero, Maudagna della Langa e della pianura fossanese. In queste zone, nel periodo che va da dicembre ad aprile, le greggi vengono tenute a stabulazione fissa, mentre da metà aprile gli animali praticano il pascolo a quote variabili dai 300 m fino ai 1700 mt sul livello del mare. Da giugno, invece, gli animali sono condotti in alpeggio su pascoli ad altitudini che partono dai 1300 mt e arrivano fino ai 3000 m sul livello del mare. La durata dell'alpeggio è condizionata dagli eventi climatici; alle prime nevicate, tra la fine di settembre e l'inizio di ottobre, le greggi vengono ricondotte a valle. Il laboratorio Agrilab di Centallo (Cuneo), in collaborazione con il Centro Regionale per il Monitoraggio delle Parassitosi della Regione Campania (CREMOPAR) nel corso del 2013 ha sottoposto a monitoraggio parassitologico 18 greggi che praticavano regolarmente l'alpeggio, indagando sui più importanti elminti e protozoi gastrointestinali, broncopolmonari ed epatici degli ovini. Le greggi sono state sottoposte a campionamento nei mesi di maggio-giugno (pre-alpeggio) e nei mesi di ottobre-novembre (post-alpeggio). I Medici Veterinari dell'Agrilab in ciascun gregge, tutti con oltre 50 capi, hanno prelevato campioni individuali di *copros* da 15 animali adulti e 5 rimonte spediti poi al CREMOPAR. In laboratorio i campioni sono stati analizzati con la *Flotac dual technique* (Cringoli *et al*., 2010) con una sensibilità analitica di 2 uova, larve e oocisti per grammo di feci (UPG, LPG e OPG) utilizzando due soluzioni flottanti, una a base di sodio cloruro, peso specifico = 1.200 ed una a base di zinco solfato, peso specifico = 1.350. Per la diagnosi di genere dei nematodi del gruppo degli strongili gastrointestinali sono state allestite coprocolture, identificando poi le larve, utilizzando le chiavi morfologiche di Van Wyk *et al.* (2004).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - i generi e/o i gruppi di parassitari emersi nel corso dello studio nonché i relativi valori di UPG, LPG e OPG sono riassunti nella tabella 1.

Per gli strongili gastrointestinali, le coprocolture hanno evidenziato la presenza dei seguenti generi e i rispettivi valori di prevalenza nel pre e post alpeggio: *Teladorsagia* (96%-100%), *Trichostrongylus* (92%-95%), *Haemonchus* (56%-71%), *Cooperia* (10%-12%), *Bunostomum* (8%-19%) ed *Oesophagostomum*/*Chabertia* (64%-86%).

I pascoli in alpeggio che ospitano le greggi sono aree che annualmente vedono la presenza degli stessi allevamenti dove è frequente anche una certa promiscuità con animali selvatici, in particolare caprioli, camosci e cervi. Inoltre gli animali nel pre-alpeggio stanno sui prati delle vallate dopo la stabulazione invernale per diverse settimane, ad altitudine variante dai 600 m ai 1600 m s.l.m.

Tabella 1 - Quadro parassitologico nei 18 allevamenti ovini nel pre e post-alpeggio.

Generi e/o gruppi di parassiti	PRE-ALPEGGIO		POST-ALPEGGIO	
	Prevalenze (%)	Media (UPG, LPG, OPG)	Prevalenze (%)	Media (UPG, LPG, OPG)
Eimeria	100	417	100.6	122
Strongili gastrointestinali	78,8	153	100	353
Nematodirus	24,2	21	58,6	28
Trichuris	24,2	18	58,6	33
Strongyloides	3,0	1	13,8	12
Strongili broncopolmonari	30,3	20	48,3	38
Dicrocoelium	33,3	36	62,1	62
Moniezia	15,2	Positivo	51,7	positivo

La studio ha evidenziato un ampio e diffuso poliparassitismo ed i generi/gruppi di parassiti sono gli stessi che interessano la maggior parte delle greggi dell'area del mediterraneo. Da rimarcare l'aumento delle prevalenza e dei valori di uova e larve per grammo feci per tutti gli elminti nella fase post-alpeggio. Solo per i coccidi del genere *Eimeria* sono stati registrati valori di OPG più alti nel pre-alpeggio, dovuto sicuramente alla stabulazione invernale, condizione ideale per la diffusione del parassita. L'aumento dei valori di prevalenza e di eliminazione delle uova/larve dei diversi generi/gruppi di elminti nel periodo post-alpeggio necessitano di ulteriori indagini per individuare se questi incrementi sono dovuti: 1) alla presenza di forme infesti sui pascoli in alpeggio, conseguenti ai precedenti pascolamenti, visto che in questa stagione la temperatura e l'umidità in alta quota creano le condizioni favorevoli per lo sviluppo degli elementi infestanti e la loro dispersione sui pascoli; 2) alla promiscuità dei pascoli con gli animali selvatici, per alcuni generi di elminti; 3) o se questi incrementi conseguono a infezioni acquisite nel periodo di pascolamento sui prati delle vallate dopo la stabulazione invernale, evidenziati poi nel post- alpeggio. Vanno inoltre approfonditi gli studi sulla identificazione delle specie dei vari elminti e protozoi presenti in queste greggi il tutto per poter meglio disegnare strategia di intervento per il controllo parassitologico in questo territorio finalizzato a migliorare le condizioni del benessere animale, a incrementare la qualità e la quantità delle produzioni ed a garantire la sicurezza del consumatore e la salvaguardia dell'ambiente.

Preliminary evaluation of "mountain pasture effect" on endoparasitoses in sheep of the Maritime Alps

Key words: parasites, sheep/goats, mountain pasture, FLOTAC

Bibliografia

Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J. (2010), Nat Protoc., 5(3): 503-15.

van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M. (2004), Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. Vet. Parasitol. 119, 277-306.

Sarcoma alla base del corno e polipi endonasali in una capra: possibile correlazione?

S.A. MIGNACCA[1] , B. AMATO[1] , S. AGNELLO[1], M. FIASCONARO[1] , R. PULEIO[1], A. LENA[2], E. BIASIBETTI[3], M.T. CAPUCCHIO[3], V. DI MARCO LO PRESTI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Area Barcellona P.G. (ME)
[2] ARAS Sicilia
[3] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (Torino)

Parole chiave: capra, sarcoma, polipi nasali.

INTRODUZIONE - Le neoplasie cutanee sono relativamente frequenti negli ovini ma raramente vengono diagnosticate e documentate nella specie caprina. Bildfell *et al.* (2002) ne descrive 8 casi in 5 anni di attività clinica. Ahmed e Hassanein, (2012) riferiscono di 15 casi su un totale di 104 neoplasie cutanee ed oculari in piccoli ruminanti. Eccezionali sono i riscontri di sarcomi. D'altro canto scarse sono anche le segnalazioni riguardanti forme neoplastiche localizzate in sedi extracutanee. Le neoformazioni delle cavità nasali degli ovini e dei caprini sono sporadicamente riportate in letteratura (Rings e Roiko, 1985; Lacasta *et al.*, 2012). In un recente lavoro, Rocha *et al.* (2012) descrive 4 casi di polipi endonasali in ovini. Le cause eziopatogenetiche responsabili della formazione di quest'ultimi sono da ricondurre perlopiù a stimoli flogistici cronici di possibile origine virale, batterica o parassitaria. Gli autori riportano una proliferazione di origine neoplastica localizzata alla base del corno sinistro e polipi endonasali multipli in una capra di razza Girgentana di 7 anni di età.

MATERIALI E METODI - Il presente caso riguarda una capra di circa 7 anni di età, di razza Girgentana, proveniente da un allevamento a stabulazione fissa della provincia di Agrigento. Ad un accurato esame clinico, l'animale si presentava in buono stato di nutrizione e l'esame particolare dell'apparato respiratorio non rilevava dispnea od altre anomalie respiratorie. Tuttavia, si osservava la presenza di una neoformazione localizzata alla base del corno sinistro. Considerate le condizioni di scarso benessere dell'animale, si decideva per l'eutanasia. Dopo l'esame macroscopico porzioni di tessuto neoplastico sono state fissate in formalina tamponata al 10% e processate routinariamente per l'esame istologico.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Macroscopicamente la lesione, di alcuni cm di diametro, si presentava di forma rotondeggiante e di colore rosso-nerastro. La maggior parte della base del corno in prossimità della stessa si mostrava erosa e complicata da miasi. Al taglio mostrava una struttura uniforme, compatta, consistenza soda e colore biancastro con aree opache scure nella porzione centrale. All'apertura della scatola cranica si osservavano assottigliamento e necrosi di alcune porzioni dei seni frontali con moderata raccolta di essudato purulento. Lo stesso animale mostrava numerosi polipi endonasali, sessili o peduncolati, di 1-2 centimetri di diametro localizzati principalmente nei seni frontali di sinistra.

L'esame istologico classificava la neoformazione alla base del corno come un sarcoma spiccatamente anaplastico con ampie aree necrotiche. Inoltre, confermava la natura polipoide delle neoformazioni nasali le quali apparivano sovrastate da epitelio semplice colonnare con numerose cellule caliciformi mucipare. L'architettura era rappresentata da cellule fusiformi lasse immerse in abbondante matrice amorfa mesenchimale. Venivano inoltre osservati vasi neoformati e infiltrato linfocitario e plasmacellulare sub epiteliale. Nessuna lesione macroscopica ed istologica veniva osservata in altri organi.

Gli autori non escludono una possibile correlazione tra le due lesioni.

Sarcoma at the base of horn and nasal polyps in a goat: possible correlation?

Key words: goat, sarcoma, nasal polyps

Bibliografia

Ahmed A., F., Hassanein, K.M.A. 2012, Ovine and caprine cutaneous and ocular neoplasms. Small Ruminant Res. 106: 189-200.

Bildfell R.J., Valentine B.A., Whitney K.M. 2002, Cutaneous Vasoproliferative Lesions in Goats. Vet Pathol 39 :273

Diglio Clement A., Hare William C.D., Dodd David C., et all. 1975, Cytogenetic, Cytological and Virological Characteristics of a bovine fibrosarcoma. Cancer Res; 35:3628-3635

Goldschmidt M.H. and Hendrick M.J. 2002, Tumors of the skin and soft tissues. In: Tumors in domestic animals, ed. Moulton JE, Press Berkeley, Los Angeles-London, USA-UK.

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, Chronic Proliferative Rhinitis associated with Salmonella enterica subspecies diarizonae serovar 61:k:1, 5, (7) in Sheep in Spain. J Comp Pathol. 147, 406-409.

Mignacca S.A, Biasibetti E., Rocha P.R.D, Guarneri G., Tasca D., Spuria L., Artale F., Capucchio M.T. 2012, Tre casi di melanomi in piccoli ruminanti: reperti anatomo-istopatologici. Atti XX Congresso SIPAOC

Rings, D.M., Rojko, J. 1985. Naturally occurring nasal obstructions in 11 sheep. Cornell Vet. 75, 269-76.

Rocha P.R.D., Mignacca S.A., Biasibetti E., Milone S., Fiasconaro M, Aronica V., Di Marco Lo Presti V., Capucchio M.T. 2012, Neoformazioni delle cavità nasali negli ovini: sintomi clinici e reperti anatomo-istopatologici. Atti XX Congresso SIPAOC.

Sartin EA, Hudson JA, Herrera GA, Scheer AM and Wolfe DF. 1996, Invasive fibrosarcoma of the horn base in a cow. Journal of the American Veterinary Medical Association 208:1709-1710.

Wilson D.W., Dungworth D.L. 2002, Tumors of the respiratory tracts. In: Tumors in domestic animals, ed. Moulton JE, Press Berkeley, Los Angeles-London, USA-UK.

Vestigia uracali nei piccoli ruminanti: indagine al mattatoio

S.A. MIGNACCA, M.T. CAPUCCHIO[1], B. AMATO, E. BIASIBETTI[1], M. RUSSO, G. NIOSI, L. SPURIA, M. VITALE, V. DI MARCO LO PRESTI, F. GUARDA[1]

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Area Barcellona P.G. (ME)
[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie - Università degli Studi di Torino

Parole chiave: vestigia, uraco, piccoli ruminanti.

INTRODUZIONE - L'uraco è un organo di aspetto tubulare che mette in comunicazione, durante la gestazione, la vescica del feto con l'allantoide. Dopo la nascita subisce una progressiva atrofizzazione residuando sotto forma di legamento vescico-ombelicale. Le vestigia uracali costituiscono e comprendono una serie di alterazioni legate a questo particolare organo che, quando presenti, favorirebbero lo sviluppo di infezioni batteriche del tratto genito-urinario. Tra queste, la malformazione più comune ad esso correlata è la sua mancata chiusura che si traduce nel cosiddetto uraco pervio o fistola vescico-ombelicale. Si tratta di anomalie che si repertano più comunemente nella specie equina, ma anche in cani, bovini e suini.
I casi descritti in letteratura negli ovicaprini sono piuttosto rari. Scopo del presente lavoro, a completamento di un'indagine precedentemente svolta (Capucchio *et al*., 2012) è quello di riportare l'incidenza di tali alterazioni congenite in queste specie e descriverne le caratteristiche macroscopiche ed istologiche.
MATERIALI E METODI - Gli autori riportano l'incidenza,e le caratteristiche macroscopiche ed istologiche di vestigia uracali riscontrate in ovini e caprini regolarmente macellati o deceduti per cause non correlate a patologie vescicali.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - In totale sono state esaminate 986 vesciche. In 47 (5%) animali sono state rilevate macroscopicamente delle formazioni simil-nodulari di differente dimensioni (34 lesioni della grandezza di circa 3-5mm e 13 lesioni della grandezza di circa 9-11 mm), di consistenza sodo-elastica e di colore chiaro addossate all'apice della vescica (Fig. 1). In 1 caso si osservava una cisti della grandezza di un pisello repleta di liquido torbido.
In 2 casi si riscontravano, inoltre, un diverticolo comunicante con il lume vescicale, di piccolo diametro e della lunghezza di circa 5mm. Istologicamente sezioni trasversali condotte a livello dell'apice vescicale evidenziano nello spessore della parete muscolare un numero variabile di formazioni cistiche delimitate da epitelio transizionale talora iperplasico-metaplasico irregolare circondate da abbondante tessuto connettivo. Il lume di alcune formazioni si presentava repleto di materiale amorfo eosinofilo (Fig. 2).
Tale descrizione è compatibile con le neoformazioni acquisite cave e sacciformi quali diverticoli o cisti precedentemente descritte. Quando presenti quest'ultime favoriscono, nei soggetti adulti e nei casi gravi, forme di calcolosi od infezioni ricorrenti spesso incurabili se non chirurgicamente. In seguito alle alte prevalenze riscontrate gli autori concludono che tale complesso di malformazioni sia sottostimato rispetto alla sua reale diffusione nella specie ovina e caprina.

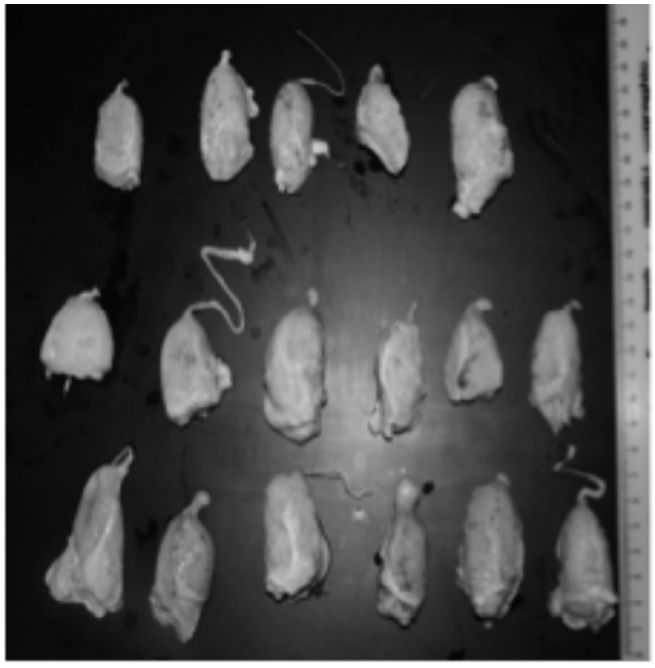


Figura 1

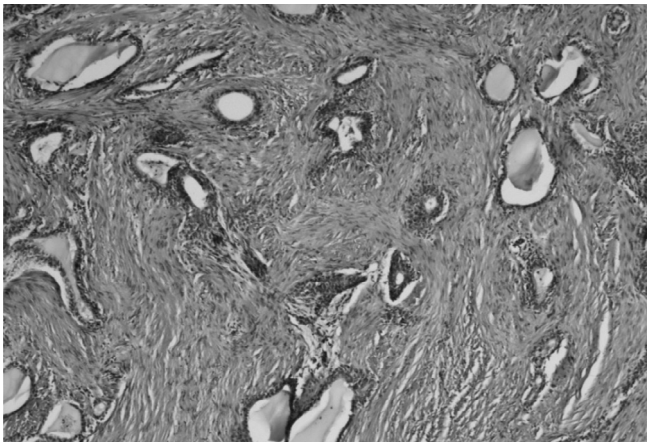


Figura 2

▮ Vestigial of urachus in small ruminant: an abattoir survey

Key words: vestigial, urachus, small ruminant.

Bibliografia

Capucchio MT., E. Biasibetti, P.R.D. Rocha, L. Strada, S.A. Mignacca, V. Di Marco Lo Presti (2012), Reperti anatomo-istopatologici associati a vestigia dell'uraco. Atti Congresso XX SIPAOC.
Dean, P.W. & Robertson, J.T. (1988), Urachal remnant as a cause of pollakiuria and dysuria in a filly. Journal of the American Veterinary Medical Association 192, 375-376
Greene, R.W. & Bohning, R.H. (1971), Patent persistent urachus associated with urolithiasis in a cat. Journal of the American Veterinary Medical Association 158, 489-491
Hansen, J.S. (1972) Patent urachus in a cat. Veterinary Medicine: Small Animal Clinician 67, 379-381.
Korobkin, M., Cambier, L. & Drake, J., (1988), Computer tomography of urachal carcinoma. Journal of Computer Assisted Tomography, 12, 981-987.
Laverty PH, Salisbury SK. (2002), Surgical management of true patent urachus in a cat. Journal of Small Animal Prac (43): 227-229.
Marcato Paolo Stefano (2002), Patologia veterinaria sistematica. Edagricole.
Yeruham I. (2002), Urachal diverticulum in a kid. Vet Rec. 16;150(11): 353.

Integrazione alimentare con estratto polifenolico da acque di vegetazione nella pecora da latte: effetto sulle performance produttive e stato ossidativo del siero, risultati preliminari

L. MOSCATI[1], M. PAUSELLI[2], V. ROSCINI[2], G. CONTE[3], S. URBANI[2], A. BUCCIONI[4], A. CAPPUCCI[3], M. MELE[3]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche; [2] Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali - Unità di Ricerca di Scienze Zootecniche - Università degli Studi di Perugia; [3] Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali - Università degli Studi di Pisa; [4] Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agro-alimentari e dell'Ambiente - Università degli Studi di Firenze

Parole chiave: pecore da latte, performance produttive, stato ossidativo.

INTRODUZIONE - Il sistema di estrazione dell'olio di oliva più diffuso in Italia, prevede l'aggiunta di una quantità di acqua tale da comportare una produzione di circa 50-90 l di acque di vegetazione (AV)/100 kg di olive, producendo un'emulsione composta di olio, mucillagini e pectina. Tale AV contiene dal 3 al 16% di composti organici costituiti dall'1-8% di zuccheri, 1,2-2,4% di composti azotati e 0,34-1,13% di sostanze fenoliche con un potenziale inquinante espresso come domanda biochimica di ossigeno (BOD_5) che va da 35 a 110 g/l, ed una domanda chimica di ossigeno (COD) che va da 40 a 196 g/l (Niaounakis e Halvadakis, 2004). Uno dei metodi volti a ridurre il carico inquinante delle AV prevede la separazione delle sostanze polifenoli mediante l'impiego di membrane filtranti, previo trattamento enzimatico con enzimi depolimerizzanti. Da tale trattamento si ottiene un concentrato con una presenza di polifenoli quattro volte superiore a quella iniziale, i più rappresentati sono il 3,4-DHPEA-EDA ed il verbascoside, mentre le acque reflue hanno livelli di BOD e COD inferiori del 70-80% rispetto a quelli originari. L'attività antiossidante dei derivati dei secoridoidi quali 3,4-DHPEA, 3-4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA, risulta essere superiore a quella del p-HPEA e α-tocoferolo (Baldioli et al., 1996), giustificandone l'impiego quali integratori ad elevata attività antiossidante in diete arricchite con fonti di PUFA-n3.

Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'effetto dell'integrazione alimentare con concentrato polifenolico da AV in diete arricchite con una fonte di n-3 quale il seme di lino su alcuni parametri produttivi, di qualità del latte e indicatori dello stress ossidativo in pecore da latte a metà lattazione.

MATERIALI E METODI - Per la prova sono state impiegate 10 pecore pluripare di razza Comisana. Gli animali, a 130±5 d dal parto sono stati suddivisi in due gruppi alimentari ed alloggiati in box multipli. Le pecore sono state alimentate con fieno di medica somministrato ad libitum e 800 g di concentrato sperimentale avente il 25,6% di lino laminato quale fonte di PUFA n-3 (Controllo, C) al quale era aggiunto concentrato fenolico da AV (CF) la cui composizione fenolica era di 3,7 g/l di DHPEA, 0,5 g/l *h*-PEA, 3,1 g/l verbascoside, 7,9 g/l di DHPEA-EDA aggiunto in misura tale da garantire un apporto di 1,5 g di polifenoli/kg di mangime sperimentale. Dopo 14 d di adattamento alle diete sperimentali, si è provveduto a verificare settimanalmente il livello produttivo e ad effettuare campioni di latte per la determinazione dei principali parametri qualitativi quali grasso, proteine, lattosio mediante Milkoscan 6000 e cellule somatiche mediante Fossomatic 5000. Sono stati prelevati campioni di sangue, il siero ottenuto tramite centrifugazione mediante è stato conservato a -80 °C fino alla determinazione dei metaboliti reattivi all'ossigeno (ROM's) mediante kit commerciali (Diacron, Italia). I dati sono stati elaborati mediante un modello misto che teneva conto dell'effetto del trattamento alimentare, del prelievo, della loro interazione e dell'effetto random dovuto alla pecora.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - I risultati (Tabella 1) non hanno messo in evidenza differenze statisticamente significative dovute all'integrazione alimentare per quanto riguarda la produzione di latte ed il contenuto in grasso, proteine e lattosio. Differenze (P<0,01) si sono registrate relativamente al numero di cellule somatiche espresse come LS e più elevate nel gruppo trattato sebbene riconducibili a valori poco superiori a 200.000/ml. Minore (P<0,05) è risultato il livello di ROMs nel siero degli animali trattati con concentrato polifenolico con una riduzione del 10,2%: tale risultato sembra essere in accordo con quanto osservato da Casamassima et al. (2012) i quali hanno osservato come l'integrazione alimentare con 10 mg/capo/d di verbascoside nella fase peripartale riduca il livello di ROMs nel siero degli animali trattati. Non abbiamo rilevato differenze statisticamente significative sui parametri qualitativi del latte mentre la produzione lattea è risultata essere superiore. La riduzione dei ROMs potrebbe essere attribuita sia a un'azione diretta di "scavenger" sui radicali liberi durante la propagazione delle reazioni di ossidazione, sia al blocco della fase iniziale dell'ossidazione attraverso l'inibizione degli enzimi pro-ossidanti responsabili della produzione di radicali liberi andando a formare legami idrogeno intramolecolari fra i gruppi idrossilici e i radicali fenossilici (Visioli e Galli, 1998).

L'integrazione alimentare con concentrato polifenolico da acque di vegetazione di diete per pecore da latte, sebbene da verificare ulteriormente, sembra confermarne una certa attività antiossidante suggerendo un suo possibile impiego quale integratore mangimistico.

Tabella 1 - Effetto dell'integrazione con estratto polifenolico da acque di vegetazione sulle performance produttive e stato ossidativo del siero.

Parametro		Trattamento alimentare		ES
		C	CF	
Produzione	g/d	697	631	85
Grasso	%	7,86	8,05	0,44
Proteine	%	4,49	4,32	0,12
Lattosio	%	6,45	6,18	0,21
Parametri cellulari				
LS*		2,97B	4,48A	0,31
Parametri ematici				
ROMs	mMoli/l	3,04a	2,73b	0,50

A, B: P<0,01; a, b: P<0,05 - * LS: Log_2(SCC/12.500).

Effect of dietary supplementation with olive mill wastewater extract in dairy ewes: effect of milk yield and quality and serum oxidative status, preliminary results

Key words: ewes, oxidative status, PUFA, Olive mill wastewaters.

Bibliografia

Baldioli M., Servili M., Perretti G., Montedoro G.F., (1996), J. Am. Oil Chem. Soc. 73:1589. Casamassima D., Palazzo M., Martemucci G., Vizzarri F., Corino C. (2012), Small Ruminant Research 1058.

Niaounakis, M., Halvadakis C.P. (2004), Olive-mill waste management. Literature review and patent survey. Atene: Typothito-George Dardanos..

Visioli F., Galli C. (1998), Nutrition Reviews 56:142-147.

Analisi genomica di 14 razze caprine italiane

L. NICOLOSO[1], F. PILLA[2], P. CREPALDI[1] E ITALIAN GOAT CONSORTIUM

[1] Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie e sanità pubblica, Milano, Italia
[2] Università degli Studi del Molise, Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Campobasso, Italia

Parole chiave: SNP, capra *hircus,* variabilità genetica.

INTRODUZIONE - *L'Italian Goat Consortium* (IGC) è stato costituito nell'ambito del progetto Innovagen per raggruppare Università e Centri di Ricerca Italiani (www.goatit.eu) allo scopo di analizzare il patrimonio genetico caprino Italiano. L'Italia conta 40 popolazioni caprine (www.assonapa.it) con Libri Genealogici o Registri Anagrafici. Tra i 176 interventi regionali di tutela intrapresi in Italia sulle specie d'interesse zootecnico (Council Regulation 1257/99 nel Commission Regulation 817/2004) il 16% riguarda la specie caprina, per un totale di 25 diverse popolazioni (Panella et al., 2011).
Nell'ambito dell'IGC si è condotta una ricerca volta a caratterizzare con i nuovi strumenti genomici 14 razze caprine allevate in Italia. È stato utilizzato il 50K *Goat SNP Chip* (Tosser-Klopp et al., 2014), un *chip* a media densità sviluppato recentemente *dall'International Goat Genome Consortium*. Fra le razze analizzate, 8 hanno goduto degli interventi di salvaguardia sopra descritti.
MATERIALI E METODI - L'analisi è stata svolta su un campione di 354 esemplari appartenenti alle seguenti razze (Fig. 1): Bionda dell'Adamello (BIO, n.24), Camosciata delle Alpi (CAM, n.30), Orobica (ORO, n.23), Saanen (SAA, n.24), Valpassiria (VPS, n.24), Valdostana (VAL, n.24), Ciociara Grigia (GCI, n.19), Dell'Aspromonte (ASP, n.24), Nicastrese (NIC, n. 24), Girgentana (GIR, n.24), Argentata dell'Etna (ARG, n.24), Sarda (SAR, n.32), Di Teramo (TER, n.23), Maltese campionata in Sicilia (MAL, n.16) e in Sardegna (SAM, n.15).
Il DNA genomico è stato inviato al Laboratorio Genetica e Servizi (LGS) per la genotipizzazione con il 50K *Goat SNP Chip*.
I dati di genotipizzazione ottenuti sono stati sottoposti a *editing*, con il *software* PLINK (Purcell et al. 2007). Sono stati esclusi i marcatori con caratteristiche qualitative insufficienti secondo i seguenti criteri: frequenza dell'allele minore (MAF) inferiore all'1%; genotipo mancante in un numero di esemplari superiore al 5% e animali con una percentuale di dati mancanti superiore al 5%. I dati molecolari sono stati sottoposti all'analisi delle componenti principali con il programma Adegenet 1.3-9 package (Jombart, 2008).
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La fase di editing ha portato all'esclusione di 2211 marcatori e di 4 animali.
Sul datas*et* costituito da 51136 SNP e 350 animali sono state condotte le analisi di genetica di popolazione.
Il chip ha dimostrato di essere altamente informativo per la caratterizzazione delle razze analizzate, con una percentuale di marcatori polimorfici per razza compresa tra il 95,13% e il 99,70% e un numero di SNP con MAF superiore allo 0,05 molto alta (Fig. 1).

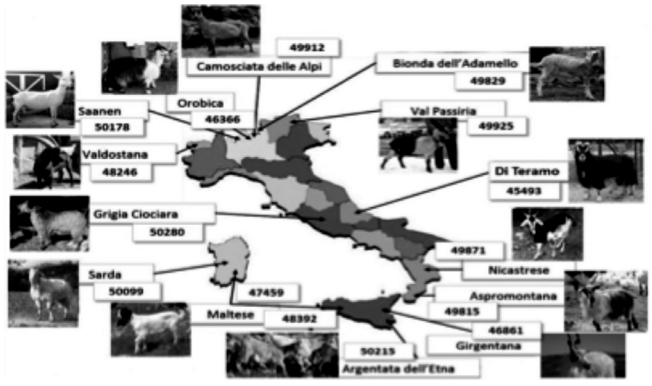


Figura 1 - Numero di SNP con MAF>0.05 nelle razze studiate.

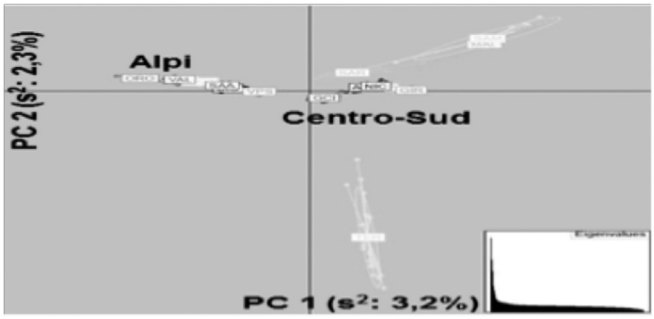


Figura 2 - Rappresentazione grafica della localizzazione delle razze sulle prime due componenti principali.

Dall'analisi delle componenti principali si evidenzia un *pattern* geografico ed un livello variabile di *admixture* genetica. Si evidenzia inoltre l'originalità genetica di alcune razze, quali la Valpassiria, l'Orobica, la Maltese, la Di Teramo, la Girgentana e la Sarda (Fig. 2).
L'analisi con pannelli di SNP a media densità può quindi essere utilizzata per analizzare e caratterizzare la struttura genetica delle 40 razze caprine attualmente riconosciute e per eventuali nuove razze che intendono richiedere l'attivazione di un registro anagrafico. Vista la rilevante importanza della specie caprina nella valorizzazione di aree marginali e nello sviluppo economico dei prodotti locali, si ritiene che progetti di valorizzazione della biodiversità italiana possano dare nuovo impulso a questo settore.
****Italian Goat Consortium***: P. Crepaldi (coordinatrice), L. Nicoloso, B. Coizet, S. Frattini e G. Pagnacco (Università degli Studi di Milano); F. Pilla e M.S. D'Andrea (Università degli Studi del Molise, Campobasso); P. Ajmone-Marsan, L. Bomba, M. Milanesi, L. Colli e N. Bacciu (Università Cattolica del S. Cuore, Piacenza), R. Negrini e R. Mazza (Associazione Italiana Allevatori), S. Murru (Associazione Nazionale della Pastorizia); S. Chessa e B. Castiglioni (Consiglio Nazionale delle Ricerche); A. Carta, T. Sechi, S. Sechi, G. Usai, S. Casu, S. Miari e S. Solaris (AGRIS Sardegna); G. Ptak, L. Loi, M. Czernik, F. Zacchini, P. Toschi, A. Fidanza, D. Iuso, S. Sampino, D.A. Anzalone e B. Ilaria (Università degli Studi di Teramo); D. Marletta, S. Bordonaro e A. Criscione (Università degli Studi di Catania); A. Valentini, S. Bongiorni, F. Gabbianelli, M. Gargani, F. Iacoponi e C. Gruber (Università degli Studi della Tuscia, Viterbo).

Ringraziamenti: Il lavoro è stato possibile grazie ai finanziamenti del progetto INNOVAGEN (MIPAAF).

Genomic analysis of 14 italian goat breeds

Key words: SNP, capra *hircus,* genetic variability.

Bibliografia

Jombart T. (2008), Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 2008, 24(11):1403-1405.
Panella et al. (2011), Interventi regionali a favore delle razze autoctone italiane minacciate, Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche Brescia,84:161 - 178.
Purcell S., et al. (2007), PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. American Journal of Human Genetics, 81.
Tosser-Klopp G., et al. (2014), Design and Characterization of a 52K SNP Chip for Goats. Plos One, 9(1): e86227.

Profilo acidico del colostro di pecore di razza Sarda alimentate con lino estruso

M. ORRÙ, R. BRANCIARI, C. FORTE, G. ACUTI, L. MUGHETTI, G. COBELLIS, M. TRABALZA-MARINUCCI

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

Parole chiave: lino estruso, ovini, colostro, acidi grassi.

INTRODUZIONE - Elevate concentrazioni di acidi grassi della serie n-3 sono considerate benefiche per la salute dell'uomo e risultano essenziali per tutti i mammiferi, in particolare per il feto ed il neonato (Barcelò-Coblijin e Murphy, 2009). L'inserimento nella dieta dei ruminanti di fonti di acidi grassi (AG) polinsaturi a lunga catena (alghe, olio di pesce) ha prodotto risultati incoraggianti sia per quanto riguarda il latte che per il colostro (Cattaneo et al., 2006; Kitessa et al., 2003; Or-Rashid et al., 2010). Persistono tuttavia preoccupazioni riguardo l'utilizzo di sottoprodotti dell'industria ittica nella dieta di ruminanti. Un'ottima alternativa può essere rappresentata da materie prime vegetali, come i semi di oleaginose ricchi di AG della serie n-3. La somministrazione di diete integrate con livelli appropriati di semi di lino si è rivelata in grado di modificare le caratteristiche compositive del latte e del formaggio ovino, in riferimento soprattutto al contenuto di AG polinsaturi, ed in particolare di isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA) e di AG della serie n-3 (Branciari et al., 2012; Mughetti et al., 2012). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare le modificazioni del profilo acidico del colostro di pecore alimentate con differenti livelli di lino estruso.

MATERIALI E METODI - La prova si è svolta presso l'Azienda Zootecnica Didattica del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Perugia. Sono state impiegate 60 pecore di razza Sarda suddivise in tre gruppi di 20 animali ciascuno. L'alimentazione, basata sulla somministrazione di fieno polifita, è stata integrata con tre mangimi pellettati diversi: un mangime "controllo" privo di lino (CTR) e due mangimi sperimentali, "LE10" e "LE20", contenenti rispettivamente il 10% e il 20% di lino estruso. Le diete, formulate per risultare isoenergetiche ed isoproteiche, sono state somministrate a partire da 20 giorni prima del parto fino al termine della gravidanza. Il prelievo del colostro è avvenuto nelle ore immediatamente successive al parto.

La composizione acidica del colostro è stata determinata per via gascromatografica sulla frazione lipidica sottoposta a metilazione, secondo il metodo descritto da Folch et al. (1957). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza secondo la procedura GLM del SAS (2010, Cary, NC, USA) utilizzando la dieta come fattore fisso.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Il profilo acidico del colostro è risultato modificato dalla dieta (Tabella 1). In particolare, la componente acidica a media catena si è ridotta ($P<0.05$) e quella a lunga catena è aumentata ($P<0.05$) nei gruppi LE-10 e LE-20 in relazione al livello di integrazione di lino. Tali risultati vengono confermati anche dall'analisi delle singole componenti acidiche; nello specifico, l'acido vaccenico (C18:1 t11) ed il principale isomero CLA C18:2 c9t11 sono aumentati ($P<0.05$) in tutti i gruppi che ricevevano lino. Inoltre, sia la somma degli AG n-3 che il rapporto n-6/n-3 risultano influenzati in maniera significativa dalla dieta. Gli AG polinsaturi a lunga catena sono essenziali per il corretto sviluppo del sistema nervoso del neonato e possono garantire un vigore maggiore della prole (Barcelò-Coblijin e Murphy, 2009). L'assunzione da parte degli agnelli di un colostro più ricco in acidi grassi della serie n-3, e di un rapporto n6/n3 più equilibrato, risulta essere correlata con un maggior livello di benessere della prole (Or-Rashid et al., 2010). I risultati di questo studio dimostrano che i semi di lino estruso possono rappresentare un'opportunità (anche in alternativa alle fonti di AG polinsaturi di origine marina) per il miglioramento della qualità acidica del colostro e per garantire una maggiore assunzione di AG essenziali da parte della prole.

Tabella 1 - Profilo acidico del colostro ottenuto dai 3 gruppi sperimentali.

Acidi grassi	CTR	LE-10	LE-20	ES	P
SCFA[a]	2,394	2,640	2,422	0,321	0,516
MCFA[b]	40,742^{A}	37,418^{AB}	35,586^{B}	1,323	0,043
LCFA[c]	56,305^{B}	59,943^{AB}	61,992^{A}	1,414	0,037
C18:0	7,398^{B}	8,989^{AB}	10,252^{A}	0,570	0,010
C18:1 t11	0,760^{B}	0,820^{B}	0,532^{A}	0,178	0,013
C18:1 c9	39,767	42,134	42,025	1,697	0,550
C18:2	3,649	3,440	3,296	0,135	0,212
C18:2 c9t11	1,044^{B}	1,122^{AB}	1,372^{A}	0,089	0,048
C18:3 n3	0,992^{B}	1,158^{AB}	1,386^{A}	0,094	0,031
C20:5 n3	0,015	0,034	0,035	0,009	0,256
C22:5 n3	0,278	0,283	0,287	0,020	0,962
C22:6 n3	0,102	0,116	0,129	0,008	0,117
SFA[d]	49,648	47,417	46,492	1,634	0,396
MUFA[e]	43,780	45,910	46,490	1,667	0,497
PUFA[f]	6,572	6,672	7,018	0,222	0,345
n-3 PUFA	1,462^{B}	1,689 ^{AB}	1,928^{A}	0,117	0,041
n-6 PUFA	4,045	3,828	3,691	0,136	0,212
n-6/n-3	2,832^{A}	2,331^{AB}	1,938^{B}	0,166	0,006

a) Acidi grassi a catena corta (C:4-C:10:0); b) Acidi grassi a catena media (C:11-C:17); c) Acidi grassi a catena lunga (>C:18) d) Acidi grassi saturi; e) Acidi grassi monoinsaturi; f) Acidi grassi polinsaturi.

Bibliografia

Barceló-Coblijn G., Murphy E.J. (2009), Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n−3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n−3 fatty acid levels. Progress in Lipid Research 48(6): 355-374.

Branciari R., Valiani A., Trabalza-Marinucci M., Miraglia D., Ranucci D., Acuti G., Esposto S., Mughetti L. (2012), Consumer acceptability of ovine cheese from ewes fed extruded linseed-enriched diets. Small Ruminant Research 106: S43-S48.

Cattaneo D., Dell'Orto V., Varisco G., Agazzi A., Savoini G. (2006), Enrichment in n−3 fatty acids of goat's colostrum and milk by maternal fish oil supplementation. Small Ruminant Research 64(1): 22-29.

Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. (1957), A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry 226(1): 497-509.

Kitessa, S.M., Peake D., Bencini R., Williams A.J. (2003), Fish oil metabolism in ruminants: III. Transfer of n−3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) from tuna oil into sheep's milk. Animal Feed Science and Technology 108(1): 1-14.

Mughetti L., Sinesio F., Acuti G., Antonini C., Moneta E., Peparaio M., Trabalza-Marinucci M. (2012), Integration of extruded linseed into dairy sheep diets: Effects on milk composition and quality and sensorial properties of Pecorino cheese. Animal Feed Science and Technology 178(1): 27-39.

Or-Rashid M.M., Fisher R., Karrow N., AlZahal O., McBride B.W. (2010), Fatty acid profile of colostrum and milk of ewes supplemented with fish meal and the subsequent plasma fatty acid status of their lambs. Journal of Animal Science 88(6): 2092-2102.

SAS Institute Inc. (2010), version 8.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Fatty acid profile of colostrum of sardinian sheep fed with extruded linseed

Key words: extruded linseed, sheep, colostrum, fatty acids.

Ricerca di *Coxiella burnetii* in latte crudo ovi-caprino: metodiche diagnostiche a confronto (risultati preliminari)

A. PETRUZZELLI, F. GUIDI, F. CIARROCCHI, E. MICCI, M FOGLINI, A. VALIANI, G. AMAGLIANI, F. TONUCCI, P.M. MANGILI, G. BLASI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Parole chiave: *Coxiella burnetii*, Latte crudo, PCR, Real Time - End point.

INTRODUZIONE - La Febbre Q è una malattia contagiosa a carattere zoonosico a diffusione cosmopolita, sostenuta da *Coxiella burnetii*, Gram-negativo, asporigeno, intracellulare obbligato. Estremamente diffuso in natura ed in grado di sopravvivere a lungo nell'ambiente esterno, il germe è in grado di infettare diverse specie animali domestiche e selvatiche. L'infezione decorre normalmente in forma sub-clinica, salvo nei ruminanti, che rappresentano il principale serbatoio dell'infezione. Nella specie bovina ed ovi-caprina, infatti, la malattia può manifestarsi con aborto, natimortalità, metrite ed infertilità. Anche nell'uomo l'infezione solitamente è asintomatica, sebbene in alcune circostanze possa essere corredata da sintomi simil-influenzali, polmonite, epatite, endocardite ed aborto. I ruminanti infetti possono eliminare il germe nell'ambiente in elevate quantità al momento del parto, attraverso feto ed invogli fetali, secreti vaginali, feci, urine e latte. *C.burnetii* è in grado di resistere a lungo nell'ambiente, con la conseguente formazione di polveri o aerosol contaminati, che rappresentano la principale via di trasmissione dell'infezione.
Nel presente lavoro vengono messi a confronto i risultati preliminari ottenuti dall'analisi di latte crudo ovi-caprino attraverso un protocollo analitico in PCR end-point ed un protocollo validato in real-time PCR.
MATERIALI E METODI - Lo studio ha riguardato campioni di latte prelevati in 55 aziende umbro marchigiane autorizzate per la produzione di latte crudo e prodotti lattiero-caseari a latte non pastorizzato delle quali il 44% nelle Marche ed il 56% nell'Umbria. Tutti i campioni, sono stati esaminati per la ricerca di *C. burnetii* mediante due differenti protocolli di estrazione ed amplificazione del DNA.
Protocollo A: il DNA di 1 mL di latte è stato estratto ed amplificato mediante PCR End Point con una coppia di primers specifici per la sequenza target IS1111 in accordo con quanto descritto da Petruzzelli *et al*., 2013.
Protocollo B: l'estrazione del DNA batterico è stata eseguita su 200 µL di latte mediante il QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN). Il DNA è stato amplificato mediante kit validato in accordo allo standard AFNOR XP U-47-600-2 § 7.3. ADIAVET™ COX REALTIME (Adiagene, Biomerieux) su apparato Mx3005P™ Real-Time PCR System (Stratagene). Si tratta di una Multiplex PCR in cui vengono amplificate simultaneamente la sequenza target di inserzione IS1111 di *C. burnetii*, mediante sonda ad idrolisi marcata con FAM (tecnologia 5'-esonucleasica) ed il gene housekeeping (GAPDH), controllo interno di estrazione ed amplificazione, mediante sonda marcata con un fluorocromo dello stesso spettro di emissione di VIC ed HEX.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Dei 172 campioni di latte, il 5% è risultato positivo per la presenza di *C. burnetii* sia in PCR End Point che in Real Time PCR e l'85% è risultato negativo con entrambi i protocolli (Tab. 1, Fig. 1).
Dei 20 campioni positivi in Real Time PCR, 11 sono risultati negativi in PCR End Point, mentre dei 152 negativi in Real time PCR, 5 hanno dato esito positivo in End Point (Tab. 2).
I dati preliminari derivanti da questo studio mostrano una concordanza elevata ma non completa tra i due metodi utilizzati. Il metodo in PCR End Point confrontato con il metodo in Real Time validato, ha evidenziato una sensibilità del 45% ed una specificità del 97% (Fig. 2). I risultati discordanti potrebbero essere riconducibili ai diversi metodi di estrazione e di detection utilizzati, evidenziando un livello di sensibilità più elevato per la Real Time PCR. Per valutare quanto la qualità del DNA target possa incidere sulla sensibilità della metodica, nel prosieguo della ricerca, a fronte di una unica metodica di estrazione verrà mantenuta come unica variabile la fase di amplificazione.

Tabella 1 - Real Time PCR – PCR End Point, confronto dei risultati.

		End Point PCR		
		+	-	Totale
Real-Time PCR	+	9	11	20
	-	5	147	152
	Totale	14	158	172

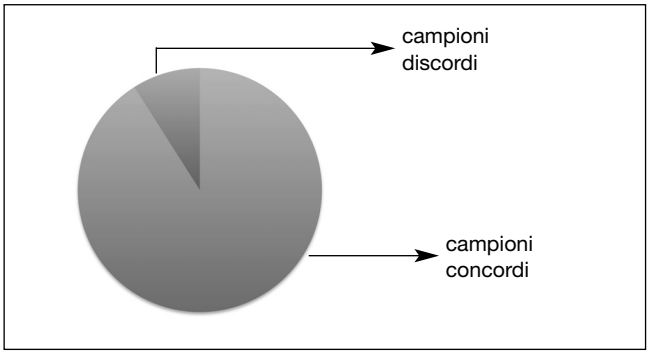


Figura 1 - Real Time PCR - PCR End Point, percentuale di concordanza.

Tabella 2 - Sensibilità e specificità metodo PCR End Point.

Veri positivi metodo PCR End point	Veri positivi metodo RT PCR	Sensibilità metodo PCR End Point
9	20	45%

Veri negativi metodo PCR End point	Veri negativi metodo RT PCR	Sensibilità metodo PCR End Point
147	152	97%

Detection of *Coxiella burnetii* in sheep and goat raw milk: comparison of two diagnostic methods (preliminary results)

Key words: *Coxiella burnetii,* raw milk, PCR, Real Time - End point.

Bibliografia

Magnino S., Vicari N., Boldini M., Rosignoli C., Nigrelli A., Andreoli G., Pajoro M., Fabbi M. (2009), Rilevamento di Coxiella burnetii nel latte di massa di alcune aziende bovine lombarde. Large Animal Review 15: 3-6.

A. Petruzzelli, G. Amagliani, E. Micci, M. Foglini, E. Di Renzo, G. Brandi, F. Tonucci. (2013), Prevalence assessementy of Coxiella burnetii and verocytotoxin-producing Escherichia coli in bovine raw milk through molecular identification Food Control Volume 32: 532 - 536.

Studio eseguito nell'ambito del progetto di ricerca corrente IZS UM 11/2011 RC finanziato dal Ministero della Salute.

Indagine sulle caratteristiche igienico-sanitarie degli allevamenti ovini della regione Marche che trasformano latte crudo

A. PETRUZZELLI[1], E. CARLONI[2], E. MICCI[1], M. FOGLINI[1], V. VETRANO[1], G. AMAGLIANI[2], F. CAVERNI[3], G. BRANDI[2], P.M. MANGILI[1], F. TONUCCI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione Pesaro
[2] Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"
[3] ASSAM-Agenzia Servizi Settore Agro-Alimentare Marche

Parole chiave: latte crudo, allevamenti ovini, cellule somatiche, carica batterica totale.

INTRODUZIONE - Nel sistema agro-alimentare italiano il settore lattiero-caseario occupa attualmente una posizione di primaria importanza. La filiera latte è stata oggetto nel tempo di un crescente interesse da parte del consumatore, soprattutto per quanto concerne i prodotti tradizionali a latte crudo, tipicamente percepiti come genuini e "salutistici". Tra questi, particolare attenzione viene rivolta alle produzioni ovicaprine, poiché particolarmente apprezzate per le peculiari caratteristiche organolettiche e di digeribilità. Tuttavia, a causa dei rischi sanitari legati alla produzione di formaggi a latte crudo, è necessaria una maggiore attenzione da parte degli operatori nel management aziendale e nelle fasi di lavorazione del prodotto. Nel seguente lavoro vengono presentati i risultati di una indagine preliminare finalizzata alla valutazione dei fattori di rischio relativi alla salubrità del latte di massa ovino. In particolare sono stati sottoposti a studio gli allevamenti della regione Marche che trasformano direttamente latte crudo.

MATERIALI E METODI - Censimento e georeferenziazione: in collaborazione con i Servizi Sanitari Veterinari territoriali e l'ASSAM (Agenzia Servizi Settore Agro-Alimentare Marche) si è proceduto al censimento degli allevamenti. La georeferenziazione è stata condotta tramite l'utilizzo di Google Earth 7.1.

Indagine conoscitiva: è stato elaborato e somministrato agli allevatori un questionario al fine di ottenere informazioni sulla gestione dell'allevamento (alimentazione, strutture, mungitura, stoccaggio latte, tecnologia di lavorazione, condizioni igienico sanitarie generali, formazione degli operatori).

Campionamento e attività analitica: sono stati prelevati nel periodo di lattazione (gennaio-agosto 2013), con cadenza quindicinale, 453 campioni di latte di massa. Tutti i campioni sono stati analizzati per: Conta Cellule Somatiche (CCS) (Bactoscan- metodo citometrico-UNI EN ISO 13366-2:2007), Carica Batterica Totale (CBT) (Bactoscan-metodo citometrico), grassi, proteine, lattosio (analisi infrarosso-FIL/IDF 141C:2000), pH e sostanza secca (analisi infrarosso).

Analisi statistica: i dati sono stati analizzati mediante software GraphPad Prism 5.0.

RISULATATI E CONSIDERAZIONI - Dal censimento e georeferenziazione (Fig. 1) sono stati individuati 24 allevamenti, distribuiti principalmente nella provincia di Fermo. La rielaborazione dei questionari ha permesso di evidenziare che: la numerosità dei capi, in genere di razza sarda, è compresa nella maggior parte degli allevamenti tra 200 e 400 (Fig. 2A); la mungitura e la pulizia dell'impianto avvengono prevalentemente in maniera automatizzata (Fig. 2B, 2C); il 50% degli allevamenti è provvisto di conduzione diretta del latte dall'impianto di mungitura al tank di stoccaggio, mentre la metà restante pratica il travaso con secchi (Fig. 2D); nell'89% degli allevamenti i filtri dell'impianto di mungitura vengono sostituiti quotidianamente (Fig. 2E); la sanificazione del tank di stoccaggio viene effettuato allo svuotamento, che di norma avviene giornalmente (Fig. 2F). Le medie geometriche (MG) delle CBT sono risultate ≤ 200.000 UFC/ml nel 78% degli allevamenti, con valori ≤ 100.000 UFC/ml nel 72% di essi, quindi conformi ai requisiti di legge (Reg. CE n 853/2004). Le MG delle CCS sono risultate > 2.000.000 cell/ml in 3 allevamenti e <1.000.000 cell/ml in tutti gli altri, quindi in linea con quanto evidenziato in altri studi scientifici che individuano in 1.133.000 cell./ml il valore medio di MG CCS nazionale (Rosati et al., 2005). L'analisi statistica ha evidenziato una correlazione significativa tra i valori di MG di CCS e CBT di tutti gli allevamenti (Spearman's rho = 0.7925; P = 0.0001); ciò è in accordo con quanto osservato anche da altri autori (De Garnica et al, 2013). Tuttavia non si è rilevata una significativa correlazione tra i valori delle MG delle CCS e CBT e le pratiche gestionali di allevamento/mungitura; tale dato potrebbe essere legato ai bassi valori di MG sia della CBT che delle CCS riscontrati. Dai risultati ottenuti si evince che le condizioni igienico-sanitarie aziendali e le caratteristiche del latte di massa degli allevamenti sottoposti a studio possono considerarsi buone. Tuttavia per i tre allevamenti con MG CCS > 2.000.000 cell/ml sarebbe auspicabile una maggiore formazione degli operatori nella prevenzione e nella gestione delle mastiti cliniche e sub-cliniche.

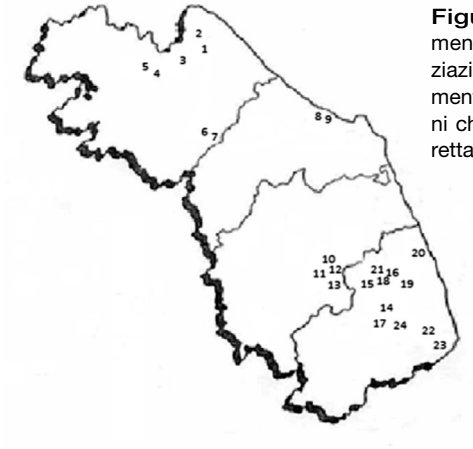


Figura 1 - Censimento e georeferenziazione degli allevamenti ovini marchigiani che trasformano direttamente latte crudo.

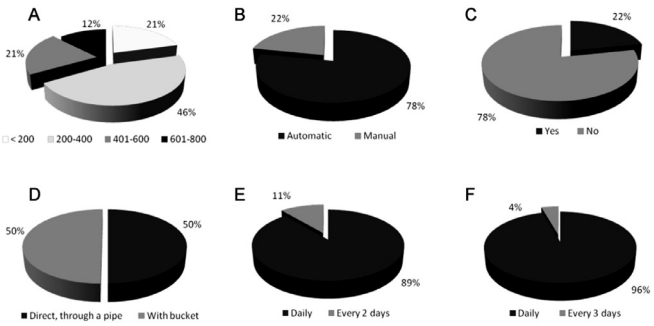


Figura 2 - Caratteristiche gestione allevamenti.

Investigation on sanitary characteristics of ovine breedings which process raw milk in marche region

Key words: raw milk, breeding, somatic cells, total bacterial count.

Bibliografia

De Garnica, M. L., B. Linage, J. A. Carriedo, L. F. De La Fuente, M. C. García-Jimeno, J. A. Santos, and C. Gonzalo (2013), Relationship among specific bacterial counts and total bacterial and somatic cell counts and factors influencing their variation in ovine bulk tank milk. J. Dairy Sci. 96:1021-1029.

Rosati R. et al. (2005). "Cellule somatiche nel latte ovino e caprino: definizione del valore medio nazionale e del valore fisiologico". Scienza e tecnica lattiero-casearia, 56 (3).

Studio eseguito nell'ambito dei progetti di ricerca corrente (RC 17/10 IZSUM) e finalizzata (RF-2009-1549175 IZSUM) finanziati dal Ministero della Salute.

Avvelenamento acuto da urea in un gregge di ovini: descrizione di un caso

C. PILO[1], M. MASCIA[2], G. CHESSA[1], B. VODRET[1], T. TEDDE[1], L. PINNA[1], A. CANNAS[1], P. NICOLUSSI[1], M. LICIARDI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi"; [2] A.S.L. 8 di Cagliari

Parole chiave: avvelenamento, urea, ovini.

INTRODUZIONE - L'urea è un composto dell'azoto, utilizzato nell'alimentazione dei ruminanti quale fonte azotata per la produzione di proteine, il cui impiego come additivo nutrizionale è autorizzato e definito dal Regolamento di esecuzione (UE) n. 839/2012 della Commissione del 18/09/2012. La prescrizione di limiti nell'utilizzo dell'urea è necessaria anche in funzione del fatto che di questo composto sono ben noti gli effetti tossici in caso di sovradosaggio (Edjtehadi *et al*., 1978; Pompa *et al*., 1984; Passler *et al*., 2012). Nel presente lavoro viene descritto un caso di intossicazione acuta da ingestione di urea in un allevamento ovino.

MATERIALI E METODI - Nel corso del Maggio 2014, la Struttura Complessa di Cagliari dell'IZS è stata contattata dal Servizio Veterinario della ASL di Cagliari per un caso di mortalità acuta in un gregge di ovini. Nell'allevamento, costituito da ovini selezionati di razza Sarda, erano venuti a morte 125 dei 285 capi in lattazione. L'allevatore riferiva che i decessi erano avvenuti nell'arco di 1-2 ore dall'ingestione dell'alimento, preceduti da una sintomatologia neurologica (ottundimento del sensorio, tremori, contrazioni muscolari e abbondante fuoriuscita di schiuma biancastra dalla bocca). L'alimento in questione era costituito da polpa di barbabietola inumidita, ottenuta da polpa di barbabietola in pellet tenuta a mollo in acqua all'interno di vasche per 12 ore circa. In seguito all'insorgenza del fenomeno clinico, l'allevatore era intervenuto impedendo ad ulteriori animali di accedere all'alimento. Veniva pertanto concordato un sopralluogo congiunto di IZS e ASL, condotto circa dopo 4 ore dal termine dell'evento, durante il quale sono stati eseguiti l'esame necroscopico di 3 capi, il prelievo di campioni biologici (organi, sangue e contenuto ruminale) e di alimento per le analisi di laboratorio.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Tutti i capi venuti a morte si presentavano notevolmente rigonfi e con le mucose esplorabili fortemente congeste. I 3 capi sottoposti ad esame necroscopico presentavano un quadro sovrapponibile: forte meteorismo ruminale; congestione ed edema emorragico sottocutaneo in particolare nelle regioni dal collo alla punta del petto; petecchie emorragiche nell'omento, nei polmoni e a livello subepicardico nel cuore; soffusioni emorragiche subendocardiche nel cuore; tracheite emorragica; estesa ruminite emorragica; abomasite; enterite emorragica; fegato di aspetto pallido e degenerato; reni congesti. Il pH del contenuto ruminale misurato nei 3 capi mediante stick (Fluka Analytical) era tra 9 e 10. La rapida insorgenza ed evoluzione della sintomatologia, l'elevato tasso di mortalità, il decesso nell'arco di 1-2 ore, il quadro anatomopatologico e il rinvenimento, in prossimità della vasca di preparazione dell'alimento, di granuli rotondeggianti biancastri (diametro 2-3 mm), simili all'urea ad uso agricolo, dichiarata non utilizzata dall'allevatore, hanno indotto il sospetto di un avvelenamento acuto da ingestione di urea. Gli organi prelevati (reni, fegato, polmoni ed intestino) sono stati sottoposti ad esame batteriologico sia in aerobiosi che in anaerobiosi, dando esito negativo. Nei campioni di filtrato del contenuto ruminale è stato riscontrato un quantitativo di urea rispettivamente di 838, 585 e 666 mg/dl. Nel siero di due capi, ottenuto mediante centrifugazione del sangue prelevato dal cuore durante la necroscopia, il contenuto di urea era rispettivamente 105 e 96 mg/dl (valori di riferimento 25-60 mg/dl). Nel campione dell'alimento somministrato è stato riscontrato un contenuto di urea pari a 17,5 g/100 g di sostanza secca, mentre nel campione di polpe di barbabietola in pellet usato per la preparazione era <0,25 g/100 g. L'accertamento analitico dei granuli rinvenuti ha confermato che si trattava di urea al 100%. L'insieme dei rilievi e i risultati analitici hanno permesso la conferma del sospetto diagnostico.

Sebbene noti da tempo, i casi di intossicazione da urea nell'ovino sono raramente segnalati in letteratura, ma questi, come noto, possono conseguire a numerosi fattori, quali: accidentale accesso a fonti ricche di urea, eccesso di urea nella razione, insufficiente adattamento alla razione contenente urea, pH ruminale alto associato a foraggio di scarsa qualità, elevata temperatura corporea, concomitante somministrazione di alimenti ricchi di ureasi (es.: soia), dieta carente di carboidrati facilmente fermentescibili, insufficiente apporto idrico (Coombe e Tribe, 1958; McBarron e McInnes, 1968; Edjtehadi *et al*., 1978). Nel caso in questione è stata considerata anche l'origine dolosa. È importante sottolineare che il Reg. (UE) n. 839/2012 autorizza l'uso dell'urea nei ruminanti come additivo nutrizionale con un tenore massimo di 8800 mg/kg di mangime completo con un tasso di umidità del 12%, prescrivendo che nelle istruzioni per l'impiego dell'additivo per mangimi e dei mangimi contenenti urea debba essere indicato di somministrare urea solo ad animali con rumine funzionante, di somministrare la dose massima di urea in modo graduale, e che il tenore massimo di urea deve essere somministrato solo come parte di una dieta ricca di carboidrati facilmente digeribili e con basso tenore di azoto solubile. Nel caso in questione, il contenuto di urea nell'alimento era pari al 17,5% della sostanza secca, contro un massimo dell'1% di concentrazione indicato attualmente nell'alimentazione dei ruminanti, nonché prescritta per legge, e tale quantitativo era pertanto in grado di fornire la quantità tossica minima di urea, pari a 0,5 g/kg p.v. (Pompa, 1984) (25 g/capo), con l'ingestione di appena 150 grammi di s.s. di alimento. In conclusione, a causa dell'alta patogenicità e dei numerosi fattori predisponenti, l'avvelenamento acuto da urea nell'ovino deve essere preso in considerazione tra le cause di morte improvvisa negli ovini, in particolare nel caso di coinvolgimento di un elevata percentuale di capi.

An outbreak of urea poisoning in a sheep flock: case report

Key words: poisoning, urea, sheep.

Bibliografia

Coombe J.B., Tribe D.E. (1958). Toxicity of urea to sheep. Nature 182(4628): 116-117.

Edjtehadi E., Szabuniewicz M., Emmanuel B. (1978), Acute urea toxicity in sheep. Canadian Journal of Comparative Medicine 42:63-68.

McBarron E.J., McInnes P. (1968). Observations on urea toxicity in sheep. Australian Veterinary Journal 44(3):90-96.

Passler T., Walz P.H., Pugh D.G. (200), Urea (Ammonia) Toxicity. In: "Sheep and Goat Medicine", Pugh D.G., Baid A.N. (Ed.), Saunders, 2012, Maryland Heights, pp. 387-388.

Pompa G. (1984), Urea e Sali di ammonio. In: "Tossicologia Veterinaria", Beretta G. (a cura di), Editoriale Grasso, 1984, Bologna, pp. 116-120.

Regolamento di esecuzione (UE) n. 839/2012 relativo all'autorizzazione dell'urea come additivo per mangimi destinati ai ruminanti.

Impiego del lino e dell'origano nei mangimi per agnelli Gentile di Puglia. 1. Rilievi alla macellazione e alla dissezione anatomica

M. RAGNI, S. TARRICONE, F. GIANNICO, P. CAGNETTA, F. VIZZIELLI, L. MELODIA, G. MARSICO, A. VICENTI

Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

Parole chiave: performance, Gentile di Puglia, semi di lino, origano.

INTRODUZIONE - Le attuali raccomandazioni sanitarie per una dieta ricca a base di vegetali e di cibi con un elevato apporto di acidi grassi polinsaturi, stanno incentivando i consumatori a rivolgersi verso carni "leggere", povere in grasso e con una buona versatilità in cucina. Per venire incontro a queste richieste la ricerca sta sperimentando nuove diete per gli animali all'ingrasso. Principalmente si sta tentando di incrementare la quantità di acidi grassi insaturi della carne; studiando la qualità della carne di agnello in particolare, vari autori hanno valutato gli effetti dell'introduzione di semi e/o oli vegetali ricchi di acido linoleico e linolenico. Ad esempio, Vieira et al. (2012) e Nute et al (2007), hanno lavorato sull'effetto dell'introduzione di olio di lino, mentre Simitzis et al. (2008) hanno valutato l'influenza dell'olio di origano. Altrettanto importante è l'influenza che il lino esercita sugli aspetti quantitativi della produzione della carne di agnello. La presente ricerca è finalizzata a verificare l'influenza dell'introduzione nella dieta dei semi di lino soli e dei semi di lino addizionati ad origano sugli aspetti quantitativi delle produzioni di agnelli Gentile di Puglia di 60 giorni d'età. Tale ricerca forma parte di un più ampio studio in cui sarà valutata l'influenza dell'origano, una delle maggiori fonti di antiossidanti sinora studiate, sul profilo acidico degli acidi grassi, sull'ossidazione dei lipidi e sulle caratteristiche qualitative e organolettiche delle carni.

MATERIALI E METODI - La prova è stata condotta presso l'azienda agricola "Di Trani" in agro di Grumento Nova (Pz), a circa 780 m s.l.m. Il protocollo sperimentale prevedeva la formazione di 3 gruppi di 6 soggetti ciascuno, maschi, omogenei per età e peso vivo, macellati all'età di 60 giorni circa. Questi sono stati alimentati ad libitum con le seguenti diete: Testimone (T), corrispondente ad un mangime commerciale contenente olio di soia; Lino (L) contenete semi di lino estruso; Lino + Origano (L+O) contenente semi di lino estruso e piante di origano in fioritura essiccate. Le diete erano isoproteiche, isoenergetiche ed isofibrose e la loro somministrazione è iniziata all'età di circa 20 giorni. Alla macellazione, previa stallatura di 24 ore, sono stati registrati i parametri riportati in Tabella 1. Dopo 24 ore di refrigerazione la carcassa è stata suddivisa in tagli (ASPA, 1991) ed il coscio è stato sezionata in magro, grasso e osso. È stato rilevato anche il pH del muscolo Semimembranoso (SM) sia a caldo (pH1) sia a freddo (pH2) (Tabella 2). Per l'analisi statistica, i dati sono stati analizzati con la procedura GLM del SAS (2000), mentre le differenze statistiche tra le medie stimate sono state valutate con il "t" di Student.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Nella tabella 1 sono riportati i dati relativi ai rilievi alla macellazione da cui si evince come l'impiego delle diete L ed L+O non abbiano in alcun modo influenzato i parametri considerati. Tali risultati sono confermati da quanto osservato su agnelli da Caputi Jambrenghi et al., (2004) e sui capretti da Ragni et al. (2004). Allo stesso tempo si può affermare che l'introduzione di Lino e di Lino+Origano ha determinato apparentemente una buona appetibilità dei mangimi da parte degli animali. Dai rilievi alla macellazione si osserva una significativa influenza del lino sulla percentuale di grasso nelle carcasse e nelle carni di agnello. Infatti si osservano significative riduzioni del tessuto adiposo rilevabili in una riduzione significativa dell'omento nella tesi L ($P<0,05$) ed una significativa riduzione della pancetta e del grasso di spolpo dei cosci nel gruppo L+O ($P<0,05$), in quest'ultimo si osserva anche un tendenziale aumento del magro.

Tabella 1 - Rilievi alla macellazione (%).

	Testimone	Lino	Li + O	DSE, G.L.= 15
PVN kg	17,44	16,85	17,34	1,992
Pelle + Vello	13,13	13,24	13,84	0,867
Resa a caldo	67,72	67,09	67,94	2,457
Resa a freddo	65,73	64,75	65,82	2,800
Calo refrig.	2,95	3,50	3,13	1,345

Tabella 2 - Rilievi alla macellazione (% sul peso carcassa), dissezione anatomica (% sul peso cosci) e pH dell'SM.

	Testimone	Lino	Li + O	DSE, G.L.= 15
Peso Carcassa kg	9,80	9,42	9,99	1,380
Omento	2,10 a	1,16 b	1,22	0,797
Costolette	14,91	14,94	14,27	0,846
Pancette	4,97 a	4,57	4,44 b	0,440
Cosci	30,40	31,21	31,05	1,114
Peso cosci kg	2,96	2,90	3,07	0,415
Magro	66,88	68,34	68,69	1,866
Grasso	9,43 a	8,00	7,71b	1,500
Osso	23,69	23,66	23,59	1,466
pH 1 SM	6,44	6,45	6,54	0,192
pH 2 SM	5,35	5,38	5,45	0,122

Use of linseed and oregano in feed for gentile di Puglia lambs. 1. Slaugthering and dissection data

Key words: performance, Gentile di Puglia lamb breed.

Bibliografia

ASPA - (1991), Metodologie relative alla macellazione degli animali di interesse zootecnico e alla valutazione e dissezione della loro carcassa. ISMEA, Rome, Italy.

Caputi Jambrenghi A., Giannico F, Favia R., Minuti F., Ragni M., Vicenti A., Vonghia G. (2004), Dietary linseed oil in lamb production. 1. Productive performances and carcass and meat quality. In: Book of Abstract of the 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Wageningen Acc Publ.

Colonna M.A., Giannico F., Coluccia A., Di Bello G., Vonghia G., Caputi Jambrenghi A. (2011), Impiego dei semi di lino estrusi e dell'olio di lino nell'alimentazione dell'agnello: performance produttive e qualità della carne. Progress In Nutr, vol. 13/2: 111-24.

Nute G.R., Richardson R.I., Wood J.D., Hughes S.I., Wilkinson R.G., Cooper S.L., Sinclair L.A. (2007), Effect of dietary oil source on the colour and lipid stability of lamb meat. Meat Sci. 77 (4): 547-55.

Ragni M., Di Turi L., Melodia L., Caputi Jambrenghi A., Colonna M.A., Vonghia G. (2004), Effect of lamb feeding with linseed meal on some meat quality traits. 50° International Congress of Meat Science Technology 1335-1338.

Simitzis P.E., Deligeorgis S.G., Bizelis J.A., Drdamani A, Theodosiou I., Fegeros K., (2008), Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. Meat Sci. 79 (2): 217-22.

Vieira C., Fernandez Diez A., Mateo J. Bodas R., Soto S., Manso T. (2012), Effect of addition of different vegetable oils to lactating dairy ewes' diet on meat quality characteristics of suckling lambs reared on the ewes' milk. Meat Sci. 91 (3):277-83.

Progetto di ricerca finanziato dalla Regione Basilicata: "*Valorizzazione delle carni di genotipi ovini e caprini autoctoni della Basilicata per la salvaguardia della biodiversità*" - Misura 214, Azione 5 - Asse 2 (Miglioramento dell'ambiente e dello spazio rurale). Reg. CE n. 1698/05.

Impiego del lino e dell'origano nei mangimi per agnelli Gentile di Puglia. 2. Caratteristiche colorimetriche, tenerezza e pH del *Longissimus dorsi*

M. RAGNI, S. TARRICONE, G. SCARPA, M.A. COLONNA, L. MELODIA, A. VICENTI, M. LACITIGNOLA, G. MARSICO

Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

Parole chiave: qualità della carne, Gentile di Puglia, semi di lino, origano.

INTRODUZIONE - La composizione acidica dei muscoli influenza numerosi aspetti della qualità della carne, incluso il colore, la stabilità dei lipidi e il gusto (Wood et al., 2003). Il miglioramento della frazione lipidica della carne rappresenta un obiettivo perseguito da tempo per gli importanti risvolti salutistici, attraverso l'incremento del contenuto in acidi grassi polinsaturi (PUFA). L'aumento della quantità di PUFA all'interno della carne può, tuttavia, comportare una diminuzione della sua shelf-life, data dall'ossidazione dei lipidi e dalle variazioni del colore. L'impiego di semi di lino nell'alimentazione dell'agnello è già stato oggetto di precedenti studi (Colonna et al., 2011; Giannico et al., 2009) al fine di migliorare le caratteristiche dietetico nutrizionali delle carni. nel presente studio si è inteso valutare l'effetto dell'integrazione con infiorescenze di origano (*Origanum vulgare* L.). Tale essenza vegetale è nota per le sue numerose proprietà terapeutiche, in particolare per l'azione antiossidante esercitata da timolo e carvacrolo.
Scopo della presente ricerca è stato quello di valutare l'influenza di diete contenti semi di lino estrusi con o senza integrazione di origano, sulle caratteristiche qualitative delle carni di agnello Gentile di Puglia.
MATERIALI E METODI - La prova è stata condotta presso l'azienda agricola "Di Trani" in agro di Grumento Nova (Pz), a circa 780 m s.l.m. su 18 agnelli maschi di razza Gentile di Puglia, suddivisi in 3 gruppi di 6 soggetti ciascuno, omogenei per età e peso vivo. Questi sono stati alimentati dall'età di 20 giorni con le seguenti diete: Testimone (T), corrispondente ad un mangime commerciale contenente olio di soia; Lino (L) contenete semi di lino estruso; Lino + Origano (L+O) contenente semi di lino estruso e piante di origano in fioritura essiccate. Gli animali sono stati macellati a 60 giorni ed sono state prelevate le lombate da ciascuna carcassa, sottoposte a dissezione in magro, grasso ed osso. Sul muscolo *Longissimus dorsi* (LD) sono stati rilevati il pH a caldo (pH1), a freddo (pH2), gli indici colorimetrici (sistema Hunter Lab) e lo sforzo al taglio (Warner Blazer Shear - W.B.S.).
I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) utilizzando la procedura GLM del SAS (2000); le differenze tra le medie stimate sono state valutate con il "t" di Student.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Non sono emerse differenze significative tra le tesi a confronto per quanto attiene al peso delle lombate (Tab. 1). Relativamente alla ripartizione tissutale, l'integrazione con origano ha fatto registrare un'incidenza del magro significativamente superiore (P<0,01 e P<0,05) rispetto agli altri due gruppi, e, conseguentemente, una frazione inferiore di grasso, tuttavia non significativa. La rilevazione del pH, sia a caldo che a freddo, non ha evidenziato differenze che attingono ai livelli di significatività statistica e, pertanto, tale parametro non sembra essere stato influenzato dalla dieta somministrata, in accordo con quanto riportato da Simitzis et al. (2007), che hanno valutato l'effetto dell'integrazione di olio di origano nella dieta di agnelloni. In tabella 2 sono riportati i risultati relativi alle caratteristiche colorimetriche ed al comportamento reologico del muscolo LD. Non sono emerse differenze significative tra le tesi a confronto per nessuno dei parametri studiati, così come non sembrano influenzati dalla dieta i valori di L e di b, riportati da Giannico et al. (2009).

Tabella 1 - Dissezione anatomica (%) e pH *Longissimus dorsi*.

	T	L	L + O	DSE (G.L.=15)
Peso lomb ric. (kg)	0,66	0,69	0,65	0,133
Magro	48,24 b	48,04 B	54,27 Aa	3,953
Grasso	15,96	16,42	12,88	4,219
Osso	35,80	35,55	32,84	5,005
pH 1 LD	6,56	6,53	6,55	0,159
pH 2 LD	5,32	5,40	5,47	0,089

Tabella 2 - Caratteristiche colorimetriche e tenerezza *Longissimus dorsi.*

	T	L	L + O	DSE (G.L.=15)
L *	41,40	41,86	40,25	2,711
a *	9,72	9,40	10,42	10,980
b *	11,67	11,36	11,37	1,270
WBS	2,03	2,40	2,10	0,521

Use of linseed and oregano in feed for gentile di Puglia lambs. 2. Meat colour, tenderness and ph of longissimus dorsi

Key words: meat quality, Gentile di Puglia lamb breed, linseed, oregano.

Bibliografia

Colonna M.A., Giannico F., Coluccia A., Di Bello G., Vonghia G., Caputi Jambrenghi A. (2011). Impiego dei semi di lino estrusi e dell'olio di lino nell'alimentazione dell'agnello: performance produttive e qualità della carne. Progress in nutrition, vol. 13/2: 111-124.

Giannico F., Colonna M.A., Coluccia A., Crocco D., Vonghia G., Cocca C., Caputi Jambrenghi A. (2009). Extruded linseed and linseed oil as alternative to soybean meal and soybean oil in diets for fattening lambs. Ital. J. Anim. Sci., 8 (2): 495-497.

Simitzis P.E., Deligeorgis S.G., Bizelis J.A., Dardamani A., Theodosiou I., Fegeros K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. Meat Science, 79: 217-233.

Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M.M., Kasapidou, E., et al. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: A review. Meat Science, 66: 21-32.

Progetto di ricerca finanziato dalla Regione Basilicata: "*Valorizzazione delle carni di genotipi ovini e caprini autoctoni della Basilicata per la salvaguardia della biodiversità*" - Misura 214, Azione 5 - Asse 2 (Miglioramento dell'ambiente e dello spazio rurale). Reg. CE n. 1698/05.

Effetto della diversa integrazione di concentrati sulla composizione acidica del grasso del latte in pecore di razza Sarda al pascolo

P.G. RASSU, M.G. MANCA, A. MARZANO, R. RUBATTU, A. MAZZA, A. NUDDA

Dipartimento di Agraria, Sezione di Scienze Zootecniche, University of Sassari,
Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italy

Parole chiave: latte ovino, concentrato, acidi grassi.

INTRODUZIONE - Il sistema di allevamento più diffuso in Sardegna è quello semiestensivo basato principalmente sullo sfruttamento delle risorse foraggere mediante pascolamento (circa 1.200.000 ha di aree a pascolo), a cui spesso è associata l'integrazione alimentare a base di concentrati (somministrati in corrispondenza delle due mungiture giornaliere) e di fieno. È noto che la determinazione della dose ottimale di concentrato è influenzata dalla interazione tra quantità e qualità del concentrato e disponibilità e qualità del pascolo (Avondo e Bordonaro, 2001; Molle et al., 2008). Ad esempio una maggiore produzione di latte è stata ottenuta nelle pecore integrate con concentrato a base di orzo-grano piuttosto che di mais (Avondo et al., 1995).
Allo stesso tempo la composizione acidica del latte sembra essere influenzata sia dalle essenze foraggere consumate che dal loro stadio vegetativo (Cabiddu et al., 2005), sia dalla quantità di concentrato somministrato (Vasta et al., 2008).
Poiché nella realtà di allevamento la maggior parte degli allevatori utilizza lo stesso tipo di concentrato nelle due somministrazioni giornaliere, l'obiettivo di questa prova è stato quello di valutare gli effetti della somministrazione di due diversi concentrati nell'arco della giornata sulla composizione acidica del latte ovino.
MATERIALI E METODI - Nel periodo Gennaio-Giugno 2013, 48 pecore di razza Sarda (al 2° mese di lattazione) dopo un periodo pre-sperimentale di 2 settimane in cui erano sottoposte allo stesso regime alimentare (pascolo durante il giorno, concentrato commerciale alle due mungiture e fieno alla sera) sono state suddivise in due gruppi omogenei: il gruppo di controllo (CON) riceveva una integrazione di 300g/pasto del concentrato commerciale in corrispondenza delle due mungiture giornaliere; l'altro gruppo (SPE) riceveva 300g di una miscela costituita da 50% di granella di orzo e 50% di granella di mais alla mungitura del mattino e 300g dello stesso concentrato commerciale usato per il gruppo CON durante la mungitura della sera. I rilievi, eseguiti ogni due settimane, hanno riguardato la produzione giornaliera individuale di latte nelle singole mungiture, e dal latte di massa di ciascun gruppo e di ciascuna mungitura sono stati prelevati 3 campioni di latte per l'analisi del contenuto in grasso e della composizione acidica. I dati sono stati analizzati con un modello lineare utilizzando dieta, mungitura e la loro interazione come parametri fissi.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La produzione totale di latte (circa 1,2 kg/capo/d) non differiva significativamente tra i gruppi, anche se quella della sera era più alta nel gruppo CON rispetto al gruppo SPE (469 g/die vs. 442 g/die). La percentuale di grasso è stata significativamente influenzata dalla mungitura ma non dalla dieta (Tabella 1). Per quanto attiene al profilo acidico la dieta ha mostrato effetti significativi sul contenuto in PUFAn3 ed n6, maggiori nel gruppo SPE, ed in CLA totale maggiori invece nel gruppo CON (Tabella 1). L'orario di mungitura ha influenzato significativamente il contenuto di tutti i gruppi di acidi grassi considerati, ad eccezione del contenuto in PUFAn6; in particolare gli SFA ed i PUFAn3 sono risultati maggiori nel latte della mattina, mentre i MUFA, gli OBCFA ed il CLA totale sono risultati maggiori nel latte della sera (Tabella 1). Il contenuto lipidico ha mostrato un andamento crescente a partire da metà aprile (dato non riportato) in concomitanza sia del calo produttivo, ma anche della variazione delle caratteristiche nutrizionali dell'erba. Nel complesso il contenuto lipidico ha mostrato maggiore variabilità nel latte della sera.

Tabella 1 - Contenuto lipidico e profilo acidico del grasso del latte nelle due mungiture giornaliere.

	Dieta		Mungitura	
	CON	SPE	mattina	sera
Grasso (%)	6,43	6,41	5,74b	7,10a
Acidi Grassi (g/100g of FAME)				
SFA	64,91	64,87	65,92a	63.87b
MUFA	28,67	28,64	27,73b	29,59a
OBCFA	4,09	4,13	3,99b	4,22a
PUFA-ω3	1,07b	1,10a	1,12a	1,06b
PUFA-ω6	2.32b	2.39a	2,37	2,34
CLA totale	1.95a	1.91b	1,82b	2,04a

a,b = differenze significative per P<0,05.

Per quanto attiene all'andamento dei gruppi di acidi grassi gli SFA ed i MUFA hanno mostrato un andamento speculare, con valori rispettivamente minimi e massimi nel periodo marzo-aprile, mentre il CLA totale ha fatto registrare valori elevati nel periodo di disponibilità di erba.
In conclusione, poiché da una parte il diverso regime alimentare ha evidenziato effetti soltanto su alcuni acidi grassi e dall'altra la sperimentazione ha evidenziato differenze significative importanti nel contenuto in grasso e nella composizione acidica nel latte delle due mungiture giornaliere, si potrebbe ipotizzare per l'industria casearia un interesse alla raccolta separata del latte, allo scopo di destinarlo alla produzione di formaggi con caratteristiche organolettiche diverse. Ringraziamenti: ricerca supportata dal MiPAAF progetto BELAT (OIGA).

Effect of different concentrate supplementation on milk fatty acid composition in grazing sarda sheep

Key words: sheep milk, concentrate, fatty acids.

Bibliografia

Avondo M., Bordonaro S. (2001), In: L'alimentazione degli ovini da latte. Ed. by G. Pulina, Avenue Media (Bologna):89-109.
Avondo M., Licitra G., Bonanno M., Keshtkaran A.N., Marletta D., D'Urso G. (1995), Livestock Production Science 44:237-344.
Cabiddu A., Decandia M., Addis M., Piredda G., Pirisi A., Molle G. (2005), Small Ruminant Research 59:169-180.
Molle G., Decandia M., Cabiddu A., Landau S.Y., Cannas A. (2008), Small Ruminant Reserch 77: 93-122.
Vasta V., Nudda A., Cannas A., Lanza M., Priolo A. (2008), Animal Feed Science and Technology 147:223-246.

Presenza e diffusione di zecche in allevamenti ovini e bovini in Basilicata

L. RINALDI[1,2], M.E. MORGOGLIONE[1], A. BOSCO[1], M. SANTANIELLO[1], I. GUARIGLIA[1], G. PRESTERA[3], G. CRINGOLI[1,2]

[1] Unità di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Regione Campania; [2] Centro Interdipartimentale di Ricerca in Parassitologia - CIRPAR; [3] Associazione Regionale Allevatori, Basilicata, Italia

Parole chiave: Ixodidae, ovini e bovini.

INTRODUZIONE - Le infestazioni da zecche Ixodidae (zecche dure) rappresentano da sempre un importante problema sanitariosia per l'uomo che per gli animali domestici e selvatici.
Sebbene negli ultimianni l'interesse per le zecche e per le malattie da esse trasmesse sia notevolmentecresciuto, gli studi circa la loro presenza e diffusione nelle aree appenniniche del centro-sud Italia,e sui ruminanti domestici in particolare, sono piuttosto limitati (Cringoli *et al*., 2002; Rinaldi *et al*., 2004).
Scopo del presente lavoro è stato quello di aggiornare i dati sulla presenza e la distribuzione delle zecche Ixodidae in bovini ed ovini allevati in Basilicata, un'area particolarmente favorevole alla biologia ed all'ecologia di numerose specie di Ixodidae (Di Todaro *et al*., 1999; Dantas-Torres e Otranto, 2013).
In questa regione l'allevamento bovino ed ovino brado e semibrado, è ampiamente diffuso e rappresenta una importante risorsa economica, specialmente per la naturale vocazione degli animali ad utilizzare pascoli marginali di collina e montagna.
MATERIALI E METODI - Nel periodo Maggio - Settembre 2013 sono stati effettuati sopralluoghi aziendali in 82 allevamenti ovini e 31 allevamenti bovini bradi/semibradi, nelle province di Potenza e Matera. Le zecche sono state prelevate direttamente dagli animali da diverse parti del corpo, testa, collo, dorso, mammelle, perineo e parti interne delle cosce. I vari esemplari sono stati rimossi con pinzetta entomologica e fissati in alcool al 70%. L'identificazione è stata effettuata utilizzando le chiavi morfometri che presenti in letteratura (Estrada-Peñae Estrada-Peña,1991; Manilla, 1998; Cringoli e Iori,, 2005).

Tabella 1 - Prevalenze delle specie di Ixodida e riscontrate negli allevamenti ovini e bovini della Basilicata.

Specie di ixodidae	Allevamenti ovini (No. esaminati = 82)		Allevamenti bovini (No. esaminati = 31)	
	No. Positivi	Prevalenza (%)	No. Positivi	Prevalenza (%)
Dermacentor marginatus	5	6,1	3	9,7
Hyalomma detritum	3	3,7	1	3,2
Hyalomma marginatum	1	1,2	9	29,0
Ixodes ricinus	3	3,7	3	9,7
Ixodes gibbosus	-	-	2	6,5
Rhipicephalus bursa	55	67,1	19	61,3
Rhipicephalus sanguineus	28	34,1	8	25,8
Rhipicephalus turanicus	21	25,6	8	25,8

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - In totale sono stati raccolti ed identificati 2179 esemplari di Ixodidae. Le specie identificate negli allevamenti ovini e bovini sono riassunte nella tabella che segue.
I risultati hanno messo in evidenza che negli 82 allevamenti ovini e nei 31 allevamenti bovini bradi/semibradi controllati in Basilicata erano presenti 8 specie di zecche, delle quali 7 comuni sia agli ovini che ai bovini ed una specie (*Ixodes gibbosus*) presente solo in due allevamenti bovini.
Le specie più diffuse sono risultate quelle del genere *Riphicephalus*. Negli allevamenti bovini è risultata molto diffusa anche la specie *Hyalomma marginatum*.
Questo studio, quindi, confermala notevole diffusione delle zecche Ixodidae e negli allevamenti bovini ed ovini bradi/semibradi delle aree appenniniche del centro sud Italia dove, evidentemente, le condizioni ambientali e climatiche sonofavorevoli alla diffusione di diverse specie dizecche che possono pertanto parassitare gli animali domestici e trasmettere agenti patogenidiversi, con la inevitabileripercussione sul benessere animale, sulla qualità e quantità delle produzioni, sullo stato sanitario degli animali e sulla salute dell'uomo visto la natura zoonosica di questi agenti patogeni.
Ringraziamenti - Si ringrazia la COST Action TD1303 European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections (EurNegVec).

Ixodidae ticks in sheep and cattle in the Basilicata region (southern Italy)

Key words: Ixodidae, sheep and cattle.

Bibliografia

Cringoli G., Iori A., (2005) Volume 6. Mappe Parassitologiche - Zecche.
Cringoli G., Otranto D., Testini G., Buono V., Di Giulio G., Traversa D., Lia R., Rinaldi L., Veneziano V., Puccini V.(2002), Epidemiology of bovine tick-bornediseases in southernI taly. Vet Res 33: 421-428.
Dantas-Torres F., Otranto D. (2013), Seasonal dynamics of Ixodes ricinus on ground level and higher vegetation in a preserved wooded area in southern Europe. Vet Parasitol 192: 253-258.
Di Todaro N., Piazza C., Otranto D., Giangaspero A.(1999), Ticks infesting domestic animals in Italy: current acarological studies carried out in Sardinia and Basilicata regions. Parassitologia 41: 39-40.
Estrada-Peña A., Estrada-Peña R. (1991), Notes on Dermacentor ticks: redescription of D.marginatus with the synonymies of D. niveus and D. daghestanicus (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 28: 1-15.
Manilla G. (1998), Fauna d'Italia Vol. xxxvi Acari-Ixodida. Ed. Calderini, Bologna, Italy.
Rinaldi L., Otranto D., Veneziano V., Milillo P., Buono V., Iori A., Di Giulio G., Cringoli G.(2004), Cross-sectional survey of ticks (Acari: Ixodidae) in sheep from an area of the southern Italian Apennines. Exp Appl Acarol 33: 145-151.

Produzione di Pecorino foggiano probiotico da latte di pecora Gentile di Puglia

A. SANTILLO, M. CAROPRESE, R. MARINO, A.L. DE FINIS, A. SEVI, M. ALBENZIO

Dipartimento di Scienze Agrarie degli Alimenti e dell'Ambiente; Università degli Studi di Foggia, Via Napoli 25, 71122 Foggia

Parole chiave: pecora Gentile di Puglia, probiotici, formaggio ovino.

INTRODUZIONE - Ad oggi, pochi studi hanno riguardato lo sviluppo di prodotti lattiero caseari probiotici a partire da latte ovino. (Albenzio et al., 2001; Corbo et al., 2001) (Albenzio et al., 2010, Santillo et al., 2012) Tali studi hanno evidenziato che la vitalità dei probiotici nella matrice formaggio, nel corso del processo di maturazione, varia a seconda delle caratteristiche del microrganismo utilizzato. In associazione all'effetto benefico diretto sulla salute umana i batteri probiotici insieme ai microrganismi starter e non-starter, agli enzimi endogeni del latte e coagulanti, contribuiscono al processo di maturazione del formaggio riconducibile principalmente alle modificazioni biochimiche a carico della frazione proteica e lipidica del formaggio. La razza ovina Gentile di Puglia rappresenta una razza autoctona è caratterizzata dalla produzione di latte con elevato valore particolarmente adatto alla trasformazione casearia sebbene i volumi prodotti siano modesti. Alla luce di queste considerazioni, il presente progetto di ricerca si propone di produrre formaggio Pecorino di Gentile di Puglia utilizzando caglio in pasta arricchito di batteri lattici.

MATERIALI E METODI - I formaggi sono stati prodotti seguendo un protocollo tradizionale utilizzando caglio in pasta di agnello secondo il seguente disegno sperimentale: formaggio con caglio in pasta di agnello tradizionale (denominato formaggio controllo- C), formaggio prodotto con caglio in pasta d'agnello contenente *Lactobacillus acidophilus* (denominato formaggio LA), e formaggio prodotto con un mix (1:1) di *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium longum*; (denominato formaggio BB). Il caglio in pasta aveva un contenuto in chimosina:pepsina pari ad 80:20. I microrganismi probiotici sono stati incorporati nel caglio in pasta prima di ciascuna lavorazione in una concentrazione pari a 10^9 ufc/g di caglio.I formaggi sperimentali sono stati sottoposti a maturazione per 45 giorni. I campioni di formaggio sono stati analizzati per la determinazione: del pH (IDF, 1989), dell'umidità IDF, 1986), dei lipidi totali (Soxtec™ 2055 Foss Electric), del sale (IDF, 1988), delle frazioni azotate: azoto totale, azoto non caseinico, azoto non proteico e azoto solubile in acido fosfotungstico (Kjeltec 1035 Auto Sempler System, Foss, Sweden), degli amminoacidi liberi (Santillo et al.2007) e degli acidi grassi liberi (De Jong e Badings, 1990).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La composizione chimica del formaggio pecorino prodotto da latte di Gentile di Puglia, a 45 giorni di maturazione, è riportata in Tabella 1. Il valore del pH risulta essere più basso nel formaggio contenente probiotici rispetto al formaggio controllo a seguito della maggiore spinta acidificante operata dai batteri probiotici presenti nei formaggi BB ed LA. Il contenuto in caseina nei formaggi sperimentali è risultato essere più elevato nel formaggio controllo rispetto ai formaggi BB ed LA. In particolare, il valore di azoto non caseinico espresso sull'azoto totale risulta essere più elevato nel formaggio LA rispetto ai formaggi C e BB; al contrario le frazioni di azoto non proteico e di azoto solubile in acido fosfotungstico espressi sull'azoto totale risultano essere più elevati nel formaggio BB. Gli aminoacidi liberi (acido glutammico, serina, glicina, arginina, triptofano, isoleucina) mostrano valori più elevati nei formaggio contenente bifidobatteri; gli aminoacidi liberi valina, fenilalanina fanno registrare valori più elevati nel formaggio contenente *L. acidophilus*.

Gli agenti della lipolisi sono riconducibili alle lipasi endogene del latte, le lipasi apportate dal caglio in pasta, e agli enzimi lipolitici associati alla microflora lattica. Tra gli acidi a corta catena, l'acido butirrico è risultato essere più elevato nel formaggi contenenti probiotici rispetto al formaggio controllo. Il contenuto in isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA) ha mostrato elevati livelli nel formaggio contenente probiotici rispetto al formaggio controllo. Alcuni autori riportano la capacità di *L.acidophilus* di isomerizzare l'acido linoleico in CLA, quale meccanismo di detossificazione nei confronti dell'acido linoleico (Alonso, 2003). I risultati di questo progetto contribuiscono a definire le caratteristiche del formaggio Pecorino prodotto da latte di Gentile di Puglia che sintetizza elementi di tradizionalità e di innovazione graditi al consumatore associati ad elevati contenuti nutrizionali e salutistici.

Tabella 1 - Composizione del formaggio pecorino da latte di pecora Gentile di Puglia a 45 giorni di maturazione.

Parametro	C	BB	LA	ESM	Effetto
Umidità, %	34,05	33,43	34,88	0,19	NS
Estratto etereo, %	26,70^a	31,80^b	29,96^a	0,7	***
NaCl/U, %	2,78	2,11	2,82	0,03	NS
pH	5,26^b	5,02^a	5,03^a	0,05	**
Caseina, %	29,46^b	23,85^a	24,32^a	0,4	**

C = formaggio prodotto con pasta caglio di agnello tradizionale.
BB = formaggio prodotto con pasta di caglio di agnello contenente *B. longum* e *B. lactis.*
LA = formaggio prodotto con pasta di caglio di agnello contenente *L. acidophilus*.
ESM = errore standard medio. ** = P < 0,01 *** = P < 0,001 NS = non significativo.

Probiotic pecorino cheese from gentile di puglia ewe milk

Key words: sheep Gentile di Puglia, probiotic, pecorino cheese.

Bibliografia

Albenzio M., Corbo R., De Angelis M., Sevi A., Gobbetti M. (2001), Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. J. Dairy Sci. 84: 551-561.

Albenzio M., Santillo A., Caroprese M., Marino R., Trani A., and Faccia. M. (2010), Biochemical patterns in ovine cheese: Influence of probiotic strains. J. Dairy Sci. 93:3487-3496.

Alonso L., Cuesta E. P, and Gilliland S. E. (2003), Production of free conjugated linoleic acid by Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei of human intestinal origin. J. Dairy Sci. 86:1941-1946.

Corbo M.R., Albenzio M., De Angelis M., Sevi A., and Gobbetti M. (2001), Microbiological and biochemical properties of Pecorino hard cheese supplemented with bifidobacteria. J. Dairy Sci. 84:551-561.

de Jong, C., and Badings H.T. (1990), Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedures of extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. J. High Resol. Chromatogr. 13:94-98.

Santillo A., Albenzio M., Bevilacqua A., Corbo M.R., Sevi A. (2012), Encapsulation of probiotic bacteria in lamb rennet paste: effects on the quality of Pecorino cheese. J. Dairy Sci. 95: 3489-3500.

Santillo A., Caroprese M., Marino R., Muscio A., Sevi A., Albenzio A. (2007), Influence of lamb rennet pasta on composition and proteolysis during ripening of Pecorino foggiano cheese. Int. Dariry J. 17: 535-546.

Indagine epidemiologica sulla sieroprevalenza della paratubercolosi ovina in provincia di Latina (Regione Lazio, Italia)

G. SARALLI, M. SALA, G. BRUNI, E. CIARLA, E. CROSATO, A. MANOCCHIO, T. PEGORIN, R. TOMMASI, A. FAGIOLO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana

Parole chave: paratubercolosi, ovini, sieroprevalenza, Latina.

INTRODUZIONE - La paratubercolosi (*Malattia di Johne*) è una malattia contagiosa tipica dei ruminanti, sostenuta da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), ad andamento cronico evolutivo che colpisce l'intestino, provocando agli animali grave scadimento delle condizioni generali, diminuzione della produzione lattea, diarrea intermittente, anemia, talvolta febbre, edema intermandi-bolare, fino alla morte (Vicenzoni, 2003).
È una malattia diffusa in tutto il mondo, soprattutto nei Paesi dove l'allevamento dei ruminanti è sviluppato e in particolare dove il clima è umido e temperato. Diversi studi condotti negli allevamenti bovini da latte riportano prevalenze comprese tra il 7 e il 55% (Vicenzoni, 2003). Scarsi sono invece i dati riguardo agli allevamenti ovi-caprini, dove comunque in genere si evidenzia una prevalenza minore rispetto al bovino, sia a livello di allevamenti (da 0,4-1,5% a 29-39%) che a livello di animali sieropositivi in allevamenti infetti (da 0,3% a 15,4%). Tuttavia, in alcune aree, sono stati trovati fino al 73,7% degli allevamenti infetti (Attili *et al.*, 2011).
Negli ovini e nei caprini la malattia è molto spesso asin-tomatica (Munjal *et al.*, 2005).
In ogni caso è una malattia di grande impatto economico, sia per le sue ripercussioni negative sulle produzioni zootecniche (Hasanova *et al.*, 2006), sia per la possibile correlazione che Map può avere nel determinismo del *Morbo di Crohn* (Sechi *et al.*, 2005) e del diabete mellito di tipo I nell'uomo (Rosu *et al.*, 2009).
MATERIALI E METODI - Al fine di stimare la reale diffusione della paratubercolosi ovina negli allevamenti della provincia di Latina, è stata eseguita una indagine epidemiologica utilizzando i campioni prelevati nell'ambito dei controlli ufficiali per il piano di eradicazione della bru-cellosi ovi-caprina.
La popolazione di allevamenti e di animali da controllare è stata scelta casualmente tra gli allevamenti iscritti in Anagrafe Zootecnica aventi una consistenza superiore a 100 capi, considerando una prevalenza attesa del 50% (ER 10%; LC 95%). Per l'indagine sono stati controllati 22 allevamenti distribuiti su tutto il territorio della provincia di Latina. In ciascun allevamento è stato effettuato uno screening sierologico su 30 soggetti di età superiore a 24 mesi, per u totale di 712 capi. Le prove sono state eseguite mediante un test immunoenzimatico utilizzando il Kit ELISA IDVET ID Screen® Paratuberculosis Indirect - test di screening. La lettura è stata eseguita con lettore a IR con filtro a 450 nm. In accordo a quanto indicato dal produttore del kit, il cut-off è stato fissato per un valore S/P = 60%, pertanto tutti i campioni con valori S/P ≥ 60% sono stati considerati reattivi e sottoposti a conferma utilizzando il Kit ELISA IDVET ID Screen® Paratuberculosis Indirect - test Confirmation bicu-pola. I campioni con valori S/P > 70% sono stati considerati positivi, mentre quelli con valori S/P ≤ a 70% e ≥ 60% sono stati considerati dubbi e quelli con valori S/P < a 60%, negativi.
RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Nei 22 allevamenti controllati, soltanto 6 sono risultati negativi; da 16 allevamenti (72.7%) è risultato almeno un animale siero-positivo e, quindi, sono stati considerati infetti. I capi risultati positivi sono stati 51 (7.2%), mentre la percentuale di capi risultati positivi per ciascuna azienda è stata calcolata per classi di prevalenza e risultata variabile tra 9.5 e 28.6% (Fig. 1).
I risultati evidenziano che la paratubercolosi è diffusa negli allevamenti della provincia di Latina. Il tasso di prevalenza è significativo, in linea con quanto riportato da analoghe indagini epidemiologiche condotte in altre aree dell'Italia Centrale (Attili *et al.*, 2011) o su base europea (Nielsen *et al.*, 2009). Tuttavia si ritiene necessario integrare l'indagine epidemiologica anche con una valutazione dei potenziali fattori di rischio maggiormente associati agli stati di infezione da Map e del rischio di diffusione attraverso il latte; ciò al fine di promuovere adeguati piani di controllo e di gestione sanitaria degli allevamenti basati sulla biosicurezza e la prevenzione della diffusione della malattia anche attraverso le produzioni lattiero-casearie, considerando che l'esportazione verso taluni Paesi Terzi (Cina, India) richiede già oggi garanzie sull'assenza di circolazione di Map negli allevamenti (Favila-Humara *et al.*, 2010).

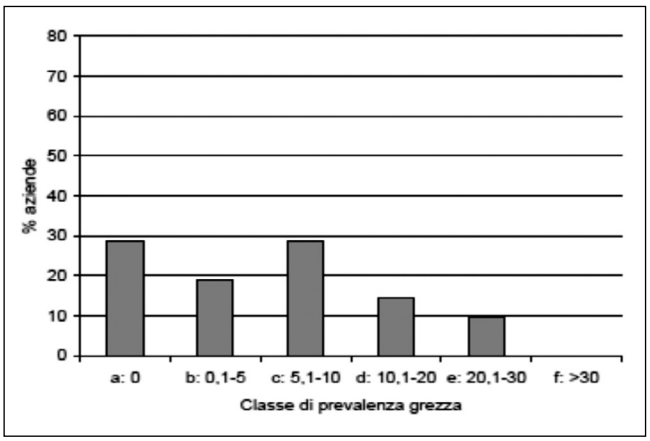


Figura 1 - Distribuzione aziende per classi di prevalenza intra-aziendale grezza.

Seroprevalence study of ovine para-tuberculosis in flocks reared in the latina province, Lazio region, Italy

Key words: paratuberculosis, sheep, seroprevalence, Latina.

Bibliografia

Attili A.R., Ngu Ngwa V., Preziuso S., Pacifici L., Domesi A., Cuteri V. (2011), Ovine paratuberculosis: a seroprevalence study in dairy flocks reared in the Marche region, Italy. Vet Med Int 2011: 782875 Epub 2011 Aug 24.

Favila-Humara L.C., Chávez-Gris G.G., Carrillo-Casas E.M., Hernández-Castro R., (2010), Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis detection in individual and bulk tank milk samples from bovine and caprine flocks. Foodborn Path Dis 4: 351-5.Vicenzoni G. (2003), Paratubercolosi. Epidemiologia e diffusione. Atti S.I.B. 35: 475-84.

Hasanova L., Pavlik I. (2006), Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. Vet Med 51(5): 193-211.

Munjal S.K., Tripathi B.N., Paliwal O.P. (2005), Progressive immunopathological changes during early stages of experimental infections of goats with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Vet Pathol 42: 427-36.

Nielsen S.S. Tolf N. (2009), A review of prevalence of paratuberculosis in farmed animals in Europe. Prev Vet Med 88: 1-14.

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 Subsp. paratuberculosis with type-1 but not type-2 diabetes mellitus. PLoS One 4(2): e4386. doi: 10.1371/journal.pone.0004386.

Sechi L.A., Scanu A.M., Molicotti P., Cannas S., Mura M., Dettori G., Fadda G., Zanetti S. (2005), Detection and Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Chron's disease in Sardinia. Am J Gasteroenterol 100(7): 1529-36.

Piano di gestione sanitaria (PGS) per il controllo della paratubercolosi in un allevamento misto di ovini e caprini

G. SARALLI, F. GAMBERALE, G. BRUNI, T. GALLI, E. CROSATO, T. PEGORIN, R. TOMMASI, A. FAGIOLO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana

Parole chave: Paratubercolosi, ovini, caprini, prevenzione.

INTRODUZIONE - La paratubercolosi, o *Malattia di Johne*, è una malattia contagiosa dei ruminanti, ad andamento cronico evolutivo, sostenuta da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), un microrganismo di forma bastoncellare, alcool-acido resistente, Gram e Ziehl-Neelsen positivo. È particolarmente resistente al freddo, al calore, alla siccità (può sopravvivere oltre un anno in prati, pascoli, acque, deiezioni), capace di infettare diversi ruminanti, sia domestici (bovini, caprini, ovini, bufalini) che selvatici (caprioli, cervi), oltre che altre specie (suini, cavalli, conigli, volpi, primati). La trasmissione si realizza prevalentemente per via oro-fecale e, nei giovani soggetti, anche attraverso il colostro o il latte infetto; eccezionalmente per via intrauterina. È una malattia diffusa in tutto il mondo, con prevalenze negli allevamenti comprese tra 7 e 55% e percentuali di animali sieropositivi negli allevamenti infetti variabili dal 10 al 25%. In Italia si stima una prevalenza intorno al 27% (Vicenzoni, 2003).

Negli ovini e caprini la malattia è molto spesso a decorso sub-clinico, asintomatica, che soltanto nella fase cronica può manifestarsi con dimagramento progressivo, disidratazione, diminuzione della produzione lattea, diarrea intermittente, anemia, talvolta febbre e edema intermandibolare, fino alla morte (Munjal *et al.*, 2005). I sintomi solitamente compaiono negli animali adulti i quali, a seconda di vari fattori, possono sviluppare una enterite cronica proliferativa granulomatosa e possono comportarsi anche da eliminatori.

È una malattia di grande impatto economico sia per le sue ripercussioni negative sulle produzioni zootecniche, sia per la possibile correlazione che Map può avere nel determinismo del *Morbo di Crohn* (Gaya *et al.*, 2004; Sechi *et al.*, 2005) e del diabete mellito di tipo I nell'uomo (Rosu *et al.*, 2009).

MATERIALI E METODI - In un allevamento misto (700 pecore di razza Comisana e 600 capre di razza Maltese allevate a stabulazione fissa in capannoni e alimentate solo con una razione unifeed), da alcuni anni sono stati osservati sporadici casi clinici caratterizzati da calo delle produzioni, dimagramento progressivo con conservazione dell'appetito, diarrea intermittente e conseguenti casi di mortalità, con maggiore incidenza nelle capre. I soggetti interessati erano sempre adulti di età compresa tra i 2 e i 4 anni.

Per l'accertamento diagnostico, oltre a valutazioni anamnestiche e cliniche, sono stati eseguiti esami sierologici mediante Kit ELISA IDVET ID Screen® Paratuberculosis Indirect. In una prima fase è stato eseguito uno screening finalizzato a stimare la prevalenza all'interno dei due gruppi. Il numero di capi da controllare è stato definito su base statistica ipotizzando una prevalenza attesa del 10% (IC 95%); pertanto sono stati controllati 59 ovini e 59 caprini, scelti a randoom.

Confermata la diagnosi, si è proceduto al controllo di tutti gli animali adulti di età superiore a 12 mesi al fine di individuare tutti gli animali sieropositivi nei confronti di Map e poter defi-nire un PGS dell'allevamento per il controllo della malattia.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Le valutazioni anamnestiche e cliniche hanno consentito di formulare un sospetto di diagnosi di paratubercolosi; la conferma è stata ottenuta dalle prove sierologiche eseguite nella prima fase di screening, riscontrando il 12 e il 46% di positività rispettivamente negli ovini e nei caprini. Sulla base dei risultati ottenuti, si è ritenuto necessario definire un PGS dell'allevamento basato sulla biosicurezza e la prevenzione del rischio di trasmissione della malattia. Dopo il controllo sierologico di tutti gli animali adulti, sia le pecore che le capre sono state suddivise in due gruppi separati - infetti e sani - stabulati in capannoni debitamente distanti tra loro. In più sono state stabilite una serie di norme di condizionamento ambientale e gestione delle attività basate sull'igiene e buone pratiche di allevamento, ovvero: evitare la promiscuità tra pecore e capre; organizzare i parti in locali puliti e asciutti; razionalizzare l'allattamento durante lo svezzamento affinché i lattanti non permangano per lungo tempo con le madri; pulire frequentemente tutti gli ambienti, comprese le stalle, evitando la lettiera permanente; creare corsie preferenziali per l'accesso degli animali alla sala mungitrice; mungere prima gli animali sani e poi quelli infetti, avendo cura di procedere ad accurata pulizia e disinfezione di pavimenti e attrezzature alla fine di ogni fase di mungitura. Inoltre, è stato stabilito un piano di riforma degli animali infetti a medio/lungo termine, avendo cura di selezionare la quota di rimonta solo tra i nati da madri sane e, in caso di introduzione di soggetti da altri allevamenti, richiedere garanzie sanitarie specifiche. Per valutare l'efficacia del piano, sono stati programmati controlli sierologici a frequenza almeno annuale di tutti gli animali sieronegativi e accertamenti diagnostici diretti (esame colturale e PCR su feci) su tutti i casi clinici osservati. Inoltre, è previsto anche un monitoraggio di altre patologie parassitarie e infettive che possono condizionale sia lo stato di salute degli animali che le loro performance zootecniche e produttive.

In conclusione, gli autori ritengono che la messa a punto di un adeguato PGS delle greggi consente il controllo della malattia, la riduzione di perdite economiche e, sebbene a lungo termine, anche l'eradicazione con la possibilità di conseguire, come per la specie bovina, una certificazione sanitaria degli allevamenti. Questo modello di gestione rappresenta l'unico strumento valido attuabile dagli allevatori, alternativo a misure di controllo più drastiche, basate per esempio sulla eliminazione degli animali infetti. Tale strategia risulterebbe economicamente non sostenibile e di indubbia efficacia, stante i limiti legati sia alle caratteristiche eziopatogenetiche della malattia che alla scarsa sensibilità dei metodi diagnostici per la rilevazione delle infezioni precoci.

GMP for paratuberculosis control in sheep and goat herd

Key words: paratuberculosis, sheep, goats, prophylaxis.

Bibliografia

Gaya D.R., Black R.A., McKenzie J.E. (2004), Chron disease and MAP. Lancet 364: 2179.

Munjal S.K., Tripathi B.N., Paliwal O.P. (2005), Progressive immunopathological changes during early stages of experimental infections of goats with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Vet Pathol 42: 427-36.

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 Subsp. paratuberculosis with type-1 but not type-2 diabetes mellitus. PLoS One 4(2): e4386. doi: 10.1371/journal.pone.0004386.

Sechi L.A., Scanu A.M., Melicotti P., Cannas S., Mura M., Dettori G., Fadda G., Zanetti S. (2005), Detection and Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Chron's disease in Sardinia. Am J Gasteroenterol 100(7): 1529-36.

Vicenzoni G. (2003), Paratubercolosi. Epidemiologia e diffusione. Atti S.I.B. 35: 475-84.

Analisi di parentela con il 50K *goat SNP chip* in *Capra hircus*

A. TALENTI[1], E.L. NICOLAZZI[2], S. CHESSA[3], B. COIZET[1], S. FRATTINI[1], L. NICOLOSO[1], G. PAGNACCO[1], P. CREPALDI[1]

[1] Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie e sanità pubblica, Milano, Italia
[2] Fondazione Parco Tecnologico Padano, Lodi, Italia
[3] Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, Consiglio Nazionale delle Ricerche, U.O.S di Lodi, Italia

Parole chiave: analisi di parentela, SNP, *Capra hircus.*

INTRODUZIONE - La conoscenza delle parentele, insieme a quella delle *performance* produttive dei capi allevati, è di fondamentale importanza per il miglioramento genetico delle specie di interesse zootecnico. La classe di marcatori attualmente più utilizzata per le analisi di parentela è costituita dai microsatelliti, disponibili per diverse specie, inclusa quella caprina (www.isag.us/Docs/consignmentforms/02_PVpanels_ LPCGH.doc). Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato l'efficacia dei marcatori di singolo nucleotide (SNP) per l'analisi di parentela (McClure et al.,2012). Nei bovini, ad esempio, l'ISAG (*International Society for Animal Genetics*) ha reso disponibile un pannello di 100+100 SNP (www.isag.us/Docs/Cattle-SNP-ISAG-core-additional-panel-2013.xlsx). Scopo di questo lavoro è stato quello di utilizzare il 50K *Goat SNP Chip* (Tosser-Klopp et al. 2014) per studiare le relazioni di parentela nella specie caprina.

MATERIALI E METODI - L'analisi è stata svolta su un campione di 109 esemplari, 8 maschi e 101 femmine, appartenenti alla razza cosmopolita Camosciata delle Alpi. Dei 109 animali, 38 costituivano 20 triplette Padre-Madre-Figlia. Il DNA, estratto da campioni ematici e sottoposto ai necessari controlli qualitativi, è stato inviato al laboratorio LGS (Laboratorio Genetica e Servizi) per la genotipizzazione con il 50K *Goat SNP Chip*. I dati di genotipizzazione ottenuti sono stati sottoposti ad *editing* tramite il *software* PLINK (Purcell et al. 2007), escludendo i marcatori con caratteristiche qualitative insufficienti secondo i seguenti criteri: frequenza dell'allele minore inferiore all'1%; genotipo mancante (*missing*) in un numero di esemplari superiore al 5%; assenza dell'equilibrio di Hardy-Weinberg con soglia di significatività corretta al test di Bonferroni. Lo studio delle relazioni di parentela è stato quindi effettuato con due approcci differenti: il calcolo degli errori mendeliani e della parentela genomica, quest'ultima calcolata con il *software* GCTA64 (Yang et al. 2011).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - La fase di *editing* ha portato all'esclusione di 3738 marcatori individuati da almeno una delle soglie sopra descritte. Sul *dataset* ottenuto, costituito da 49609 SNP, è stata condotta l'analisi di parentela tramite il calcolo degli errori mendeliani (EM) e della parentela genomica (PG). Con questi parametri è stato possibile identificare 16 triplette Padre-Madre-Figlia (PF e MF), confermandone 10 fra quelle dichiarate dagli allevatori e individuandone 6 non dichiarate (Fig. 1 e Tab. 1). Le 10 triplette confermate hanno PG e EM (media±ES) rispettivamente pari a 0,48±0,01 e 21,25±1,11. Le 10 triplette dichiarate dagli allevatori e non confermate dalle nostre analisi hanno invece PG e EM (media±ES) rispettivamente pari a 0,11±0,05 e 3632,55±433,42 (Tab. 1). Le 6 nuove triplette individuate hanno valori di PG ed EM coerenti con le medie rilevate per le triplette confermate. L'unica eccezione è costituita dall'ultimo confronto, che presenta valori di PG ed EM anomali, dovuti probabilmente al fatto che il becco è il padre sia della madre che della figlia. Grazie ai risultati ottenuti dall'analisi di questo pannello, si stanno sviluppando pannelli di dimensioni ridotte che permetteranno di utilizzare anche nella specie caprina i marcatori SNP per l'identificazione delle relazioni di parentela a costi inferiori rispetto alle metodiche attuali, facilitando il miglioramento genetico di questa specie.

Tabella 1 - Triplette dichiarate e individuate dalle analisi.

Padre	Madre	Figlia	EM_{PF}	EM_{MF}	PG_{PF}	PG_{MF}
Triplette non confermate						
BB1	BAa095	Prim45	4752	4232	0,0053	-0,0193
BB3	BAa106	Prim57	4977	13	-0,0779	0,4682
BB3	BAa120	Prim86	3372	4655	0,091	-0,0472
BB2	BAa042	Prim80	5988	11	0,0552	0,7303
BB4	BAa126	Prim92	4442	4332	-0,0073	-0,016
BB5	BAa150	Prim78	20	3776	0,4864	0,1459
BB6	BAa027	Prim18	4480	3994	0,0192	-0,0194
BB7	BAa135	Prim53	4557	5580	-0,0191	-0,0543
BB7	BAa151	Prim68	4774	17	-0,0334	0,4635
BB6	BAa003	Prim73	4322	4357	0,0309	-0,0403
		$\bar{\chi} \pm ES$	3632,55±433,42		0,11±0,05	
Triplette confermate						
BB5	BAa100	Prim38	16	17	0,4628	0,4884
BB5	BAa142	Prim55	25	23	0,4764	0,4744
BB4	BAa067	Prim29	18	20	0,5313	0,5474
BB4	BAa078	Prim65	32	26	0,5235	0,558
BB6	BAa001	Prim79	21	13	0,4834	0,4151
BB7	BAa128	Prim33	22	20	0,4958	0,4516
BB1	BAa154	Prim46	27	19	0,5085	0,43
BB1	BAa154	Prim47	25	27	0,5033	0,4067
BB3	BAa083	Prim09	24	21	0,4308	0,4287
BB6	BAa002	Prim62	15	14	0,4924	0,4414
		$\bar{\chi} \pm ES$	21,25±1,11		0,48±0,01	
Nuove Triplette individuate						
	BB1 BAa071	BAa043	17	23	0,5251796	0,5474
BB3	BAa151	Prim68	28	17	0,4404291	0,4636
BB5	BAa147	Prim78	20	18	0,4864442	0,4807
BB7	BAa114	Prim18	28	18	0,4876373	0,4432
PV67	PV47	PV03	17	17	0,558147	0,5919
BB1	BAa042	Prim80	1479*	11	0,5659617	0,7303*

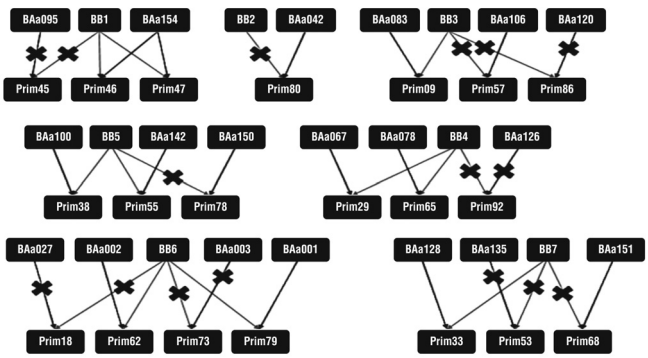


Figura 1 - Errate relazioni di parentela individuate tramite le analisi.

Parentage analysis with 50k goat snp chip in *Capra hircus*

Key words: parentage Analysis, SNP, *Capra hircus.*

Bibliografia

McClure M., Sonstegard T., Wiggans G. & Van Tassell C. (2012), Imputation of microsatellite alleles from dense SNP genotypes for parental verification. Frontiers in genetics, 3:140.

Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira MAR, Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker PIW, Daly MJ. & Sham PC. (2007), PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. Am J Hum Genet, 81.

Tosser-Klopp G., Bardou P., Bouchez O., Cabau C., Crooijmans R., et al. (2014), Design and Characterization of a 52K SNP Chip for Goat. PlosONe,9e86227.

Yang J., Lee SH, Goddard ME and Visscher PM. (2011), GCTA: a tool for Genome-wide Complex Trait Analysis. Am J Hum Genet. 88(1): 76-82.

www.isag.us/Docs/consignmentforms/02_PVpanels_LPCGH.doc.

www.isag.us/Docs/Cattle-SNP-ISAG-core-additional-panel-2013.xlsx.

MINI SIMPOSIO

La coccidiosi negli ovini in Italia: strategia di controllo e cura

Indagine epidemiologica sulla coccidiosi ovina. Dati preliminari sul programma ElanCOX

N. D'AVINO, Y. ABBATE, M. GOBBI, S. BROCCATELLI, E. CORDOVANI, M. SEBASTIANELLI, G. FILIPPINI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Parole chiave: coccidiosi, ovini, parassitosi.

INTRODUZIONE - La Coccidiosi è una malattia ad eziologia parassitaria sostenuta da protozoi appartenenti al Phylum *Apicomplexa*, Ordine *Eucoccidiorida*, Classe *Sporozoasida*, Famiglia *Eimeriidae*, Genere *Eimeria*. Si tratta di protozoi a diffusione cosmopolita, specie-specifici, con ciclo diretto. Ad oggi sono state identificate 11 specie di *Eimeria* negli ovini, differenziabili in base alle loro caratteristiche morfologiche, ai tempi di sporulazione delle oocisti ed al tratto di intestino prevalentemente parassitato. *E. crandallis* e *E. ovinoidalis* sono le due specie ritenute a maggiore potere patogeno, colonizzano sia il piccolo che il grosso intestino, provocano malattia prevalentemente negli agnelli con sintomatologia caratterizzata da stati di inappetenza fino all'anoressia, feci molli fino alla diarrea profusa, disidratazione, a volte morte.

CICLO BIOLOGICO - Il ciclo biologico di *Eimeria* nell'ovino è del tutto sovrapponibile al ciclo descritto in letteratura per il genere *Eimeria*. Si tratta di un ciclo diretto contraddistinto da una fase esogena, in cui si assiste alla sporulazione delle oocisti immature emesse nell'ambiente attraverso le feci degli animali parassitati, e da una fase endogena strettamente parassitaria, in cui il protozoo all'interno delle cellule della mucosa intestinale va in contro ad una serie di fasi di riproduzione asessuata, fasi schizogoniche, dalle quali avranno origine gli schizonti contenenti i merozoiti. Dai merozoiti, differenziati in microgamete (maschile) e macrogamete (femminile) tramite riproduzione sessuata avrà origine lo zigote, che previo rivestimento di un doppio strato di parete viene emesso all'esterno con le feci sotto forma di oociste non sporulata. La maturazione delle oocisti è condizionata sia dalla specie di *Eimeria*, sia dalle condizioni ambientali. Umidità, temperatura e presenza di ossigeno sono i parametri ambientali che più di tutti incidono sulla sporulazione. È noto come le oocisti sporulate abbiano un elevato grado di resistenza a condizioni ambientali avverse, da diversi mesi a oltre un anno, ma l'esposizione diretta ai raggi solari e temperature inferiori ai -30°C e superiori ai 63°C risultano letali.

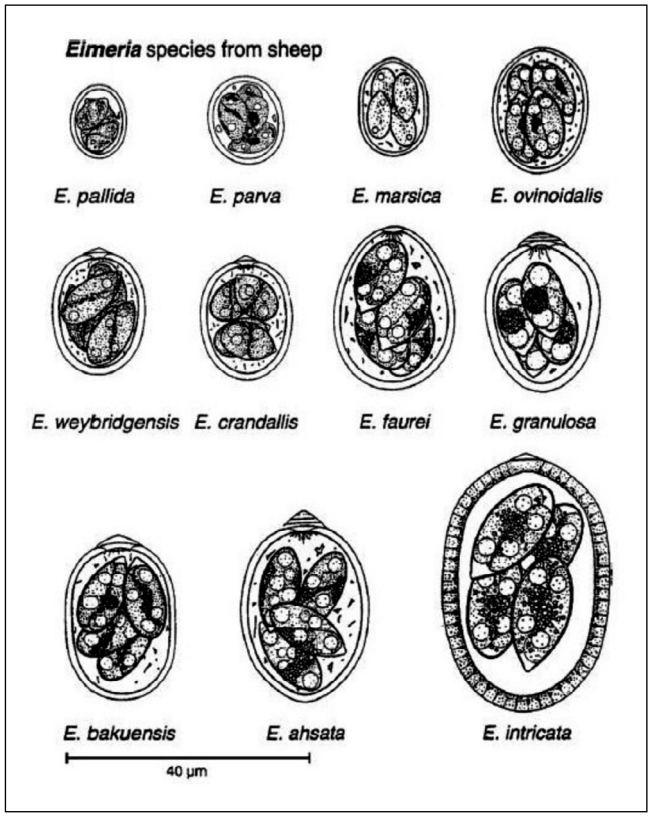


Figura 1 - Oocisti sporulate delle principali specie di Eimeria nella pecora (Eckert et al, 1995).

SINTOMATOLOGIA - La coccidiosi si manifesta classicamente negli animali giovani da 1 a 6 mesi di età. Il sintomo principale è generalmente la diarrea**,** caratterizzata da feci da poco conformate a francamente diarroiche, con presenza di muco, a volte striate di sangue, di colore dal marrone al giallo. La condizione può essere aggravata da uno stato di inappetenza fino all'anoressia con perdita di peso e disidratazione. In alcuni casi si può assistere alla morte improvvisa degli agnelli in assenza di sintomi enterici evidenti.

La severità con cui si possono manifestare i sintomi di una coccidiosi è correlata al potere patogeno della specie di *Eimeria* coinvolta, alla dose infettante ed al numero delle fasi schizogoniche associate ad una risposta immunitaria inadeguata da parte del soggetto colpito. È ovvio che tutte le condizioni legate alle tecniche d'allevamento che provocano stress e le condizioni igieniche scadenti possono condizionare negativamente il sistema immunitario degli animali e contribuire alla comparsa di coccidiosi clinicamente manifesta. D'altro canto la gravità delle manifestazioni cliniche può essere ulteriormente condizionata da fattori concomitanti quali la presenza di altri agenti eziologici batterici e virali oppure di altre specie parassitarie così come di più specie di *Eimeria* con il conseguente interessamento di più tratti di mucosa intestinale.

Non è infine infrequente assistere a forme di coccidiosi subclinica in cui l'unico sintomo evidente è rappresentato da un mancato o rallentato incremento ponderale.

PERDITE ECONOMICHE - La coccidiosi è una malattia parassitaria molto diffusa nell'allevamento ovino, considerata una fra le principali cause di perdite economiche legate da un lato alle spese sostenute per eventuali prestazioni veterinarie e terapeutiche, dall'altro ai mancati guadagni derivanti da un insufficente o rallentato incremento ponderale con conseguente perdita delle produzioni. Riuscire a quantizzare il costo della coccidiosi non è agevole, tuttavia alcuni autori hanno messo in evidenza le differenze nelle performance produttive tra gruppi di rimonte trattati con coccidiostatici e non trattati e valutando quindi le rese alla prima lattazione, risultate decisamente superiori nei gruppi trattati.

DIAGNOSI - La diagnosi di coccidiosi si basa sui rilievi anamnestici, gli eventuali rilievi anatomopatologici e sull'esame coprologico quantitativo. Il conteggio delle oocisti nei campioni di feci rappresenta sicuramente una tecnica di supporto alla diagnosi ma va interpretata con attenzione poiché può risultare fuorviante. Non necessariamente un numero elevato di oocisti per grammo di feci (o.p.g.) è sinonimo di coccidiosi, ma andrebbe effettuata l'identificazione delle specie di *Eimeria* coinvolte per valutare la presenza di quelle considerate più patogene.

PROGRAMMA ELANCOX - Nel triennio 2010-2012 presso il laboratorio di diagnostica generale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche sono stati effettuati 212 esami necroscopici di agnelli provenienti dal centro-sud Italia. Nel 68% dei soggetti analizzati la causa di morte era da imputare a patologia enterica ed è stato possibile identificate nell'11% dei casi la coccidiosi come causa primaria di malattia, nel 12% associata ad altri agenti eziologici batterici, virali e parassitari.

Dalla valutazione dei dati in nostro possesso e dalla volontà da parte della Elanco di fornire una consulenza tecnico- diagnostica a favore del settore ovino è nato il progetto ElanCox, il cui obiettivo principale è proprio quello di effettuare un indagine epidemiologica relativa alla

coccidiosi negli allevamenti ovini italiani relativamente a specifici aspetti quali verificare il grado medio di infestione parassitaria in allevamento, fornire un supporto diagnostico in corso di focolai di sospetta coccidiosi, valutare la presenza contemporanea di più specie di *Eimeria* nello stesso gruppo di animali, identificare le varie specie di *Eimeria* eventualmente presenti con particolare riferimento ad *E. crandallis* ed *E. ovinoidalis*.

MATERIALI E METODI - Nell'ambito dell'allevamento ovino è consuetudine concentrare il momento dei parti in determinati periodi dell'anno. Questa prassi gestionale comporta la presenza di un cospicuo numero di animali suscettibili per età nei confronti della coccidiosi. Per contro negli intervalli temporali tra i parti la quota numericamente più consistente di animali giovani è rappresentata dalle agnelle da rimonta, una categoria generalmente non più suscettibile alla coccidiosi clinica. Ovviamente le differenti tecniche d'allevamento nelle diverse realtà regionali possono rispettare o meno questo andamento ciclico.

Da questa considerazione iniziale è scaturita la necessità di stilare un duplice protocollo diagnostico che prendesse in considerazione sia la possibilità di predisporre un campionamento dei soggetti giovani con sospetta coccidiosi clinica, sia delle rimonte e degli animali adulti. Questo duplice approccio consente in entrambi i casi di ottenere informazioni relative al grado di infestione e specie di *Eimeria* presenti e di fornire un supporto diagnostico per confermare un eventuale focolaio di coccidiosi o per effettuare un monitoraggio parassitologico completo. Le modalità di campionamento prevedono il prelievo di 15-20 campioni di feci da agnelli sintomatici nell'eventualità di un sospetto focolaio di coccidiosi, oppure il prelievo di 15 feci di soggetti adulti e 5 di agnelle da rimonta nell'ottica di effettuare un monitoraggio parassitologico. I campioni così collezionati, accompagnati da una scheda anamnestica, vengono recapitati in laboratorio in 24h.

I campioni vengono processati con la tecnica Flotac® *double technique* e *dual technique* e parallelamente allestiti in coproculture per ottenere la sporulazione e conseguente identificazione delle eventuali specie di *Eimeria* presenti secondo la procedura descritta da Eckert *et al.*

RISULTATI PRELIMINARI E CONSIDERAZIONI - Al momento sono stati conferiti i campioni provenienti da 12 allevamenti ovini. Di questi un solo allevamento ha inviato 15 campioni di agnelli con sintomi clinici mentre gli altri undici campionamenti sono stati prelevati con la formula di 15 adulte e 5 rimonte. Vista l'esiguità dei dati al momento disponibili è possibile trarre solo delle considerazioni preliminari. Nell'unico allevamento con sintomi clinici riferibili a coccidiosi è stata rilevata una carica parassitaria media di 26,876 o.p.g. ed è stata identificata fra le varie specie di *Eimeria* presenti *E. crandallis*. Per quanto riguarda invece gli altri campioni conferiti, come già visto in altri studi, quello che emerge ad una prima valutazione è una positività nel 100% degli allevamenti analizzati, una sostanziale differenza nel numero di oocisti escrete, costantemente maggiore nel gruppo delle rimonte rispetto a quello delle pecore adulte, la compresenza di almeno 3 specie diverse di *Eimeria* e la presenza in tutti gli allevamenti analizzati di *E. crandallis* o *E. ovinoidalis*. Sarà interessante col procedere del campionamento osservare lo sviluppo dei dati fin qui raccolti e mettere a disposizione degli operatori del settore ovino un supporto tecnico diagnostico ed un supporto operativo nell'ottica di fornire i giusti mezzi per il controllo e la prevenzione della coccidiosi.

Epidemiological survey on ovine coccidiosis: preliminary results on the elancox program

Key words: coccidiosis, ovine, parassitosis.

Bibliografia

Andrews A.H., (2013), Some aspects of coccidiosis in sheep and goats, Small Ruminant Research 110: 93-95.

Chartier C., Paraud C.,(2012), Coccidiosis due to Eimeria in sheep and goats, a review, Small Ruminant Research 103: 84-92.

Cringoli C., Rinaldi l., Maurelli M.P., Utzinger J.(2010) FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans, Nature protocols 5: 503-515.

Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P., (1995). Guidelines on techniques in coccidiosis research. COST 89/820. European Commission, DGXII: 103–117.

Foreyt, W.J., Hancock, D., Wescott, R.B., (1986). Prevention and control of coccidiosis in goats with decoquinate. Am. J. Vet. Res. 47: 333–335.

TAVOLA ROTONDA

Nuovi obiettivi e strumenti per la selezione degli ovini e caprini alla luce della nuova PAC e dello sviluppo delle scienze “omiche”

Politiche per lo sviluppo rurale 2014-2020. La programmazione in Puglia

P. PALLARA, G. VALENTINO

Istituto Nazionale di Economia Agraria - Sede della Puglia

Parole chiave: crescita sostenibile, aggregazione delle imprese agricole, cambiamenti climatici ed energia.

La Politica Agricola Comune (PAC) è stata oggetto negli anni di numerosi cambiamenti che hanno riguardato la sua struttura, sia in termini di distribuzione che di entità di risorse finanziarie dedicate.

I PILASTRI DELLA PAC - I vari processi di riforma, che hanno formalizzato tali cambiamenti, hanno riguardato entrambi i pilastri che costituiscono la PAC.

Il primo pilastro è stato progressivamente ridimensionato nella sua incidenza finanziaria, ma soprattutto ridisegnato, dal processo di disaccoppiamento del sostegno (sostegno non più legato alla produzione, bensì alla base produttiva) e dallo smantellamento delle tradizionali misure di sostegno al mercato.

Il secondo pilastro nel tempo è cresciuto in termini di risorse e di importanza degli strumenti adottati ai fini dello sviluppo e della trasformazione del comparto agricolo nel più generale sostegno allo sviluppo dei territori rurali.

Il processo di cambiamento è stato inoltre caratterizzato da un progressivo abbattimento del reciproco grado di "specializzazione" dei due pilastri, in termini di misure in essi attivate. Si è, infatti, assistito all'attivazione di interventi strutturali finanziati nel primo pilastro e di misure di mercato nel secondo e di misure per la qualità in entrambi. In particolare un elemento di trasversalità è rappresentato dalle tematiche ambientali che stabiliscono standard di riferimento per entrambi gli "spazi" della PAC con coincidenze importanti. Il sostegno del I pilastro è concesso in modo condizionale, cioè le risorse comunitarie vengono date all'agricoltura a patto che l'agricoltore rispetti delle norme minime di compatibilità con l'ambiente e con il benessere animale. L'ultimo processo di riforma che ha condotto all'attuale assetto della PAC e che si applicherà per il periodo 2014-2020 è stato imperniato su 3 priorità della complessiva strategia della Unione Europea, in particolare:

I. la prima è la crescita sostenibile, cioè una crescita che riprendendo la strategia di Lisbona, punta su ricerca e innovazione, su programmi europei per l'occupazione e su una politica di coesione rinnovata;
II. la seconda riguarda un capitolo estremamente rilevante delle nuove politiche comunitarie, quello dei cambiamenti climatici ed dell'energia, che trae ispirazione in primis dalla strategia di Goteborg e, oggi, da tutto il dibattito ambientale;
III. infine un terzo capitolo è incentrato sulla politica di cooperazione.

Nel dicembre del 2013 sono stati pubblicati i regolamenti che costituiscono la base giuridica della nuova PAC nel periodo 2014-2020: si tratta del regolamento sui pagamenti diretti (reg. UE 1307/13), di quello sull'OCM unica (Organizzazione Comune di Mercato - reg. UE 1308/13) e di quello sullo sviluppo rurale (reg. UE 1305/13).

Il *fil rouge* che unisce i tre regolamenti e che ne disegna i contenuti è rappresentato dai seguenti obiettivi:

1. **preservare** e rafforzare la competitività delle imprese agricole in un mondo caratterizzato da una crescente globalizzazione e da una sempre maggiore volatilità dei prezzi;
2. **migliorare** la competitività del settore agricolo e aumentare la percentuale di valore che esso rappresenta nella filiera alimentare.

Per quanto attiene l'OCM unica, il perseguimento di tali obiettivi avverrà facendo coesistere un gruppo di strumenti tradizionali (come l'ammasso privato) e una serie di strumenti nuovi (misure per il funzionamento delle filiere). L'OCM unica, in sostanza, abbandona la strada della vecchia politica di sostegno dei mercati agricoli e spinge verso l'adozione di nuovi strumenti, o il potenziamento di strumenti già esistenti, per la stabilizzazione dei prezzi e per il miglioramento delle relazioni di filiera, come le organizzazioni dei produttori (OP), le organizzazioni interprofessionali (OI), le relazioni contrattuali, la gestione del rischio, la trasparenza del mercato e le filiere corte.

METODOLOGIE DEI PROCESSI DI RIFORMA - Dal punto di vista metodologico si assiste ad un cambiamento del modello I pilastro PAC: non più prezzi garantiti, controllo dell'offerta, ammasso pubblico, ma coinvolgimento degli attori della filiera, in particolare gli agricoltori. Questo significa che attraverso la nuova PAC la stabilizzazione dei prezzi, non più fattibile con le vecchie misure di mercato, si farà tramite il rafforzamento del ruolo dei produttori.

Per quanto attiene il comparto zootecnico ovino-caprino gli strumenti messi in campo dall'OCM unica per il periodo 2014-2020 che potranno avere un effetto su di esso sono l'ammasso privato (modificato e razionalizzato rispetto al passato) e il programma specifico "Latte nelle scuole" (riproposto), ma al sopra di questi, vi è la forte spinta al rafforzamento delle organizzazioni dei produttori.

Anche sul fronte dello sviluppo rurale il comparto ovino-caprino potrà cogliere importanti opportunità, seppure non specifiche e mirate. Il nuovo regolamento è articolato in 6 priorità (invece dei quattro assi previsti per il periodo di programmazione 2007-2013) (Tab. 1). Ciascuna di queste è collegata agli 11 Obiettivi Tematici (OT) derivanti dalla strategia di Europa 2020, per il perseguimento dei quali ogni Stato Membro definisce un documento unico di programmazione, l'Accordo di Partenariato (AP), in cui è definito il contributo dello sviluppo rurale agli obiettivi comuni e i modi per coordinare le diverse politiche. A questo documento deve rifarsi il nuovo Programma di Sviluppo Rurale, caratterizzato da un cambiamento nell'approccio strategico, traducibile in una maggiore flessibilità rispetto al passato.

Tabella 1 - Priorità dello sviluppo rurale.

1. Fostering knowledge transfer and innovation in agriculture, forestry, and rural areas
2. Enhancing farm viability and competitiveness of all types of agriculture in all regions and promoting innovative farm technologies and sustainable management of forests
3. Promoting food chain organisation, including processing and marketing of agricultural products, animal welfare and risk management in agriculture
4. Restoring, preserving and enhancing ecosystems related to agriculture and forestry
5. Promoting resource efficiency and supporting the shift towards a low carbon and climate resilient economy in agriculture, food and forestry sectors
6. Promoting social inclusion, poverty reduction and economic development in rural areas

Esso presenterà una serie di misure (strumenti) che possono essere organizzate senza vincoli nel programma, purché collegate razionalmente alle priorità che per certi versi rappresentano degli accorpamenti delle misure della precedente programmazione; ad esempio il sostegno agli investimenti materiali ed immateriali (art. 17 regolamento 1305/13) raggruppa gli investimenti nelle imprese agricole, nella trasformazione, commercializzazione e sviluppo dei prodotti, nelle infrastrutture e infine negli investimenti non produttivi in campo ambientale della precedente programmazione.

La Regione Puglia, che in questi mesi sta procedendo alla messa a punto del programma regionale, ha evidenziato per il comparto zootecnico una esigenza di riorganizzazione produttiva orientata a migliorare la proposizione sui mercati più lontani, alla luce di una stagnazione economica perdurante sul mercato interno e contestualmente la necessità di contrastare la ridotta propensione degli allevatori all'aggregazione, elemento che indebolisce il potere contrattuale delle aziende nei confronti degli altri operatori della filiera.

La ridotta organizzazione produttiva e la scarsa diffusione della cooperazione e dell'associazionismo tra gli allevatori non permette l'ottenimento di quei margini di redditività in grado di mitigare ulteriormente l'aggravio dei costi.

Alla luce di tali evidenze le strategie messe in essere nel programma e che mirano a risolvere i problemi della zootecnia ovi-caprina regionale perseguono i seguenti obiettivi:

- **sostenere** i processi di ammodernamento delle imprese agricole attraverso la diversificazione dei prodotti e/o il miglioramento delle tecniche di produzione/allevamento, rispondendo alla esigenza dei mercati di beni a minor prezzo e di beni salubri, etici e di qualità;
- **favorire** i processi di aggregazione delle imprese agricole in strutture dotate di capacità e strumenti gestionali funzionali al miglioramento della organizzazione della produzione e della commercializzazione agroalimentare.
- **supportare** la creazione e il consolidamento delle filiere corte e dei loro circuiti e reti.
- **sostenere** e sviluppare ulteriormente la diversità delle specie autoctone vegetali, animali, e forestali tipiche degli ambienti agro-forestali e naturali, anche attraverso interventi finalizzati a liberare il potenziale economico delle risorse genetiche nella catena del valore, il ripristino di condizioni di seminaturalità diffusa e la connettività ecologica nonché la diffusione di pratiche specifiche, ivi compreso il metodo di produzione biologico e di altri sistemi di certificazione del rispetto della biodiversità.
- **creare** reti che favoriscano la partecipazione attiva di istituzioni, soggetti scientifici, agricoltori, selezionatori, consumatori per incrementare la base di conoscenze disponibili in tema di biodiversità agro-forestale e animale per promuovere l'uso sostenibile delle risorse genetiche.

Pare evidente che per quanto detto in riferimento alla flessibilità di utilizzo del set di misure proposte nel regolamento, tutti gli strumenti potranno essere adoperati per il miglioramento e lo sviluppo delle specifiche problematiche di comparto, pertanto sarà compito degli operatori del comparto ovi-caprino regionale immaginare un progetto di crescita economica che proietti il comparto, attraverso una sua sostanziale rivisitazione, verso una tipologia di attività che, sia pur indirizzate alla produzione tradizionale, non prescindano da elementi che la legano al substrato storico-culturale specifico dei diversi territori. In questo senso la nuova PAC, I pilastro e sviluppo rurale, offre spunti interessanti in termini di diversificazione e produzione di beni pubblici.

▮ Rural Development Policy 2014-2020. Implementation through Regional Apulia Program (RDP)

Key words: sustainable growth, producer groups, climate changes, energy use.

Nuovi obiettivi di selezione e scenari di riferimento

GIULIO PAGNACCO

Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: selezione, conservazione genetica, ovini, caprini.

A parte alcune limitate realtà, lo scenario complessivo della selezione negli ovini e nei caprini in Italia non brilla per particolare efficienza. Le razze presenti nel nostro paese sono numerosissime e spesso la conoscenza che se ne ha è così scarsa che ci si domanda come si possa operare una qualsiasi attività di selezione o di conservazione sulla base di informazioni spesso note ad un numero forse molto esiguo di cultori. Il termine stesso di razza è forse in molti casi inappropriato e andrebbe utilizzato qualcosa di meno stringente come "tipo genetico" oppure "popolazione". Solo alcune razze hanno lo status di gruppo di animali dotato di sufficiente numerosità e di caratteristiche morfologiche e funzionali abbastanza qualificanti da consentire una vera azione selettiva. Ma anche qui gli ostacoli alla realizzazione di una attività selettiva di successo sono molti e così vincolanti da pregiudicare quasi del tutto il raggiungimento di obiettivi pur minimali. Per molte altre la loro esistenza sembra essere più che altro giustificata dall'opportunità di percepire contributi economici per l'allevamento. Rimanendo tutta da dimostrare l'originalità genetica che ne motivi la presenza negli elenchi ufficiali.

Parlare di nuovi obiettivi di selezione in queste specie potrebbe essere quindi quasi velleitario, visto che i supposti "vecchi" obiettivi di selezione restano nella maggior parte dei casi un lontano miraggio. Ciononostante si vuole tentare qui una messa a fuoco delle principali problematiche col sincero intento di portare qualche luce in un comparto finora troppo negletto.

I PROBLEMI OGGETTIVI - È del tutto evidente che il primo problema nella selezione di queste specie è il limitato valore economico del singolo capo. Qualsiasi investimento selettivo si intenda fare si scontra immediatamente con lo sfavorevole rapporto costo/beneficio. Il semplice accertamento diagnostico della corretta paternità e maternità ad esempio, impone subito un impegno economico che costituisce una frazione non piccola del valore dell'animale. E la corretta identificazione è il primo e fondamentale gradino di ogni intervento selettivo, soprattutto in specie in cui la riproduzione è in larga misura affidata alla monta naturale e i gruppi di monta richiedono un impegno organizzativo e logistico non banale e talvolta disatteso. Questa difficoltà poi si ripete ad ogni controllo in cui il campione di latte da destinare all'analisi qualitativa (se questa viene fatta) può diventare una frazione importante del prodotto latteo di quella giornata. Per non parlare poi dei costi stessi dell'analisi.

Pecore e capre basano poi in minima parte il loro momento riproduttivo sull'inseminazione strumentale. Questo fatto pregiudica sostanzialmente qualunque progresso genetico non tanto perché becchi e arieti miglioratori abbiano un limitato impatto sulla genetica delle generazioni seguenti, quanto perché la mancanza di figlie in più ambienti di allevamento rende impossibile la separazione statistica tra l'effetto del maschio, ossia il suo valore genetico, e l'effetto dell'allevamento con tutta la complessa miriade di componenti ambientali, alimentazione *in primis*, che lo caratterizzano. A differenza dei bovini la selezione qui la fanno soprattutto le femmine e il risultato si vede. E d'altra parte, anche supponendo una grande disponibilità degli allevatori ad utilizzare l'inseminazione strumentale in azienda, sostenendone i costi, resta il fatto che il materiale seminale non è di fatto disponibile. Oppure, se è disponibile, proviene da importazione senza che vi sia una pianificazione nazionale per la sua produzione entro un appropriato schema selettivo.

LE DEBOLEZZE DEL SISTEMA - Schema selettivo e valutazione genetica. E questa è forse proprio la principale debolezza del sistema: la mancanza di schemi selettivi. Si sono fatti negli anni sforzi anche importanti per mettere a punto moderne procedure di calcolo degli indici di selezione, ma a parte la realtà della Sarda, vengono elaborati solo dati di campo che illustrano la variabilità di popolazioni in accoppiamento praticamente casuale. Indici genetici che hanno scarso seguito e interesse da parte degli allevatori sia perché insufficientemente conosciuti e diffusi sia perché associati a livelli di precisione troppo scarsi soprattutto per la parte maschile. È l'implementazione di un preciso schema selettivo che permetterebbe infatti di valutare i maschi in base ad un numero adeguato di figlie ben distribuite in allevamenti statisticamente connessi e quindi con attendibilità ragionevoli. Ma sarebbe necessario un centro capace di produrre materiale seminale da destinare sia alla prova che alla copertura delle femmine migliori. Sembra impossibile, ma la realizzazione di un tale centro becchi e centro arieti non riesce ad affermarsi come punto focale della selezione in queste specie. Si potrà sostenere che i costi per la sua realizzazione non si giustificano con il miglioramento genetico che potenzialmente ne scaturirebbe, perché di nuovo si tratta di produzioni quantitativamente limitate prodotte da animali il cui valore economico si ferma nel migliore dei casi a pochissime centinaia di euro. Né gli aspetti legati alla commercializzazione del seme potrebbero mai arrivare ai livelli dei bovini da latte. Nondimeno una struttura zootecnica potenzialmente riconvertibile esiste già nella disponibilità dell'organizzazione degli allevatori e un'ottimizzazione delle risorse economiche, seppur scarse, potrebbe attivare un'operatività che darebbe anche immagine ad un comparto minore, ma capillarmente diffuso sul territorio.

La qualità delle produzioni. La selezione, è superfluo sottolinearlo, si basa su dati fenotipici. Oggi si ritiene che grazie alla genomica il dato fenotipico sia superato dal dato genetico diretto, ma si tratta di un grossolano fraintendimento. L'effetto dei geni sul fenotipo deve infatti essere prima determinato da un accurato lavoro di associazione tra genotipo e fenotipo e questo rende il fenotipo più centrale che mai nella selezione, anche genomica. Ma il problema, nel caso degli ovi-caprini, è che il controllo funzionale si limita, nella maggior parte delle situazioni, a misurare solo la quantità di latte prodotto e solo in limitati casi acquisisce il campione necessario a determinarne il titolo in grasso e proteina. Le tabelle 1 e 2 riportano il numero complessivo di animali controllati per la quantità (litri) e per la qualità (titoli di grasso e proteina) negli anni 2010 – 2014 suddivisi nelle diverse razze. Nelle Capre, tabella 2, il 47% degli animali controllati è fornito anche di dati qualitativi. Un dato non certo entusiasmante se confrontato con quello dei bovini. Inoltre sono proprio le razze allevate nel meridione, di cui si è spesso elogiata la qualità del latte, quelle che mancano di questo importante dato fenotipico. L'andamento negli anni si mantiene fortunatamente costante con circa 30.000 controlli. La situazione diventa invece drammatica se, nello stesso arco temporale, consideriamo le razze ovine: qui solo il 6,3% degli animali controllati è fornito di dati qualitativi. Questa percentuale media è alta (si fa per dire!) grazie alla Sarda (11,6%), ma si riduce al 5% e al 3% per Massese e Comisana. Per tutte le altre razze i controlli per la qualità sembrano occasioni sporadiche e casuali, di fatto uno spreco di risorse. L'an-

Tabella 1 - Numero produzioni chiuse nel quinquennio 2010 – 2014 con controlli per la produzione di latte (quantità) e per il titolo in grasso e proteina (qualità). (Razze ovine, Fonte ASSONAPA 2014)

Razze Ovine	Qualità	Quantità
ALTAMURANA	1	1.270
ASSAF	47	1.437
BAGNOLESE	0	14
BARBARESCA	1	2.885
BRIGASCA	0	2.572
COMISANA	3.592	135.920
CORNELLA BIANCA	0	2
DELLE LANGHE	349	9.431
FRISONA ITALIANA	15	186
LACAUNE	0	5.713
MASSESE	1.297	28.498
METICCIA (O)	267	55.415
MOSCIA LECCESE	7	3.241
NERA DI ARBUS	181	3.703
PINZIRITA	0	84.437
ROMANOV	0	15
SARDA	114.149	979.846
VALLE DEL BELICE	0	575.356
Totale	**119.906**	**1.889.941**

Tabella 2 - Numero produzioni chiuse nel quinquennio 2010 – 2014 con controlli per la produzione di latte (quantità) e per il titolo in grasso e proteina (qualità). (Razze caprine, Fonte ASSONAPA 2014)

Razza	Qualità	Quantità
ALPINA	234	235
ARGENTATA DELL'ETNA	0	5.371
BIANCA MONTICELLANA	2.009	2.014
BIONDA ADAMELLO	498	511
CAMOSCIATA DELLE ALPI	44.298	45.632
CAPESTRINA	694	695
ASPROMONTANA	4	61.845
CAPRA SARDA	20.018	45.483
CILENTANA FULVA	1	1
CIOCIARA GRIGIA	299	301
DI POTENZA	0	40
FRISA VALTELLINESE	542	543
GARFAGNANA	8	13
GARGANICA	226	6.191
GIRGENTANA	42	2.166
JONICA	40	1.272
MALTESE	3.461	7.635
MESSINESE	2	25.461
METICCIA (C)	10.705	23.245
MURCIANA	2.007	3.139
NAPOLETANA	51	52
NICASTRESE	4.132	6.480
OROBICA	2.347	2.351
ROCCAVERANO	1.523	1.576
ROSSA MEDITERRANEA	266	4.989
RUSTICA DI CALABRIA	766	1.302
SAANEN	43.307	44.624
SARDA PRIMITIVA	163	704
TOGGENBURG	5	12
VALDOSTANA	90	90
VALLESANA	0	0
VERZASCHESE	963	964
Totale	**138.701**	**294.937**

damento temporale per gli ovini, a differenza dei caprini, è in progressivo calo.

Questa lacuna, con le eccezioni di Saanen e Camosciata, rende in pratica la selezione unicamente focalizzabile sulla quantità di latte e nessuna aggregazione tra quantità e qualità è fattibile per fornire agli allevatori uno strumento che meglio interpreti il valore economico in termini di trasformazione casearia del latte munto. Ben si capisce, tenendo presente che la destinazione quasi totale del latte di queste specie sia alla produzione di formaggio, come la mancanza di questi dati di controllo costituiscano forse il più grave handicap per una reale valorizzazione economica di queste popolazioni.

Di fronte alla limitatezza delle risorse economiche disponibili per la qualità del latte, andrebbero adottate strategie di ottimizzazione operando il controllo, come in qualche caso viene fatto, solo sulle primipare (saccaie della Sarda) o su quegli animali che garantiscono una valutazione genetica dei maschi.

GENOMICA - Negli ultimi cinque anni nella specie bovina si è verificato un fatto straordinario che ha e sta rivoluzionando lo scenario del miglioramento genetico. Si tratta della genomica. Tutto nasce dalla disponibilità di nuove nanotecnologie che permettono di leggere il genoma (DNA) in un certo numero di posizioni in cui sono presenti mutazioni puntiformi (SNP). Sebbene queste mutazioni non siano quelle causative di reali differenze fenotipiche (non si tratta cioè di mutazioni nelle sequenze codificanti o regolative dei geni e quindi con un effetto diretto), sono però mutazioni così densamente distribuite lungo il filamento di DNA da essere automaticamente in stretto linkage (correlazione) con le possibili mutazioni causative di significato selettivo ed economico. Esistono diversi tipi di Chip a DNA, ma un tipo standard a media densità saggia 54.000 SNP ad un costo per animale che non supera i 100 Euro. Grazie a questi Chip a DNA in grado di genotipizzare anche centinaia di migliaia di SNP (alta densità) in un singolo animale è possibile produrre degli indici genetici genomici. Questi indici, per i tori, non hanno la precisione (CD) di un indice basato su una solida prova di progenie e quindi sulle produzioni di qualche decina di figlie (CD ≈ 0,9), ma hanno una accuratezza molto superiore a quella di un tradizionale indice di pedigree (CD ≈ 0,3) arrivando a superare un CD di 0,7. I tori genomici possono quindi essere usati, seppure con una certa cautela, senza aspettare gli esiti di una prova di progenie. Il risultato è che in termini di progresso genetico (G) la selezione cammina con un passo quasi triplicato rispetto alla selezione fenotipica basata sul tradizionale modello infinitesimale.

Infatti, avendo presenti i termini dell'equazione che definisce la risposta selettiva, si vede facilmente che la genomica fa perdere qualcosa al numeratore, in termini di minore precisione dell'indice, ma fa guadagnare molto al denominatore con una drastica riduzione dell'intervallo di generazione (L).

$$\Delta G/anno = \frac{i \times \sqrt[2]{CD} \times \sigma_A}{L}$$

La domanda a questo punto è: si può immaginare per ovini e caprini uno scenario analogo? La risposta è: non certo per il momento, forse in futuro. Sebbene per gli ovini sia già disponibile un Chip a DNA con 60.000 SNP, per i caprini ancora non si ha uno strumento affidabile. Inoltre, come già accennato, il primo passo per una selezione genomica passa attraverso la stima dell'effetto di ogni SNP sul carattere da selezionare. Questa stima richiede una popolazione di training di svariate migliaia di animali con dati fenotipici accuratamente misurati. Solo recentemente nei bovini queste popolazioni di training hanno raggiunto una dimensione tale da garantire stime sufficientemente precise dell'effetto degli SNP. Inoltre se disponessimo di altri fenotipi oltre al latte (ad esempio la qualità in termini di grasso e proteine) potremmo senza spese aggiuntive ottenere stime anche per questi altri fenotipi e avere indici genomici anche per più caratteri. Si vede bene come si tratti di scenari ben lontani dal contesto della situazione attuale.

Tuttavia, limitando l'analisi ad un numero contenuto di SNP scelti in maniera strategica, la genomica potrebbe dare sicuramente un contributo importante alla valorizzazione selettiva di queste popolazioni. Le proteine del latte sono, ad esempio, molto ben conosciute sia negli ovini che nei caprini e presentano un ricchissimo polimorfismo anche associato ad aspetti quantitativi (ad esempio le $_{s1}$ caseine nei caprini con i loro alleli forti). Vi sono poi loci associati a forme patologiche (ad es. Scrapie) oltre a loci che per omologia con la ben più studiata specie bovina, è ragionevole che giochino un ruolo non secondario anche in ovini e caprini (ad es. DGAT1). Per non sottacere di loci implicati nel controllo di caratteri visibili come il colore e il pattern del mantello (MC1R). Una selezione di qualche decina o al massimo poche centinaia di SNP strategicamente scelti nelle regioni codificanti e regolative di questi geni potrebbe fornire con una spesa individuale di pochi Euro informazioni utilissime in ordine ad una diversificata serie di aspetti cruciali.

1. Innanzitutto un Chip a DNA custom di questo genere permetterebbe di acquisire immediatamente una identificazione individuale unica.
2. Avrebbe poi il pregio di consentire immediatamente l'accertamento di corretta paternità e maternità di ogni individuo, così dolorosamente necessario in queste specie.
3. Permetterebbe di clusterizzare gli animali sulla base di un certo numero di SNP selettivamente neutrali da includere nel Chip in modo da risolvere l'annoso problema della reale diversità genetica tra le razze (specie quelle a Registro Anagrafico) che affollano gli elenchi dei disciplinari. Questo permetterebbe anche di focalizzare gli interventi solo sui tipi genetici degni di attenzione.
4. La caratterizzazione genetica di ogni gruppo etnico permetterebbe di riconoscerne i prodotti fornendo gli strumenti per una tracciabilità genetica a difesa del produttore e del consumatore.
5. La tracciabilità dei prodotti fornisce simultaneamente la possibilità di abbinare a ogni razza un prodotto caratteristico la cui commercializzazione potrebbe innescare un virtuoso meccanismo di recupero di razze oggi a rischio di estinzione.
6. Darebbe un contributo rilevante all'eradicazione genetica di patologie e di caratteri indesiderabili che oggi comportano l'esclusione dall'iscrizione a Libro Genealogico (LG) e Registro Anagrafico (RA).
7. Sebbene non disegnato per produrre un miglioramento genetico quantitativo, un Chip custom di questo genere consentirebbe comunque una selezione per, ad esempio, uniformità del mantello e qualità delle caseine.

Un vecchio adagio recita che non si possono fare le nozze coi fichi secchi. Penso che indubbiamente, se si volesse dare a questo comparto una reale spinta innovativa che traghetti queste due specie fuori da quel sonnolento limbo da inizio secolo scorso in cui, con poche eccezioni, sono immerse, è necessario che venga fatto un deciso investimento economico, ma anche e forse soprattutto culturale. È necessario che si costituisca un tavolo tecnico che lavori con una nuova e manageriale professionalità, informando tutta l'operatività gestionale con visioni e obiettivi chiari. È necessario che le risorse vengano destinate a quelle situazioni che danno garanzia di successo e che gli stessi allevatori siano edotti del fatto che, se la selezione porta un beneficio a loro stessi, saranno proprio loro a doversene far carico con responsabilità e consapevolezza. Il controllo funzionale sia ammesso, ad esempio, solo dove dà una ricaduta diretta in termini di miglioramento genetico, con una radicale razionalizzazione dei costi. È necessario poi che il comparto sia dotato di quegli strumenti operativi (ad es. centro di produzione di seme per becchi e arieti) che lo avvicinino, almeno per le popolazioni più evolute, alle condizioni di un allevamento moderno e imprenditoriale. Condizioni per le quali il termine di pastorizia che fregia il nome dell'associazione degli allevatori, è del tutto obsoleto. E poi è necessaria una semplificazione delle formalità normative che sono radicate nei dettati dei disciplinari dei LG e RA. Infine bisogna che risorse economiche di una qualche natura vengano liberate per far fare un salto qualitativo a queste due specie. Risorse che non devono essere dell'ordine dei milioni di Euro, ma solo di una piccola frazione di un milione.

Selection objectves and breeding scenarios

Key words: selection, genetic conservation, sheep and goats.

Le tecnologie a supporto delle scienze *"omiche"*

E. CIANI

Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli Studi di Bari Aldo Moro

Parole chiave: genomica, epigenomica, proteomica, metabolomica.

INTRODUZIONE - Negli ultimi due decenni l'utilizzazione di vocaboli terminanti in "*-omico/a*" si è esteso, dall'iniziale *genomica*, ad una vasta serie di discipline biomolecolari, entrando anche nell'uso del linguaggio comune. In generale, con il suffisso "*-omico/a*" si intende lo studio di specifici aspetti considerati nel loro complesso e/o su vasta scala. La diffusione delle discipline "*omiche*" è stata resa possibile principalmente grazie allo sviluppo di tecniche di indagine *high-throughput* in grado di generare enormi quantitativi di dati relativi ai diversi livelli gerarchici di complessità biologica (DNA, mRNA, proteine, metaboliti, ecc.), contribuendo a rivoluzionare l'approccio allo studio degli esseri viventi. Assistiamo, infatti, oggi alla fase di passaggio da approcci di tipo puramente riduzionista (comprensione di fenomeni complessi attraverso la loro disaggregazione in singoli aspetti più semplici) ad approcci maggiormente orientati ad una visione sistemica, "olistica", della scienza, con la conseguente transizione da una visione più tradizionale alla ricerca, *hypothesis-driven*, ad una più moderna, *discovery-driven*.
Si fornisce, di seguito, in maniera schematica ed assolutamente non esaustiva, una panoramica delle principali discipline "*omiche*", delle tecnologie ad esse correlate e dei principali ambiti di applicazione con riferimento alle specie ovina e caprina.

GENOMICA - Come anticipato, la prima delle discipline "*omiche*" a fare la sua comparsa è stata la *genomica*, intesa come branca che affronta in modo sistematico lo studio del *genoma*. Si tratta pur sempre di disciplina relativamente giovane, se si considera, ad esempio, che il termine inglese *genomics* è stato coniato soltanto nel 1986. Nata principalmente in seguito (i) alla messa a punto, nel corso degli anni '80, di tecniche di amplificazione *in vitro* del DNA mediante Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) e, (ii) alla diffusione, negli anni '90, a seguito dell'avvio del Progetto Genoma Umano, di sistemi di automatizzazione di tecnologie per il sequenziamento del DNA, la nuova disciplina aveva inizialmente come obiettivo il mappaggio ed il sequenziamento genico su vasta scala. Nel tempo, il termine assume una connotazione più ampia, includendo, gli studi di *genomica* strutturale (finalizzati alla previsione della struttura tridimensionale delle proteine a partire dalle informazioni sulla sequenza nucleotidica), l'analisi dei polimorfismi genomici osservabili in una popolazione (talvolta indicata anche con il termine specifico di *varioma*), gli studi di *genomica* comparata ed evolutiva (basati sul confronto tra *genomi* di specie diverse finalizzato alla comprensione dei meccanismi evolutivi alla base delle relazioni genetiche tra organismi) e di *genomica* funzionale (finalizzata alla comprensione della funzione e delle interazioni tra i geni e i loro prodotti di espressione mediante, ad es., lo studio di trascrizione, traduzione, interazioni proteina/proteina, aspetti, per i quali, come descritto nel seguito, sono stati coniati, negli anni successivi, specifici neologismi "*omici*"). Dal punto di vista tecnologico, una delle più rilevanti innovazioni a carico della *genomica* (così come di altre discipline, quali *trascrittomica*, *epigenomica*, *metagenomica*) è sicuramente rappresentata dallo sviluppo, imponente negli ultimi 15 anni di numerosi approcci di *Next Generation Sequencing* (NGS), implementati in una molteplicità di piattaforme tecnologiche caratterizzate da massiva parallelizzazione operativa, in grado di consentire livelli di produttività e costi di analisi inimmaginabili con le tecniche tradizionali. Per una rassegna dettagliata sulle diverse metodiche, si vedano ad es. i lavori di Metzker (2010) e di Glenn(2011). Di tali metodiche si sono avvantaggiati anche i relativamente recenti progetti di sequenziamento del *genoma* delle specie ovina e caprina, grazie ai quali è stato possibile procedere all'identificazione di centinaia di migliaia di mutazioni puntiformi *Single Nucleotide Polimorphisms* (SNPs), alla loro implementazione in sistemi miniaturizzati (*SNP-chips*) per la genotipizzazione rapida e a basso costo di un numero elevato di campioni, al loro utilizzo in studi finalizzati

- all'identificazione di *Copy Number Variations* (*CNVs*), segmenti di DNA relativamente grandi caratterizzati dalla presenza in numero di copie variabile da soggetto a soggetto rispetto ad un *genoma* di riferimento, potenzialmente in grado di influenzare l'espressione fenotipica di caratteri di interesse economico;
- all'analisi delle relazioni genetiche tra razze, finalizzata alla ricostruzione degli scenari evolutivi alla base dell'attuale struttura di popolazione nella specie ovina e caprina su scala globale e alla valutazione dell'originalità genetica di una specifica razza, o della sua erosione mediante fenomeni di introgressione di materiale genetico da altre razze;
- all'identificazione di regioni genomiche con significato adattativo/selettivo, mediante (i) ricerca di *selection signatures* (*pattern* di polimorfismo che appaiano alterati a livello locale rispetto ai *pattern* riscontrabili a livello complessivo nel genoma); (ii) studi di associazione fenotipo-genotipo basati su analisi di *linkage disequilibrium* (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS); su analisi di *linkage*, e/o su analisi combinata di *linkage* e *linkage disequilibrium* finalizzata all'identificazione di QTL (*Quantitative Trait Loci);* oppure utilizzando il più recente approccio di *Regional Heritability Mapping* (RHM);
- alla messa a punto di protocolli per il controllo delle filiazioni e la rintracciabilità dei capi e/o dei loro prodotti.

Nella specie ovina, in particolare, nel corso del 2012, grazie al *whole-genome re-sequencing* di 75 soggetti provenienti da 41 tra razze domestiche e popolazioni ferali/selvatiche, è stato messo a punto da Illumina, in collaborazione con l'*International Sheep Genomics Consortium* (ISGC) ed il partenariato pubblico-privato neozelandese *FarmIQ*, l'*Ovine Infinium HD SNP BeadChip*, versione "potenziata" del pre-esistente *Ovine SNP50 BeadChip*, in grado di consentire, a costi relativamente contenuti, la genotipizzazione di oltre seicentomila loci SNP, distribuiti su tutto il *genoma*, scelti, in parte, tra loci già noti per essere in grado di influenzare caratteri fenotipici o di alterare la struttura dei relativi prodotti genici, ed inclusivi degli oltre cinquantamila loci già presenti nell'*Ovine SNP50 BeadChip*. L'*Ovine Infinium HD SNP BeadChip* lascia inoltre margine alla *customizzazione* con circa seimila loci a scelta del singolo ricercatore. Tale strumento non solo consentirà di incrementare in modo importante la capacità di identificare geni in grado di contribuire significativamente al determinismo di caratteri di interesse economico ma rappresenterà, nei prossimi anni, la base per l'implementazione di schemi di *genomic selection* (selezione dei futuri riproduttori sulla base dei *Genomic Estimated Breeding Values*, GEBVs, ottenuti a partire dagli effetti, stimati nella popolazione di riferimento, di marcatori *whole-genome*) nella specie ovina, verosimilmente in uso congiunto con l'*Ovine SNP50 BeadChip*, con più economici *low-density SNP chips* e, sempre più, in prospettiva, con genotipi ottenuti mediante *whole-genome re-sequencing*.

A corollario, si forniscono di seguito alcuni elementi informativi sulla branca della *genomica* (*esomica*) che si occupa dello studio, mediante tecnologie "*omiche*", della sola porzione codificante del *genoma* (*esoma*), di cui rappresenta circa l'1%. Diversamente dagli approcci di *whole-genome sequencing*, gli approcci di *whole-exome sequencing* necessitano preliminarmente di sistemi in grado di isolare la componente di interesse, solitamente attraverso tecniche di arricchimento basate su ibridazione con sonde oligonucleotidiche predefinite, su supporto solido (*array*) o in soluzione. L'adozione di tale approccio risulta pertanto limitata nelle specie per le quali non si dispone delle informazioni genomiche necessarie per il *design* delle sonde di cattura, sebbene sia stata dimostrata la possibilità di utilizzare con significativo successo sonde eterologhe (*Bos taurus*) per catturare regioni esoniche in specie relativamente prossime da un punto di vista genetico (*Bos indicus* e *Bison bison*) e, con percentuali di successo ovviamente inferiori, anche in specie maggiormente divergenti, allorquando specifici accorgimenti operativi finalizzati ad incrementare la stringenza di ibridazione e il recupero delle sequenze *target*, siano previsti. Rispetto ai metodi di genotipizzazione basati su *SNP-chip*, gli approcci di *whole-exome sequencing* presentano il vantaggio di fornire una mole maggiore di informazione in termini di loci polimorfici e di essere meno proni a fenomeni di *ascertainment bias* (distorsione nella stima di parametri genetici, quali frequenze alleliche, imputabile all'identificazione dei loci SNP implementati in uno *SNP-chip* a partire da campioni popolazionistici piccoli e poco rappresentativi), costituendo, dall'altro lato, una valida alternativa agli ancora troppo costosi approcci di *whole-genome sequencing.* In tal senso, è attualmente in corso un progetto, coordinato dalla *Utah State University*, finalizzato alla messa a punto di un *array* di cattura specifico per l'*esoma* ovino che sarà successivamente utilizzato per il *whole-exome re-sequencing* di 145 soggetti con fenotipi divergenti, e alla successiva integrazione dei dati così ottenuti all'interno del *database* di sequenze *whole-genome* precedentemente generate in collaborazione tra *Utah State University* e *International Sheep Genomics Consortium* al fine di identificare ulteriori varianti genetiche e renderle disponibili alla comunità scientifica.

TRASCRITTOMICA - Letteralmente il termine indica la branca della *genomica* funzionale che si occupa dello studio, mediante tecnologie "*omiche*", del *trascrittoma*, ovvero dell'insieme delle molecole di RNA (mRNA, rRNA, tRNA, ed altri RNA non codificanti) di una determinata cellula o organismo in definite condizioni sperimentali, con l'obiettivo di catalogarle, caratterizzarle dal punto di vista strutturale e quantificarle, per il fine ultimo di comprenderne i fattori di variabilità e i meccanismi di funzionamento. L'avvento delle tecniche NGS ha rivoluzionato tale disciplina, segnando il graduale abbandono delle tecniche basate sull'ibridazione dei trascritti con sonde oligonucleotidiche (*gene expression microarray*), efficaci soprattutto in indagini di espressione genica differenziale di geni noti, a favore di più robusti approcci di *RNA-seq* (sequenziamento diretto mediante NGS di cDNA generato a partire dall'RNA di interesse) in grado di consentire simultaneamente la quantificazione estremamente precisa (*digital gene expression*) degli RNA target, l'identificazione dei siti di avvio e *stop* della trascrizione, delle estremità tra esoni e introni e delle possibili varianti di *splicing* a carico degli mRNA (da cui anche il neologismo di *spliceosomica*), oltre all'analisi quantitativa dell'espressione a livello di singoli alleli, finalizzata alla messa in luce di possibili fenomeni di *imprinting* genetico (differenza nell'espressione genica in funzione dell'origine parentale dell'allele). Inoltre, a differenza dei *gene expression microarrays,* le tecniche di *RNA-seq* consentono l'identificazione *ex-novo* di trascritti, inclusi i trascritti meno abbondanti, a patto che vegano adottati adeguati livelli di *coverage* teorico. La possibilità di essere applicata anche a specie per le quali non si dispone di preliminari informazioni sulla sequenza del *genoma* rende questa tecnica di particolare interesse per tutte le specie non-modello, incluse le specie zootecniche minori. Per la specie ovina, la versione attuale del *database* disponibile presso l'*Ensembl Genome Browser* riporta 20,921 geni, 291 pseudo-geni e 3,985 RNA non codificanti, identificati a partire da oltre 8 miliardi di sequenze "*paired ends*" (2x150 pb) relative a 94 tessuti provenienti da individui appartenenti a diverse razze. Relativamente ad indagini di *trascrittomica* mediante NGS, la letteratura riporta, per la specie ovina, svariati studi finalizzati alla comprensione delle basi molecolari in grado di influenzare caratteri di interesse nella produzione della lana, della carne, caratteri legati ad aspetti riproduttivi (follicologenesi, fecondità e prolificità) e di sviluppo fetale e caratteri di interesse clinico-veterinario quali la rigenerazione ossea. Sono anche stati condotti alcuni studi preliminari di identificazione e caratterizzazione di *microRNA* a partire, ad es., da RNA estratto da muscolo *longissimus dorsi* di ovini di razze locali e cosmopolite (Zhang et al., 2013).

Al contrario, numerosi sono già gli studi condotti nella specie caprina finalizzati alla identificazione e caratterizzazione di *microRNA* a partire da RNA estratto da ghiandola mammaria, tessuto muscolare, gonadi maschili e femminili, urina (con riferimento al tratto uro-genitale maschile), cute e follicoli piliferi. Tra gli studi finalizzati all'analisi di espressione genica differenziale nella specie caprina, l'attenzione sembra quasi esclusivamente concentrata su caratteri legati alla produzione di fibra tessile (cashmere). Una disciplina "*omica*" emergente, strettamente correlata alla *trascrittomica*, che sembra non aver ancora trovato spazio significativo nella letteratura relativa ai piccoli ruminanti, è la cosiddetta "*RNA degradomics*", avente come obiettivo la caratterizzazione sistematica, mediante tecniche basate su sequenziamento NGS, di tutti i possibili prodotti derivanti dalla degradazione, mediata da *small RNA*, di RNA maturi che si accumulano in uno specifico tipo cellulare o tessuto, con conseguente identificazione dei siti *target* di *cleavage*.

EPIGENOMICA - In senso letterale, il termine indica la disciplina che si occupa dello studio, in modo sistematico, dell'insieme delle modificazioni epigenetiche, ossia di quelle modificazioni trasmissibili, sebbene reversibili, in grado di alterare i livelli di espressione genica senza alterare la sequenza del DNA. Tali meccanismi giocano un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica e sono, pertanto, coinvolti in numerosi processi cellulari nel determinismo della plasticità fenotipica, ovvero della capacità di una cellula o organismo di modificare il proprio stato in risposta a stimoli ambientali di varia natura. Tali meccanismi includono modificazioni a carico della cromatina, quali metilazione del DNA e modificazioni istoniche, e fenomeni di *RNA interference*. La metilazione del DNA a carico dei residui di citosina nelle *CpG islands* in corrispondenza di regioni con funzione regolatoria è in grado di reprimere la trascrizione attraverso meccanismi che determinano un impacchettamento della cromatina tale da impedire l'accesso ai fattori trascrizionali. Lo studio di tale fenomeno si basa sulla conversione chimica delle citosine non metilate in uracile. Le tecnologie "omiche" abbinano lo *step* di cui sopra a sistemi basati su *microarrays* o su NGS. I *microarrays* sono disegnati in modo da contenere sonde oligonucleotidiche in grado di ibridarsi specificamente con la sequenza metilata (in cui i residui citosinici non sono stati modificati) e sonde oligonucleotidiche in grado di ibridarsi specificamente con la sequenza non metilata (in cui i residui citosinici sono stati convertiti ad uracile mediante trattamento con bisolfito). Più convenientemente, le tecniche di NGS consentono il rilevamento dei siti metilati e non per sequenziamento diretto, offrendo, rispetto ai sistemi basati su *microarrays*, il vantaggio di una maggiore risoluzione, di una maggiore copertura del genoma (*whole genome shotgun bisulphite sequencing*), di una quantificazione estremamente accurata dei siti metilati e della possibilità di impiego anche in specie per le quali la scarsità di informazioni sulla sequenza genomica non consente il disegno di specifici *microarrays.* Metodi alternativi e/o complementari su vasta scala sono disponibili e si basano, ad es. su immunoprecipitazione di DNA metilato (MeDIP) con anticorpi diretti verso i residui di 5-metilcitosine. La frazione di DNA metilato così ottenuta può successiva-

mente essere analizzata mediante *microarrays* (*MeDIP-chips*) o NGS (*MEDIP-seq*). Modificazioni post-traduzionali di varia natura a carico delle proteine istoniche sono note per essere in grado di influenzare la struttura della cromatina, con importanti ripercussioni non soltanto a carico dell'espressione genica ma anche di processi quali riparazione, replicazione e ricombinazione del DNA. L'analisi di tali modificazioni è generalmente effettuata, a livello *genome-wide*, ricorrendo alla immunoprecipitazione della cromatina (*ChIP*) abbinata a sistemi basati su *microarrays* (*ChIP-on-chip*) o, come già visto, più convenientemente, *NGS* (*ChIP-seq*). In funzione degli anticorpi utilizzati, tali tecniche possono trovare applicazione più generale nel riconoscimento di siti di legame proteine-DNA in grado di permettere l'identificazione di diversi elementi funzionali del genoma quali regioni promotrici e sequenze che controllano la replicazione del DNA.

Lo studio dei fenomeni di *RNA interference* (*RNAi*) può essere affrontato, a livello "*omico*", mediante ricorso a tecniche di *screening* che facilitano l'identificazione sistematica dei geni coinvolti nel determinismo di specifici fenotipi attraverso meccanismi di silenziamento genico basati sull'utilizzo di diverse tipologie di RNA sintetici. Tali approcci di *genome-wide RNAi screening* trovano applicazione principalmente in studi *in vitro*, fatta eccezione per organismi modello quali *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. Per una rassegna alquanto esaustiva delle tecnologie attualmente a disposizione della *epigenomica* si rimanda al lavoro di Mensaert et al. (2014).

Numerosi sono gli studi condotti ad oggi nelle specie ovina e caprina finalizzati alla identificazione e comprensione del significato funzionale delle modificazioni epigenetiche. Tuttavia, si tratta generalmente di studi che non adottano approcci di tipo "*omico*" ma focalizzano la loro attenzione sull'assetto epigenetico di regioni *target* specifiche, impiegando un ventaglio di tecnologie di indagine che spaziano dalle metodiche basate su cromatografia in fase liquida abbinata a spettrometria di massa, alle diverse metodiche di *immunostaining* (immunofluorescenza, immunoistochimica, ELISA, *immunoblotting*), all'analisi quantitativa dei livelli di espressione di geni i cui prodotti sono responsabili delle principali modificazioni epigenetiche (quale evidenza indiretta dello *status* epigenetico di un campione), a tecniche di *methylation-sensitive PCR* (basate sull'uso di *primers* oligonucleotidici specifici per le sequenze metilate e per quelle non metilate), al sequenziamento di specifiche regioni *target* precedentemente sottoposte a conversione chimica delle citosine non metilate in uracile mediante trattamento con bisolfito ed amplificazione mediante PCR. Quest'ultimo approccio, in particolare, è stato ampiamente utilizzato, nelle specie ovina e caprina, per l'indagine epigenetica in soggetti (transgenici o meno) clonati mediante *Somatic cell nuclear transfer* (SCNT), tecnica in cui la riprogrammazione delle cellule somatiche e il normale sviluppo dell'embrione sembrano essere fortemente influenzati da modificazioni di tipo epigenetico.

L'analisi dei *pattern* epigenetici nelle specie ovina e/o caprina è stato inoltre oggetto di studi, ad esempio, in embrioni ottenuti *in vitro*, in feti da madri sottoposte a diversi condizionamenti di tipo ambientale (quali diversi regimi alimentari e/o restrizione alimentare, esposizione a stimoli ipossiemici in seguito a permanenza prolungata in altitudine), in ovaie prepuberi sottoposte ad autotrapianto in soggetti prepuberi e in soggetti adulti. In tutti i casi, l'interesse, in particolare nei confronti delle specie ovina, non si esaurisce sotto il profilo zootecnico, connotandosi anche in termini di ricerca traslazionale, in considerazione del crescente valore attribuitole quale specie modello per la ricerca biomedica, principalmente per quanto attiene gli aspetti riproduttivi e di sviluppo fetale.

PROTEOMICA E METABOLOMICA - Con il termine "*proteomica*" si intende la disciplina che affronta in modo sistematico lo studio strutturale e funzionale dell'intero set di proteine espresse in un determinato tipo cellulare o organismo in definite condizioni sperimentali (*proteoma*). Il maggiore livello di complessità che il *proteoma* presenta rispetto, non solo al *genoma* ma anche al *trascrittoma*, e non solo in termini di numero di prodotti genici (di almeno un ordine di grandezza superiore rispetto al numero di geni presenti in un genoma), ma anche in termini di variabilità dei livelli di espressione e di localizzazione in funzione del tipo cellulare, dello stato fisiologico e delle condizioni ambientali, ne complica notevolmente lo studio, nonostante lo sviluppo negli ultimi anni di tecnologie maggiormente performanti rispetto alla più tradizionale elettroforesi bidimensionale abbinata a spettrometria di massa. Con il termine "*metabolomica*" si intende la disciplina che affronta in modo sistematico l'identificazione, la quantificazione e l'interpretazione funzionale dei metaboliti endogeni che in modo dinamico sono diversamente presenti in cellule, tessuti e liquidi biologici. Al suo interno, si sono andate differenziando col tempo specifiche branche di studio quali *lipidomica* e *glicomica*. *Proteomica* e *metabolomica* sono qui trattate contestualmente in considerazione della parziale sovrapposizione nelle tecnologie impiegate, di seguito schematicamente riassunte.

Microarray - dagli iniziali sistemi basati sul riconoscimento antigene-anticorpo, numerosi sviluppi si sono succeduti, grazie ai quali la tecnologia consente oggi di investigare su vasta scala diverse forme di interazioni (*interactome*) che coinvolgono proteine, quali interazioni proteine-proteine, proteine-peptidi, enzimi-substrati, recettori-ligandi, proteine-DNA, proteine-RNA, proteine-lipidi, proteine-glicani, offrendo così opportunità praticamente illimitate, ad esempio, nello studio dei *pathways* di *signalling*, in studi di *drug discovery*, nella comprensione dei meccanismi di interazione ospite-patogeno, nell'identificazione di *biomarkers* prognostici e diagnostici.

Spettrometria di massa - basata sulla separazione di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica, tale tecnica analitica si declina in molteplici varianti in funzione, ad esempio, (i) dell'abbinamento con tecniche di separazione preliminare, quali elettroforesi capillare (CE), gascromatografia (GC) o cromatografia in fase liquida (LC), quest'ultima anche nella sua variante ad alta prestazione (HPLC); (ii) delle metodiche utilizzate per indurre la ionizzazione delle molecole da analizzare, quali *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), la sua variante *surface-enhanced laser desorption–ionization* (SELDI), o la tecnica *electrospray ionization* (ESI); (iii) della tipologia di analizzatori in base ai quali viene effettuata la separazione degli ioni, quali analizzatore a tempo di volo (*time-of-flight*, TOF), a trappola ionica (*ion trap*, IT), a quadrupolo (Q), a risonanza ionica ciclotronica a trasformata di Fourier (FT-ICR). Alcune configurazioni strumentali permettono di ripetere l'analisi, su frammenti già analizzati, dopo riframmentazioni successive (spettrometria di massa tandem) consentendo di raggiungere livelli più elevati di selettività e sensibilità, convenientemente utilizzabili in caso di analisi di miscele complesse. Inoltre, tali configurazioni consentono la definizione della sequenza aminoacidica di una proteina e, quindi, la sua identificazione accurata, unitamente alla valutazione quantitativa della sua presenza.

Risonanza magnetica nucleare (NMR) - ampiamente utilizzata in ambito proteomico e metabolomico, tale approccio consente, nella sua versione più comune, *proton nuclear magnetic resonance* (1HNMR), di analizzare fluidi biologici, estratti cellulari e colture cellulari (*solution-state NMR*)e, nella versione *magic-angle spinning* (MAS), anche tessuti intatti e campioni solidi (*solid-state NMR*). Presenta una serie di vantaggi rispetto alla spettrometria di massa quali basso costo, semplice preparazione del campione, analisi rapida, riproducibile e non distruttiva, capacità di fornire una quantificazione, sia assoluta che relativa, di un ampio repertorio di metaboliti, inclusi quelli non ancora caratterizzati, presenti in una miscela complessa, unitamente ad informazioni strutturali sugli stessi (Simmler et al. 2014).

Per tali ragioni, ben si presta ad essere utilizzata, ad esempio, negli studi di *profiling* metabolico. Presenta, tuttavia, minore sensibilità se comparata alla spettrometria di massa, rispetto alla quale si pone dunque più convenientemente come approccio complementare anziché alternativo.

Tabella 1 - Principali ambiti di applicazione degli studi proteomici e metabolomici negli ovi-caprini.

Ambito	Target
Carne	proteine sarcoplasmatiche, componente lipidica, compartimentalizzazione acqua, idrocarburi policiclici aromatici
Latte	micelle caseiniche, proteine del siero e del globulo lipidico; fosfopeptidi caseinici, oligosaccaridi, carotenoidi e vitamine liposolubili, frazione lipidica non saponificabile; adulterazioni di latte e formaggio; caratterizzazione reperti alimentari antichi
Lana	cheratine e altre proteine; caratterizzazione tessuti antichi
Pellame	alterazioni da trattamenti enzimatici per la rimozione della lana
Liquidi biologici	siero, plasma, urina, secrezione lacrimale, saliva, umor vitreo
Apparato digerente e sistema ruminale	proteoma intestinale; metaboliti associati alla microflora e al contenuto ruminale
Apparato riproduttore	epididimo, spermatozoi, fluido oviduttale e del lume uterino, corpo luteo, endometrio, oocita ed embrione
Linee cellulari	cellule staminali mesenchimali
Cute	proteoma cutaneo
Quadri patologici spontanei o indotti	osteoartrite, scrapie, intossicazione cronica da rame, mastite subclinica, patologie renali, infezione con nematodi, infezione con micoplasmi, mastite gangrenosa, brucellosi, paratubercolosi
Benessere, ambiente e salute pubblica	metaboloma di urina e siero dopo trasporto prolungato; rilascio di fosforo con le feci, emissione di gas metano per eruttazione; residui e tossine in alimenti zootecnici e ad uso umano
Indagini strutturali	allergeni alimentari, proteine prioniche, fibre di collagene dei tendini

Analogamente a quanto accaduto per le discipline "*omiche*" trattate in precedenza, la notevole mole di dati generati, principalmente in ambito umano, da studi proteomici e metabolomici ha dato impulso alla creazione di banche dati per lo stoccaggio, la consultazione interattiva e l'integrazione delle informazioni ai diversi livelli gerarchici di complessità biologica. Lo *Human Metabolome Database* (HMDB) riporta attualmente 41,815 metaboliti censiti nella specie umana, con utili collegamenti a database esterni, quali *FooDB* nel quale sono riportati 27,509 metaboliti complessivamente censiti in 888 prodotti, di cui 44 di origine animale, inclusi gli ovi-caprini.
Relativamente a queste due specie, numerosi studi di *proteomica* e *metabolomica* sono stati condotti ad oggi impiegando le tecniche sopra descritte, i cui principali ambiti di applicazione sono schematicamente riassunti in Tabella 1.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE - La pletora di tecnologie *high-throughput* attualmente a disposizione delle scienze "*omiche*", ed il loro rapido evolversi, impongono alla comunità scientifica l'adozione di una maggiore armonizzazione e standardizzazione nelle metodiche di generazione ed analisi dei dati ed evidenziano, al contempo, l'esistenza di estese possibilità di implementazione di nuovi strumenti di *data mining*. In aggiunta, la tendenza verso una crescente integrazione delle conoscenze provenienti dalle diverse discipline "*omiche*", nella direzione di una "*system biology*" o "*high-dimensional biology*", enfatizza la necessità di potenziare le capacità attuali di generare e condividere dati "*omici*" attraverso una più stretta collaborazione non solo orizzontale, all'interno della comunità scientifica, ma anche verticale, con l'insieme dei potenziali portatori di interesse all'interno del mondo produttivo e della società in generale.
Dal punto di vista tecnologico, tra le prospettive più immediate, si assisterà verosimilmente alla diffusione ancora più massiva nell'utilizzo delle tecniche di NGS ed all'adozione di nuove soluzioni in grado di trasformare le scienze "*omiche*" nella direzione delle "*single-cell omics*", di cui *genomica* e *trascrittomica single-cell* già rappresentano una realtà a disposizione del mondo della ricerca. L'apertura di nuove frontiere di studio a livello di singole cellule potrà permettere una maggiore capacità di comprensione e manipolazione della complessità dei *network* metabolici intracellulari, dei meccanismi alla base della eterogeneità cellulare e delle interazioni tra cellule in diversi micro-ambienti.
In tale ottica, l'interesse nei confronti delle specie ovina e caprina quali modelli animali per studi di natura traslazionale sembra credibilmente destinato ad aumentare. L'applicazione degli approcci metodologici e delle conoscenze derivanti dalle scienze "*omiche*" potrà determinare, a livello zootecnico, un impatto significativo, da un lato, sugli attuali approcci di miglioramento genetico (*animal breeding*), sempre più integrati in una nuova disciplina che, in analogia con il concetto di "*system biology*" è già stata definita come "*system breeding*" (o *system quantitative genomics*) e, dall'altro, sulle scienze e tecnologie di produzione degli alimenti di origine animale, dove crescente è l'uso del termine *foodomics*, ad indicare in tale ambito l'applicazione di tecnologie "*omiche*" nello sviluppo, ottimizzazione e validazione di processo e di prodotto. In ultimo, ma non per minore importanza, si intende porre qui l'attenzione su una delle sfide a cui le scienze "*omiche*" sono chiamate a rispondere, ovvero sulla necessità di sviluppare strumenti automatizzati e affidabili per la rilevazione su vasta scala e ad alta risoluzione dei fenotipi, unitamente a strumenti informatici e di calcolo in grado di consentire archiviazione, accesso, integrazione e gestione di *database* fenotipici, che al momento ancora soffrono di un significativo ritardo di implementazione rispetto ai database genomici, trascrittomici, proteomici e metabolomici, non consentendo così il pieno sviluppo della più giovane tra le discipline ad entrare nel novero delle "*omiche*" (*fenomica*).

"OMICS" technologies

Key words: Genomics, epigenomics, proteomics, metabolomics.

Bibliografia

Glenn T.C. (2011), Field guide to next-generation DNA sequencers. Mol Ecol Res 11: 759-769.
Mensaert K., Denil S., Trooskens G., Van Criekinge W., Thas O., De Meyer T. (2014), Next-generation technologies and data analytical approaches for epigenomics. Environ Mol Mutagen 55(3): 155-170.
Metzker M.L. (2010), Sequencing technologies – the next generation. Nat Rev Genet 11: 31-46.
Simmler C., Napolitano J.G., McAlpine J.B., Chen S.N., Pauli G.F. (2014), Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. Curr Opin Biotechnol 25: 51-59.
Zhang S., Zhao F., Wei C. Sheng X., Ren H., Xu L., Lu J., Liu J., Zhang L., Du L. (2013), Identification and characterization of the miRNA transcriptome of Ovis aries. PLoS One 8(3): e58905.

L'importanza delle attività dell'Asso.Na.Pa. nel settore ovi-caprino nazionale

R. NEGRINI

Associazione Nazionale della Pastorizia

INTRODUZIONE - *L'*Associazione Nazionale della Pastorizia (Asso.Na.Pa.) è stata legalmente costituita in Roma il 12/07/1960 e ha ottenuto il riconoscimento giuridico quale Ente Morale il 28/10/1963 con D.P.R. n° 1871.

L'Associazione svolge, su incarico del Ministero per le Politiche Agrarie e Forestali, un'attività finalizzata al miglioramento morfologico, genetico e funzionale e alla conservazione della biodiversità delle razze ovine e caprine allevate in Italia attraverso la gestione dei Libri Genealogici nazionali e dei Registri.

L'allevamento ovicaprino ha radici profonde nella storia agricola del nostro Paese e tutt'oggi occupa una posizione di rilevo nel comparto zootecnico. Sono interessate circa 73855 aziende distribuite per il 64% nella parte meridionale ed insulare del territorio nazionale; per il 12,5% nella parte centrale e per il 23,5% nella parte settentrionale.

Distinguendo per specie, l'allevamento ovino è distribuito su quasi tutto il territorio nazionale con le razze ad attitudine produttiva latte concentrate nelle isole maggiori e lungo la fascia costiera, di pianura e di collina, mentre le razze ad attitudine produttiva carne sono allevate in prevalenza nelle zone subalpine e lungo la dorsale appenninica. L'allevamento caprino di tipo intensivo è presente prevalentemente nella fascia alpina in stretta relazione al mercato delle produzioni casearie mentre l'allevamento di tipo tradizionale è praticato nelle aree più difficili della penisola e delle isole.

La popolazione ovina in Italia oggi conta poco meno di 7 milioni di capi di cui il 60-65% circa è costituito da soggetti appartenenti alle 17 razze provviste di Libro Genealogico e alle 46 razze di Registro Anagrafico. La popolazione caprina conta, invece, meno di 1 milione di capi di cui, circa il 40%, appartenenti alle 8 razze del Libro Genealogico e alle 44 razze di Registro Anagrafico. Va precisato che parte della consistenza ovi-caprina è rappresentata da meticci.

Le razze ovine del Libro Genealogico sono così distinte, in funzione della principale attitudine produttiva:

- a prevalente attitudine produttiva latte: Altamurana, Comisana, Delle Langhe, Leccese, Massese, Pinzirita, Sarda e Valle del Belice.
- a prevalente attitudine produttiva carne: Appenninica, Barbaresca, Bergamasca, Biellese, Fabrianese, Gentile di Puglia, Laticauda, Merinizzata Italiana e Sopravissana.

Si fa presente che in base al nuovo Disciplinare degli ovini e dei Caprini il numero delle razze di Libro viene ridotto alle razze: Sarda, Maltese, Camosciata e Saanen per le capre; Sarda, Comisana, Delle Langhe, Massese, Pinzirita e Valle del Belice per gli ovini da latte; Appenninica, Bergamasca, Fabrianese e Merizzinata Italiana per gli ovini da carne.

La consistenza globale dei capi ovini iscritti ai LL.GG. è pari a 925.000 soggetti, orientativamente il 13% del patrimonio nazionale, mentre la consistenza dei caprini iscritti è di 37.000 capi, circa il 5% del patrimonio nazionale. Confrontando gli ultimi due Censimenti ISTAT, si nota come nell'ultimo decennio anche se la consistenza numerica degli ovini e caprini è rimasta pressoché costante (ha subito una trascurabile diminuzione dello 0.7%) si è verificato un decremento del numero totale di aziende pari al 43% (da 130.260 nel 2010 a 73.885 nel 2000). Di contro il numero medio di capi per azienda è passato da 59.1 a 103.5 nel 2010 con una positiva variazione percentuale del 75.2%

ATTIVITÀ SVOLTE DA ASSONAPA - ***Selezione genetica.*** L'attività dell'Asso.Na.Pa. è indirizzata verso una selezione effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche dei singoli soggetti, subordinata alla presenza di requisiti genealogici e all'analisi dei risultati conseguiti nel controllo funzionale attraverso l'utilizzo di modelli di selezione nonché di tecniche idonee per la più ampia moltiplicazione degli effetti positivi della selezione. Il miglioramento genetico, si realizza attraverso il Progeny-test per le razze ovine e caprine da latte e il Performance-test per le razze ovine ad attitudine produttiva carne. Per le razze da latte si è potuto realizzare l'indicizzazione dei riproduttori per il carattere produzione latte, mediante le procedure BLUP Animal Model; questa fase è operativa per le razze ovine: Delle Langhe e Sarda e caprine: Camosciata, Saanen, Maltese e capra Sarda, prevedendo per quest'ultima razza una prima indicizzazione nel 2014.

Razze da latte - Per le razze caprine Saanen e Camosciata delle Alpi, oltre al carattere produzione di latte, viene stimato il valore genetico per i caratteri qualitativi: kg e % di grasso e proteina, e da qualche anno, anche del Merito Totale Produttivo per le quantità di grasso e proteine che integra i singoli valori genetici in un unico valore. Sempre per queste due razze, in via sperimentale, l'Asso.Na.Pa. ha elaborato un indice genetico per i caratteri morfo-lineari utilizzando le punteggiature operate da esperti delle razze. Il numero totale dei capi indicizzati è 54.948 per la razza Saanen e 45.780 per la Camosciata delle Alpi; dato che comprende tutti i soggetti presenti nel file anagrafico utilizzato per le valutazioni. Per la razza Maltese e la capra Sarda si utilizza l'indice di Abilità produttiva calcolato aggregando in un'unica informazione la stima genetica e la soluzione ambientale permanente ottenute dal calcolo delle soluzioni geneti-

Tabella 1 - Consistenze ovi-caprine per macroaree geografiche - *Fonte Istat, 6° Censimento Generale dell'Agricoltura.*

Tipo allevamento	Totale ovini. Aziende	Dati %	Totale caprini. Aziende	Dati %	Totale ovini. Num capi	Dati %	Totale caprini. Num capi	Dati %
Italia	**51096**		**22759**		**6782179**		**861942**	
Nord-ovest	3732	*0,07*	5002	*0,22*	211554	*0,03*	114451	*0,13*
Nord-est	3519	*0,07*	2475	*0,11*	183202	*0,03*	40518	*0,05*
Centro	8237	*0,16*	2128	*0,09*	1362969	*0,20*	47824	*0,06*
Sud	17306	*0,34*	8447	*0,37*	1263272	*0,19*	300487	*0,35*
Isole	18302	*0,36*	4707	*0,21*	3761182	*0,55*	358662	*0,42*

che. La componente ambientale permanente comprende tutte le cause specifiche che influenzano costantemente e con la stessa entità tutta la carriera produttiva di ogni animale pertanto tiene conto delle misure rilevate più di una volta sullo stesso animale come ad esempio due o più lattazioni della stessa capra.

Per quanto riguarda l'attività di miglioramento genetico particolare attenzione merita la razza ovina Sarda. Lo schema di selezione della razza Sarda fa riferimento allo schema nucleo, in cui il miglioramento genetico viene realizzato in animali presenti in aziende di Libro Genealogico con alto livello tecnologico e sui quali si utilizzano biotecnologie avanzate per accelerare il progresso genetico. L'effetto della sua applicazione determina che, di fatto, la popolazione oggetto di selezione risulta suddivisa in una parte attiva (sostanzialmente gli animali iscritti al Libro) che partecipa al programma di miglioramento genetico, ed una commerciale, alla quale gli effetti del miglioramento genetico sono trasmessi. Nel 2013 il numero di dosi di seme di arieti miglioratori e di arieti in prova, utilizzate per l'inseminazione artificiale sono state poco meno di 7000 mentre per il 2014 si prevede un minor numero dovuto al ridotto finanziamento economico. Una ruolo importante nell'ambito della selezione viene svolto tramite l'asta annuale degli Arieti non più utilizzati dalla campagna di inseminazione artificiale. L'Asso.Na.Pa., tramite il proprio centro Arieti con sede a Bonassai (SS), ridistribuisce, alle aziende partecipanti, gli arieti di alto valore genetico per la monta naturale. Infine, sulla base di nuovi studi scientifici effettuati, è in via di consolidamento la valutazione lineare della mammella delle pecore primipare di razza Sarda in modo da escludere, come madri di ariete, quelle che presentano conformazioni non adatte alla mungitura meccanica. Nel 2013 sono state effettuate 2179 punteggiature che sono state utilizzate per la stima degli indici della mammella.

Presso il Centro Genetico di Asso.Na.Pa, ad Asciano, in provincia di Siena, vengono allevati due importanti nuclei ovini di razze Comisana e Massese coinvolti in complessi schemi selettivi specifici. Questi schemi, entrati ormai a regime, massimizzano i caratteri produttivi degli animali, riducono la consanguineità e ottimizzano la selezione per la resistenza alla Scrapie. Il Centro Genetico infatti è classificabile come *scrapie free* poiché, grazie agli accoppiamenti programmati negli ultimi anni, si è raggiunto l'importante obiettivo di rendere tutti gli animali resistenti alla scrapie. Gli arieti, terminato l'impiego nello schema selettivo, vengono assegnati agli allevatori tramite un'asta pubblica di acquisto.

Per le altre razze caprine e ovine da latte non ancora indicizzate a causa degli scarsi legami nelle connessioni aziendali (necessari per un giusto confronto delle lattazioni), sono disponibili agli allevatori i prestampati ad E.P.M. ed E.C.M. (Equivalente Pecora Matura ed Equivalente Capra Matura) che proiettano le produzioni ad Animale Maturo, dati utili per operare una selezione aziendale.

Razze da carne - Il valore genetico dei riproduttori di razza ovina da carne Fabrianese è effettuato utilizzando il metodo BLUP *Animal Model Multiple Trait*, a seguito dell'applicazione del nuovo schema selettivo "a nucleo aperto" in alternativa al classico *Performance-test*.

Per tutte le altre razze ovine da carne di libro, gli allevatori possono utilizzare i soggetti che hanno ottenuto un valore positivo al termine della prova di performance. I capi che partecipano al test sono scelti da tecnici incaricati da Asso.Na.Pa. in aziende aderenti al programma. Sui soggetti in prova è rilevato il peso alle età tipiche per valutarne la capacita di accrescimento. I soggetti che non raggiungono le performance previste sono eliminati.

Per ogni riproduttore idoneo viene stimato un indice ariete o di performance. Alla fine della prova l'Asso.Na.Pa. organizza le aste pubbliche, Il Performance-test ha contribuito a migliorare le caratteristiche dell'allevamento italiano di ovini da carne attraverso la dislocazione degli arieti idonei presso gli allevamenti situati sul territorio nazionale.

Scrapie. In seguito al regolamento n°999 e alla Decisione n°1803 della Commissione Europea, l'Asso.Na.Pa, già dalla fine del 2001, ha presentato al Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, un programma operativo ancora oggi in atto, il cui fine è la progressiva eradicazione della Scrapie. Il programma prevede l'esecuzione di test genetici su tutti gli arieti per identificare i portatori del genotipo resistente alla scrapie da utilizzare, in accoppiamenti programmati, per ottenere soggetti ad alto pregio genetico/sanitario. Tale obiettivo viene raggiunto tanto più facilmente e velocemente quanto maggiore è la disponibilità di riproduttori con genotipo ARR/ARR resistente.

Dalla tabella 2 è possibile osservare le frequenze genotipiche delle razze di L.G. In particolare si nota che il 40% dei capi di razza Sarda nati dal 2010 in poi sono omozigoti resistenti grazie alla efficiente attività selettiva per l'allele ARR. Le alte percentuali della Comisana e della Massese sono dovute principalmente all'attività di selezione del Centro Genetico.

Servizi agli allevatori. L'Asso.Na.Pa. fornisce, alle APA e agli allevatori, alcuni importanti servizi utili alla gestione dell'allevamento come ad esempio il calcolo dei coefficienti di parentela utili per minimizzare la consanguineità della discendenza; i gruppi di monta ottimizzati per la consanguineità, per gli indici genetici e per la scrapie; l'individuazione delle madri di becco fondamentali per l'iscrizione al L.G. dei giovani becchi etc.

Tabella 2 - Frequenze genotipiche dei capi testati per la scrapie e nati dal 1° Gennaio 2010.

Scrapie	I classe		II classe			VRQ					Totale complessivo
Razza	ARR-ARR	ARR ARR %	ARR-ARQ	ARR-AHQ	ARR-ARH	ARQ-VRQ	ARR-VRQ	VRQ-VRQ	AHQ-VRQ	ARK-VRQ	
APPENNINICA	310	0,30	386	20	77	12	13				1024
BERGAMASCA	92	0,15	224	21	1	17	1		1		629
COMISANA	2107	0,45	1238	110	134	167	157	41	14		4663
DELLE LANGHE	139	0,53	80	6	10						262
FABRIANESE	72	0,14	206	2	44	9	3	1			522
MASSESE	1038	0,70	326	17	9	9	10				1490
MERINIZZATA ITALIANA	850	0,32	1049	48	14	89	189	12	7	4	2638
PINZIRITA	13	0,22	20			2	2				59
SARDA	16795	0,40	17192	1958	42	7	22		2		41782
VALLE DEL BELICE	883	0,15	2473	203	52	93	79		5		5927
TOTALE	22299		23194	2385	383	405	476	54	29	4	58996

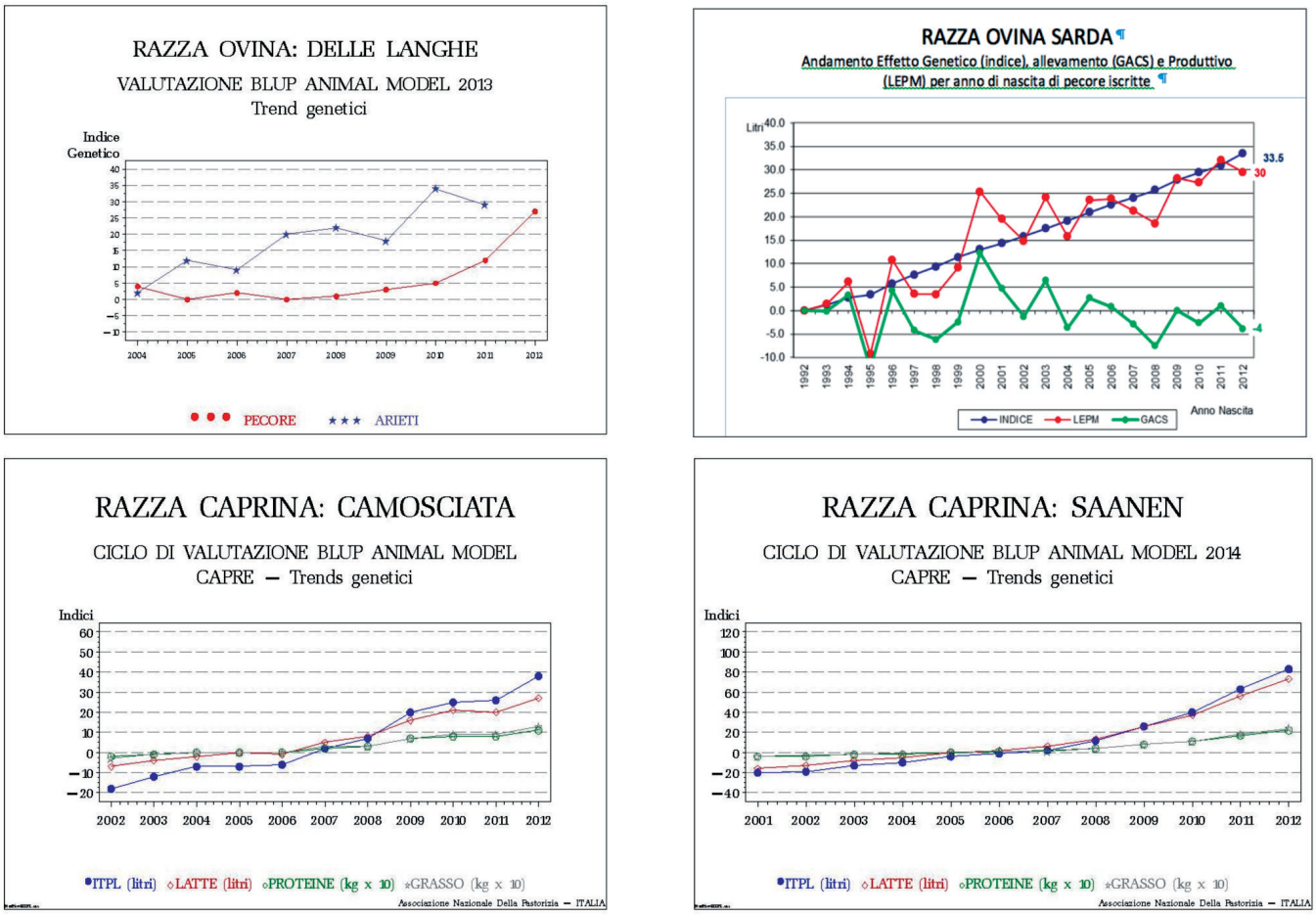


Figure 1-4 - Trend genetici delle principale razze ovine e caprine.

COLLABORAZIONI IN CORSO

1. Asso.Na.Pa collabora con l'Istituto di Agris, l'Università di Sassari, ARA Sardegna e le AIPA Sardegna nel progetto "Miglioramento genetico dei caratteri di efficienza produttiva e riproduttiva, resistenza alle patologie, valore caseario e nutrizionale del latte nella razza ovina Sarda attraverso l'utilizzo delle moderne tecnologie genomiche e di metodiche innovative di misurazione dei fenotipi."
2. Asso.Na.Pa collabora con l'Università di Sassari, dipartimento di Scienze Zootecniche e con l'AIA nel progetto "Il latte ovino in Sardegna" finanziato dalla regione Sardegna nell'ambito della L.R.7/2007. Il progetto ha come obiettivo generale il miglioramento delle proprietà casearie del latte ovino prodotto in Sardegna. Verranno definite le caratteristiche di coagulabilità del latte in un campione di 1200 pecore, verrà valutato l'effetto dei fattori genetici e ambientali su tali caratteristiche e verranno sviluppate metodiche innovative per la valutazione dell'attività casearia del latte ovino.
3. Asso.Na.Pa. coadiuva l'attività epidemiologica/ sanitaria dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (I.Z.S) del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, l'I.Z.S. della Sardegna e l'I.Z.S. della Sicilia e dell'Istituto Superiore di Sanità per la realizzazione del progetto EMIDA, un piano di lavoro che vede appunto coinvolta la specie caprina e la battaglia contro la scrapie. Similmente alla pecora, tramite un test sul campione di pelo o il prelievo di sangue della capra si può diagnosticare la resistenza o la suscettibilità dell'animale alla malattia grazie alla mutazione di un gene chiamato 222K. In particolare con questo progetto si cerca dapprima di genotipizzare quanti più animali possibili in modo da avere un quadro riassuntivo della situazione Italiana e poter implementare successivamente un piano di selezione genetica mirato alla resistenza alla scrapie, come già avviene per gli ovini.
4. Asso.Na.Pa collabora con l'ARAL Lombardia nel progetto CO.GE.CA. che prevede l'uso della fecondazione artificiale come importazione di superiorità genetica (seme dei migliori becchi francesi) e di valorizzazione della genetica nazionale. Ad oggi sono 39 le aziende che hanno aderito al progetto.

The role of the National Sheep and Goats Breeders Association

Key words: record on-farm performance data, EBVs, genetic selection.