

# The involvement of prolactin in the mechanisms regulating reproduction during the post-partum period

Fabio De Rensis (1) (DVM, M.  
ph, PhD)

*(1) Docente di Fisiologia ed Etologia degli  
Animali Domestici, Istituto di Clinica Ostetrica  
Veterinaria, Università degli Studi di Parma,  
Via Del Taglio 8, 43100, Parma, Italy. E- mail:  
fderensi@unipr.it*

## Introduction

The origin of the involvement of PRL in the mechanisms regulating reproduction can only be speculated. This might derive from the primitive association of PRL with osmoregulation, since most euryhaline fish species enter fresh water to rear their young, and tropical fish species are stimulated to produce their broods by an influx of freshwater (Meites, 1988). The "elf" drive in amphibia is also reported to be PRL dependent. Therefore, the association between PRL and reproduction in higher mammals might be an outgrowth of that stimulation.

PRL plays many biological roles in the post-partum period. It has a significant role in the establishment of maternal behaviour (Bridges et al., 1987) and increases gene expression of milk proteins (Rosen et al., 1980). It also plays a major role, together with estrogen and progesterone, in the homing process of lymphocytes originating from Peyer patches of the maternal gut. These lymphocytes produce IgA antibodies excreted in milk as secretory IgA specific to antigens present in the gut of the mother (Weitz-Carrington et al., 1978). Apart from these important functions during lactation, PRL also has an important role in the mechanism regulating the return of sexual function after farrowing.

## Rat

In the rat the plasma concentrations of PRL during lactation are strictly correlated with the suckling stimulus and enhanced by increasing litter size (Coppings et al., 1979). Female rats that are suckled continuously have significantly higher PRL levels than those nursing four times daily (Tucker et al., 1988) and the fall in PRL secretion towards the end of lactation is presumably a result of decreased suckling frequency (Ford and Melampy, 1973). A fall in PRL during the latter stages of lactation has been observed but it is not clear if this is due to the reduction in the suckling intensity or due to other factors.

In order to investigate the possibility that the limited PRL response to suckling in late lactation resulted from decreased suckling intensity provided by older pups, Mathji et al. (1979) and Selmanoff and Wise (1981) used cross-fostering to replace older pups with younger neonates at the end of lactation. They found that the response of PRL to suckling was markedly blunted compared with the response profile at the beginning of lactation. Moreover Selmanoff and Selmanoff (1983) observed that in rats, the suckling-induced release of PRL at day 20 post-partum had a slower onset, markedly reduced peak height and a faster return to baseline than the response at day 10. Therefore these data seem to confirm that during late lactation the PRL release mechanism becomes less responsive to the suckling stimulus.

In an attempt to ascertain the relative contributions of the suckling stimulus and PRL to the inhibition of gonadotropin secretion, the post-castration rises of LH and FSH during lactation in female rats have been investigated. Results from these studies, suggest that during early lactation the suckling stimulus contributes more than PRL to the suppression of LH, while during the latter stages of lactation, PRL may account for the decrease in the post-castration rises in gonadotropin secretion (Smith, 1978). However, it has to be

considered that the mechanisms involved in the suppression of basal gonadotrophin secretion during lactation may be different from the mechanisms involved in the suppression of the post-castrational response.

When suckling is maintained in the absence of elevated PRL, rats showed an early resumption of estrous cycles (Lu et al., 1976) and since the injection of bromocriptine during lactation resulted in a significant increase in LH and FSH and an earlier resumption of estrous cycles, the high PRL levels rather than the suckling stimulus may be responsible for the suppression of gonadotropins. However, in these as in many others studies, suckling intensity was not controlled.

It is not yet clear if during lactation there is a PRL induced increase in hypothalamic dopamine turnover (short loop feed-back) and, if present, whether this mechanism is involved in the suppression of GnRH secretion. Although it has been reported that PRL release induced by stress or suckling increases dopamine turnover, as shown by indirect turnover studies (Mena et al., 1976), but there is evidence that in the rat the hypothalamic dopamine turnover is reduced in lactation (Selmanoff and Wise, 1981; Demarest et al., 1983) and the concentration of dopamine in the hypophysial portal vessels is acutely reduced in response to suckling (Plotsky and Neill, 1982). Furthermore, Demarest et al., (1983) observed that during lactation in the rat there is a change in the properties of the hypothalamic tuberoinfundibular dopamine neurones and they become unresponsive to the stimulatory actions of PRL.

### Cow

As in other species, lactation in the cow is associated with high levels of PRL (Webb and Lamming, 1981) and the increased PRL concentrations are strictly correlated with the presence of the suckling stimulus. In fact calf

removal was associated with a rapid decline in the plasma PRL associated with an increase in basal LH secretion (Wright et al., 1981a). In contrast to the rat, plasma PRL concentrations are similar in suckled and milked cows (Carrunthers and Hafs, 1980) and in cows suckling one or two calves (Wheeler et al., 1982) and no correlation has been found between PRL concentrations and the length of the anestrus period in either milked or suckled cows (Webb and Lamming, 1981). Since suppression of plasma PRL with bromocriptine does not affect the time to onset of estrus (for review see Montgomery, 1982), and infusion of PRL failed to affect the pattern of LH secretion (Williams and Ray, 1980; Forrest et al., 1980), it therefore seems that PRL does not play a key role in the lactational anestrus in this species.

### Sheep

In the sheep plasma concentration of PRL is low during the breeding season, increases in response to increasing day length, and is high during the period of lactational anestrus (Walton et al., 1977). As in other species the PRL response to suckling in the sheep declines throughout lactation McNeilly, (1983; 1988).

A number of studies have been performed in sheep to distinguish the differential effects of suckling and high plasma PRL levels on lactational anestrus. For example, it has been revealed that the duration of lactational anestrus is dependent on the concentration of circulating PRL (Kann and Martinet, 1975; Kann et al., 1977). In fact treatment with bromocriptine to suppress PRL, or severance of the neural pathway for the suckling stimulus, which abolishes the suckling-induced PRL surge whilst maintaining basal PRL throughout lactation, are followed by an early restoration of ovarian activity. This may suggest that the suckling-induced PRL surges are responsible for prolonging the anestrus period through suppression of gonadotropin secretion. In contrast, Fitzgerald and Cunningham, (1981) report that treatment of lactating

ewes with bromocriptine may not advance the onset of estrus post-partum and, furthermore, this treatment does not appear to influence the basal or pulsatile release of LH in lactating ewes, even though the release of LH in response to exogenous GnRH may be increased (Wright et al., 1981b).

In conclusion it is not yet clear if PRL has a direct role in the lactational anestrus in the sheep and further studies are necessary to clarify the effect of bromocriptine treatment on gonadotropin release.

### Sow

During the estrous cycle in the sow there are two fairly distinct peaks in plasma PRL: one occurs four days before estrus and the other during the sexual receptivity phase (Brinkley et al., 1973; Dusza et al, 1979; 1993).

In the sow extremely high concentrations of PRL have been detected on the day before farrowing (Dusza and Krzymowska, 1981; Van Landeghem and Van de Wiel, 1978). This increase is an essential prerequisite to a normal lactation. After parturition, plasma PRL gradually decreases to the still relatively elevated concentrations associated with lactation (Bever et al., 1978; Stevenson et al., 1981a,b).

In the early post-partum period therefore there is already an active secretion of PRL, with mean PRL concentrations ranging between 12.0 and 89.6 ng/ml (De Rensis et al., 1991). Since high variability between animals in plasma PRL was observed in this study and these differences were not due to seasonal changes or to differences in litter size, it was suggested that the observed variability was due to genetic differences between animals. The functional significance of this considerable variability in PRL secretion in suckling sows needs to be established in future studies. However from a biological viewpoint it is interesting to note that among the suckled sows studied, the lowest

concentrations of plasma PRL were detected in a sow which nevertheless farrowed 13 live piglets and from which 13 pigs were eventually weaned.

During mid-lactation plasma PRL concentrations remain high (Threlfall et al., 1974; Bevers et al., 1978; Van Landeghem and Van de Wiel, 1978; Dusza and Krzymowska, 1981) and then decline between day 20 and day 30 post-partum (Stevenson et al., 1981).

Regarding the pattern of PRL secretion in the sow, the PRL response to the suckling stimulus is characterized by a rapid increase and then a return to the baseline levels after 30 to 60 minutes (Van Landeghem and Van de Wiel, 1978). The separation of the piglets from the mother for periods of four hours or more resulted in a rapid decline in plasma PRL and in increases in basal LH secretion. In the sow, the administration of exogenous PRL, from immediately after weaning until the occurrence of estrus, did not influence plasma LH concentrations nor the time of estrus and the preovulatory LH surge occurred in all experimental animals (Dusza et al., 1990). However the dose of PRL used (0.125 mg) was, in our opinion, low compared to the usual concentrations of PRL observed during lactation. In contrast, Van de Wiel et al. (1985) significantly lowered the levels of LH, compared with untreated animals, by the infusion of purified porcine PRL in the sow, for 24 hours immediately after weaning. Furthermore, whilst the administration of exogenous PRL during the separation of piglets did not prevent the increase in LH levels, the extent of this increase was significantly reduced in sows infused with PRL compared with those which were not (Booman and Van de Wiel, 1980). In conclusion, it appears that in the sow the suppression of LH during lactation is partly caused by hyperprolactinaemia. However, PRL alone may not mediate differences in sow fertility, as in sows with a delayed return to estrus after weaning, PRL levels decrease in the same way as in animals with a normal return to estrus (Van de Wiel et al., 1985; Benjaminsen, 1981; Edwards and Foxcroft, 1983). It

has also been reported that the progressive ability of the pituitary to discharge LH as the interval from parturition increases, was not associated with modifications in PRL concentrations (Bever et al., 1981). Nevertheless in individual sows, high PRL levels may be associated with reduced ovarian development in the presence of adequate gonadotropin stimulation (Foxcroft et al., 1987).

In contrast to findings in the rat, in which suckling may also have the effect of stimulating PRL synthesis, in the sow, Threlfall et al. (1974) reported a decreased content of pituitary PRL in suckled as compared to non suckled sows; these finding may indicate that the suckling stimulus in the pig leads to a higher rate of PRL release than synthesis, whilst the reverse is true for the rat.

Another approach to the study of PRL during lactation has been the examination of the effect of the PRL inhibitor, bromocriptine, on LH release. While Mattioli and Seren (1985) did not find any differences in LH after bromocriptine treatment, Kraeling (1992) observed that treatment with bromocriptine was associated with significantly lower serum LH concentrations in treated animals compared to control. Similarly, Bever and colleagues (1983) found that the reduction of PRL by bromocriptine was associated with increased mean LH levels. If PRL is decreased by removal of the piglets, this does not enhance pituitary sensitivity to LHRH stimulation (Bever et al., 1981), but if PRL levels are decreased by bromocriptine, the injection of GnRH induced a smaller increase in plasma LH levels in treated lactating sows compared with non-treated animals (Mattioli and Seren, 1985). The results of a recent study (De Rensis et al., 1999) indicate that prolactin per se is not involved in the control of GnRH/ LH secretion during lactation in the sow. Administration of the dopamine agonist Cabergoline is able to increase LH secretion in late lactation and this effect may be mediated by altering the inhibitory effect of endogenous

opioids on GnRH secretion.

## Dog

With regard the role of prolactin in different reproductive phases, prolactin appears to play a part in canine interoestrus interval, possibly by affecting gonadotropin secretion and/or ovarian responsiveness to gonadotropin. Suppression of prolactin secretion by administration of dopamine agonists can cause a shortening of duration of anoestrus or induction of oestrus in bitches with a prolonged anoestrus (Onclin et al., 1993, 1995; Verstegen et al., 1999). A decline in prolactin secretion may regulate the normal timing of onset of pro-oestrus and such decline could be attributable to an increase in sensitivity to endogenous dopaminergic influences, as well as to any increase in local concentrations in dopamine (Concannon, 1993).

The ergot alkaloid and dopamine agonist Cabergoline effectively terminates pregnancy in species in which prolactin is an essential luteotropic agent as in rat, mice, dogs and cats (Di Salle et al., 1983a,b; Jockle and Jockle, 1993; Onclin et al., 1993; Verstegen et al., 1993; Ferraro et al., 1995) but in bitches the freshly formed corpus luteum seems to be independent of gonadotrophic support in pregnant and not pregnant bitches (Hoffmann et al., 1996).

There are evidence of dopaminergic influences and prolactin release during both the luteal phase and anoestrus in bitces (Okkens at al., 1985; van Haaften et al., 1989; Concannon, 1993; Onclin et al., 1995).

Under physiological conditions, no obvious changes in plasma concentrations of PRL have been observed in bitches during the transition from anoestrus to the follicular phase (Olson et al., 1982) In addition, administration of metergoline, a 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor antagonist, to anoestrus bitches in a dose resulting in plasma prolactin concentrations even

lower than those resulting after bromocriptine treatment did not shorten the interoestrus interval (Okkens et al., 1997; Kooistra et al., 1999a,b). These observations suggest that the induction of follicular development is not initiated by the suppression of prolactin secretion, but by other direct or indirect dopaminergic effects.

## Human

In women PRL secretion by the pituitary gland is rapidly increased during late gestation due to the effect of high levels of placental estrogen. After labour, maternal plasma PRL drops at a very slow rate and, in women as in other species, the post-partum levels of PRL are related to the amount of suckling stimulus and then to the length of lactational anestrus.

The close association between the plasma levels of PRL and the duration of infertility has led to the suggestion that PRL per se may be involved in the suppression of gonadotropin secretion in woman. Evidence that PRL can directly influence LH secretion and affect the resumption of ovarian activity came from the observation in the human that in some pathological conditions, such as pituitary microadenoma resulting in hyperprolactinaemia, the levels of FSH and LH are low. When the pathologically high concentration of PRL was suppressed by treatment with bromocriptine, normal menstrual cycles resumed (Rolland et al., 1975b). However, since the suckling-related increase in PRL is not acutely related to any inhibition of basal or pulsatile secretion of LH (Glasier et al., 1984), the decline in PRL may only reflect the decrease in suckling activity and may not have a direct effect on the resumption of follicular development.

Nevertheless, during lactation, there is also evidence for inhibitory effects of PRL at the ovarian level. In vitro increasing amounts of PRL inhibit progesterone secretion in human and porcine granulosa cells (McNatty, 1974; Veldhuis et al., 1980b). Furthermore,

McNeilly et al. (1982) postulated that high levels of PRL inhibit follicular steroidogenesis not only by interfering with aromatase activity but also by reducing the production by the theca of the androgen precursors necessary for estrogen production.

In conclusion in humans, it has been demonstrated that high concentration of prolactin inhibit GnRH secretion (Saunders et al., 1984; Yazigi et al., 1997). Lowering of the plasma prolactin to basal concentrations is usually associated with the return of gonadotrophic pulsatility (Beverly et al., 1983; Saunders et al., 1984).

## Prolactin influence on the ovary

A direct inhibitory action of PRL on the ovaries has been demonstrated in the pig; in vitro incubation of granulosa cells from small follicles with PRL resulted in a decrease in progesterone secretion (Veldhuis et al., 1980a). Similarly, results have been reported in earlier studies with human granulosa cells in which increasing amounts of PRL added to the culture medium inhibited the secretion of progesterone in a dose dependent manner (McNatty et al., 1974). It has also been demonstrated that high levels of PRL can block FSH induction of aromatase in the estrogen synthetase system (Wang et al., 1980; Dorrington and Gore-Langton, 1981). Such inhibitory effects of PRL are consistent with *in vivo* evidence. For example the induction of elevated PRL by repeated injection of TRH in ewes, resulted in a suppression of estradiol secretion by the action of PRL on the ovary (McNeilly et al., 1983a).

Numerous studies, both in vivo and in vitro, provide support for a direct inhibitory effect of PRL on follicular secretion of estradiol-17beta. Studies in the rat (for review see Dusza, 1990) clearly showed that PRL inhibits estradiol-17beta secretion by granulosa cells under all experimental conditions. It has also been observed that high concentrations of prolactin

suppressed ovarian estradiol-17 $\beta$  and estrone secretion in pigs. Dusza et al., (1990) reported that PRL administration for 60 h during the follicular phase of the estrous cycle in intact gilts decreased the concentrations of estradiol-17 $\beta$  in peripheral plasma on the 2nd and 3rd day of PRL treatment.

Little is known about the role of PRL in the growth and development of ovarian follicles. Wang et al. (1980) suggested that a marked inhibitory action on estrogen secretion by the granulosa cells could result in the termination of follicular growth and the initiation of atresia in some follicles. However, the action of PRL on follicular development is not yet well understood. In the cow, for example, the injection of bromocriptine or the infusion with PRL antiserum during the luteal phase of the estrous cycle does not affect peripheral progesterone concentrations or the length of estrous cycle (Hoffman et al., 1974). Furthermore, PRL receptors have not been identified on bovine thecal and granulosa cells (Bever et al., 1985), whereas that in the pig the number of prolactin receptors on granulosa cells decrease with increasing size of follicles (Rolland and Hammond, 1975a). In conclusion, while there is evidence for a requirement for prolactin during the estrous cycle in maintaining growth and/or development of follicles, the mechanisms are poorly understood. Studies in which blood levels of PRL have been suppressed pharmacologically with bromocriptine, ergocornine or with antiserum to PRL (for review see McNeilly, 1982) suggest that only minimal amounts of PRL are needed for normal follicular growth. With regard to the lactational period in pigs, the relationship between the high plasma PRL levels and the block of follicular development needs further investigation but it seems probable that there is potential for a local inhibitory effect of PRL on the ovary.

## Conclusion

In conclusion, from the studies reported above, appear

clear that the suckling stimulus has a stimulatory effect on PRL secretion but the exact involvement of PRL in the reproductive activity during the post-partum period is not clear.

Neural inputs from the nipples could, directly or indirectly (for example by the opioidergic system), inhibit the secretion of PIFs and increase the PRFs thus increasing the secretion of PRL. It is important to consider that the influence of various neurotransmitters on the regulation of PRL secretion may differ between species. For example, during lactation the blockade of opiate receptors with naloxone results in a decrease of PRL secretion in the rat (Sirinathsinghji and Martini, 1984) and sow (Mattioli et al., 1986), but apparently not in women (Cholst et al., 1982). In both the rat and sow there is also a significant increase in LH secretion.

Consequently, conclusions made by extrapolating data based on one species may be misleading when considering the role of PRL in lactational anestrus in other species. However most of the data indicate that prolactin per se is not involved in the control of GnRH/ LH secretion during lactation in the domestic species.

## References

- Benjaminsen, E. (1981). Plasma prolactin in the sow with emphasis on variation in resumption of ovarian activity after weaning. *Acta Vet. Scand.*, 22:67-77.
- Bevers, M.M., Willemse, A.H., Kruij, T.A.M. (1978). Plasma prolactin levels in the sow during lactation and post weaning period as measured by radioimmunoassay. *Biol. Repr.*, 19:628-634.
- Bevers, M.M., Willemse, M.H., Kruij, T.A.M. (1983). The effect bromocriptine on luteinizing hormone levels in the lactating sow: evidence for a suppressive action by prolactin and the suckling stimulus. *Acta Endocr.*, 104: 261-265.
- Bevers, M., Dieleman, T.H., Kruij, T.A.M., Willemse, A.H. (1985). Follicular development in the heifers cronicly treated with Bromocriptine. In: *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*. Ed. by J.F. Roche and D. O'Callaghan. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 45-53.

- Booman, P., Van De Wiel, D.F.M. (1980). Lactational anoestrus in the pig: possible relationship with hyperprolactin aemia. Report B-157 Instituut voor veeteeltkundig Onderzoek "Schoonoord", Driebergseweg 10 Zeist, Holland.
- Bridges, R.S., Loundes, D.D., Dibiase, R., Tate Ostroff, B. A. (1987). In: Prolactin: basic and clinical correlates. Ed. by Macleod, R.M., Thorner, M. and Scapagnini, U., Fidia Research Series, Liviana Press, Padova, 1:591-599.
- Brinkley, H.J., Wilfinger, W.W., Young, E.P. (1973). Plasma prolactin in the estrous cycle of the pig. *J. Anim. Sci.*, 37, 303 (Abstr.).
- Carruthers, T.D., Hafs, H.D. (1980). Suckling and four times daily milking influence on ovulation, oestrus and serum LH, glucocorticoid and PRL in post partum Holstein. *J. Anim. Sci.*, 50:919-925.
- Cholst, I.N., Wardlaw, S.L., Newman, C.B., Frantz, A. (1982). Prolactin response to breast stimulation in lactating women is not mediated by endogenous opioids. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 150: 558-561.
- Concannon, P.W. (1993) Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 49:3-27.
- Coppings, R.J., McCann, S.M. (1979) Stimulatory feedback action of estradiol in intact and ovariectomized lactating rats. *Biol. Reprod.*, 21:219-227.
- Di Salle E., Ornati G, Briatico G. (1983a) FCE 21336, a new ergoline derivate with a potent and long acting lowering effect on prolactin secretion in rats. *J Endocrinol. Invest.* 5:(Supplement 1) 45.
- Di Salle E., Ornati G., Giudici G., Briatico G., (1983b) Prolactin lowering effect of a new ergoline derivate, FCE 21336, in the rat: a comparison with bromocriptine. *Acta Endocrinologica* 103 (Supplement 256) 265.
- Demarest, K.T., McKay, D.W., Riegle, G.D., Moore, K.E. (1983). Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinol.*, 32:24-27.
- De Rensis, F., Hunter, M.G., Grant, S.A., Lancaster, R.T., Foxcroft, G.R. (1991). Effect of estrogen administration on endogenous and luteinizing-hormone-releasing-hormone-induced luteinizing hormone secretion and follicular development in the lactating sow. *Biol. of Reprod.* 44:975-982.
- De Rensis, F., Foxcroft, G.R. (1999). Relationship between gonadotropin secretion during lactation and endocrine changes and follicular development after weaning in the sow. *Animal Reproduction Science*, 56:143-152 (Fattore di impatto 0.83)
- Dorrington, J. and Gore-Langton, R.E. (1981). Prolactin inhibits oestrogen synthesis in the ovary. *Nature, Lond.*,

290:600-602.

- Dusza, L., Krzymowska, H. (1979). Plasma prolactin concentration during the oestrous cycle of sow. *J. Reprod. Fert.*, 57:511-514.
- Dusza, L., Tilton, J.E. (1990). Role of prolactin in the regulation of ovarian function in pigs. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 40:33-45.
- Dusza, L. & Krzymowska, (1981). Plasma prolactin levels in sows during pregnancy, parturition and early lactation. *J. Reprod. Fert.*, 61:131-134.
- Dusza L., Ciereszko R., Okrasa S., Kotwica G. (1993). Prolactin administration during the follicular phase of cyclic sows. *Animal. reprod. Sci.*, 34:147-158.
- Edwards, S. (1982). The endocrinology of the post partum sow. In: *Control of Pig Reproduction*. Ed. by Cole D.J.A. and Foxcroft, G.R.; Butterworths, London. pp. 439-458.
- Edwards, S., Foxcroft, G.R. (1983). Endocrine changes in sows weaned at two stages of lactation. *J. Reprod. Fert.*, 67:161-172.
- Ferraro, F., Nidsoli N.C.G., Salvo, R., Maffeo, G., Jockle, W. (1995). Periodic use of cabergoline, a prolactin inhibitor, for control of reproductive success in rats - work in progress, *Theriogenology*, 44:1-7.
- Fitzgerald, B.P., Cunningham, F.J. (1981). Effect of removal of lambs or treatment with bromocriptine on plasma concentrations of prolactin and Fsh during the post-partum period in ewe lambing at different times during the breeding season. *J Reprod. Fert.*, 61:127-136.
- Ford, J.J, Melampy, R.M. (1973). Gonadotrophin levels in lactating rats: effect of ovariectomy. *Endocrinol.*, 93:540-547.
- Forrest, D.W., Fleeger, J.L., Long, C.R., Soresen, A.M., Harms, P.G. (1980). Effects of exogenous prolactin on peripheral luteinizing hormone levels in ovariectomized cows. *Biol. Repr.*, 22: 197-201.
- Foxcroft, G.R., Shaw, H.J., Hunter, M.G., Booth, P.J., Lancaster, R.T. (1987). Relationship between luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin secretion and ovarian follicular development in the weaned sow,. *Biol Repr.* 36:175-191.
- Glasier, A.F., McNeilly A.S., Howie, P.W. (1984). Pulsatile secretion of LH in relation to the resumption of ovarian activity post-partum. *Endocrinol.* 20:415-426.
- Hoffman, B., Schams, D., Bopp, R., Ender, M.L., Gimenez, T., Karg, H.R. (1974). Luteotrophic factors in the cow: evidence for LH rather than PRL. *J. Reprod. Fert.*, 40:77-85.
- Harvey, M.J.A., Cauvin, A., Dale, M., Lindley, S., Ballabio, R. (1997). Effect and mechanisms of the anti-prolactin drug cabergoline on pseudopregnancy in the bitch. *J. Small Animal Practice*, 38:336-339.

- Hoffman, B., Riesenbeck, A., Klein, R. (1996) Reproductive endocrinology of Bitch. *Snimsl Reprod. Sci.*, 42:275-288.
- Kann, G., Martinet, J. (1975). Prolactin levels and duration of post-partum anestrus lactating ewe. *Nature*, 257:63-64.
- Kann, G., Martinet, J., Schirar, A. (1977). Hypothalamic-pituitary control during lactation in the sheep. In: Control of ovulation. Ed by D.B. Crighton, N.B., Haynes, G.R. Foxcroft and G.E. Lamming. Butterworths, London pp. 19-34.
- Kraeling, R.R., Barb, R.C., Rampacek, G.B. (1992). Prolactin and luteinizing hormone secretion in the pregnant pig. *J. Anim. Sci.* 70:3521-3527.
- Kooistra, H.S., Okkens, A.C., Bevers, M.M., Popp-Snijders, C., Van Haften, B., Dieleman, S.J., Schoemaker, J. (1999). Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone during different phases of the oestrus cycle and anestrus in beagle bitches. *Biology of reproduction* 60: 65-71.
- Kooistra, H.S., Okkens, A.C., Bevers, M.M., Popp-Snijders, C., van Haften, B., Dieleman, S.J., Schoemaker, J. (1999). Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle stimulating hormone in beagle bitches. *J. Reprod. Fert.* 117:387-393.
- Lu, K.F., Chen, H.T., Huang, H.H., Grandison, L., Marshall, S., Meites, J. (1976). Relation between prolactin and gonadotropin secretion in post-partum lactating rats. *J. Endocr.*, 68:241-250.
- Mathji, J.A.M., Gruisen, E.R.M., Swaets, J.J.M. (1979). The suckling-induced rise of plasma prolactin in lactating rats: its dependence on stage of lactation and litter size. *Horm Res.*, 11, 325-336.
- Mattioli, M., Seren, E. (1985). Effect of bromocriptine treatment during lactational anestrus in the pig. In: Endocrine causes of seasonal and lactational anestrus in farm animals. Ed. by Ellendorff, F., Elasaesser, F., Martinus-Nijhoff Pub., pp. 165-178.
- Mattioli, M., Conte, F., Seren, E., Galeati, G. (1986). Effect of naloxone on plasma concentrations of prolactin and LH in lactating sows. *J. Reprod. Fert.*, 76:167-173.
- McNatty, K.P., Sawers, R.S. & Mcneilly, A.S. (1974). A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human graafian follicle. *Nature, Lond.*, 250:635-655.
- McNeilly, A.S., Glasier, A., Jonassen, J., Howeic, P.W. (1982). Evidence for a direct inhibition of ovarian function by PRL. *J. Reprod. Fert.*, 65:559-569.
- McNeilly, A.S., Baird, D.T (1983). Direct effect of prolactin induced by TRH injection on ovarian oestradiol secretion in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 69:559-568.
- McNeilly, A.S. (1988). Suckling and the control of

- gonadotrophin secretion. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed. by E. Knobil, J.D. Neill. 2:2323-2349.
- Meites J., (1988). Biological functions of prolactin in mammals. In: *Prolactin gene family and its receptors*. Ed. by K. Hoshino. Elsevier Science Publisher. pp. 123-130.
  - Mena, F., Enjalbert, L. Carbone, H., Priam M., Kordans. (1976). Effect of suckling on plasma prolactin and hypothalamic monoamine levels in the rat. *Endocrinol.*, 99:445-451.
  - Montgomery, G.W. (1982). Influence of suckling frequency and bromocriptine treatment on the resumption of ovarian cycles in postpartum beef cattle. *Theriogenology*, 17:551-563.
  - Okkens, A.C., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Willemse, A. H. (1985) Shortening of the interoestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocriptine treatment. *Veterinary Quarterly* 7: 173-176.
  - Okkens, A.C., Kooistra, H.S., Dieleman, S.J., Bevers, M. M. (1997) Dopamine agonist effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anoestrus in bitches. *J Reprod. Fert.*, Supplement 51:55-58.
  - Olson, P.N., Bowen, R.A., Behrendt, M.A., Olson, J.D., Nett. TM. (1982) Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biology of Reproduction*, 27:1196-1206.
  - Onclin, K., Verstegen, JP. (1999) Comparison of different combination of analogues of PGF2 alpha and dopamine agonist for the termination of pregnancy in dogs. *Vet.Rec.* 144:416-419.
  - Onclin, K., Verstegen, J. (1997) Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrus beagle bitches. *J. Reprod. Fert- Suppl.* 51:203-208
  - Plotsky, P.M., Neill, J.D. (1982). The decrease in hypothalamic dopamine secretion induced by suckling: comparison of voltammetric and radioisotopic methods of measurement. *Endocrinol.*, 110:691-696.
  - Rolland R., Hammond, J.M. (1975a). Demonstration of a specific receptor for prolactin in porcine granulosa cells. *Endocr. Res. Commun.*, 2:281-298.
  - Rolland, R., Lequin, R.M., Schellekens, L.A., De Jong F.H. (1975b). The role of prolactin in the restoration of ovarian function during the early post partum period in the human female I. A study during physiological lactation. *Clin. Endocr.*, 4:15-25.
  - Rosen, J.M., Matusik, R.J. Richards, D.A., Gupta, P., Rodgers, J.R.,(1980) *Rec. Prog. Horm. Res.* 36, 157-187.
  - Saunder, S.E., Frager, M., Case, G.D., Kelch, R.P., Marshall, J.D. (1984). Abnormal patterns of pulsatile luteinizing hormone secretion in women with

hyperprolactinaemia and amenorrhea: responses to bromocriptine. *Clinical Endocrinol and Metabol.*, 59: 941-948.

- Selmanoff, M., Wise, P.M. (1981). Decreased dopamine turnover in the median eminence in response to suckling in the lactating rat. *Brain Res.*, 212:101-115.
- Selmanoff, M. Selmanoff, C. (1983). Prole of pup, age, estradiol-17beta and pituitary responsiveness in the differences in the suckling induced prolactin response during early and late lactation. *Biol. of Reprod.*, 29:400-411.
- Sirinathsinghji, D.J., Martini, L. (1984). Effects of bromocriptine and naloxone on plasma level of prolactin, LH and FSH during suckling in the female rat: response to gonadotropin releasing hormone. *J. Endocr.*, 100:175-182
- Smith, (1978). The relative contribution of suckling and prolactin to the inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat. *Biol. of Reprod.*, 19:77-83.
- Stevenson, J.S., Britt, J.H. (1981a). Luteinizing hormone, total estrogens and progesterone secretion during lactation and after weaning in sows. *Theriogenology*, 14:453-462.
- Stevenson, J.S, Cox, N.M., Britt, J.H. (1981b). Role of the ovary in controlling luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin secretion during and after lactation in pigs. *Biol. Reprod.*, 24:341-353
- Threlfall, W.R., Dale, H.E., Martin, C.E. (1974). Porcine blood and hypophyseal prolactin values. *Am. J. Vet. Res.*, 35:1491-1494.
- Tucker, H.A., (1988). Lactatin and its hormonal control. In: *The physiology of Reproduction*. pp2235-2263. Eds. E. Knobil and J.Neill, Raven Press; New York.
- Van de Wiel, D.F.M., Booman, P., Willemse, A.H., M.M. (1985). Relevance of prolactin to lactational and post-weaning anoestrus in the pig. In: *Endocrine causes of seasonal and lactational anoestrus in farm animals*. Ed. by F. Ellendorf and F. Fisher, pp. 154-164.
- Van Landeghem, A.A.J., Van de Wiel, D.F.M. (1978). Radioimmunoassay for porcine prolactin plasma levels during lactation, suckling and weaning and after TRH administration. *Acta Endocrinol.*, 88:(4), 653-667.
- Veldhuis, J.D., Klase, P., Hammond, J.M.(1980a). Divergent effect of PRL upon steroidogenesis by porcine granulosa cells in vitro: influence of cytodifferentiation. *Endocrinol.*, 107:42-46.
- Veldhuis, J.D., Klase, P., Hammond, J.M. (1980b). Divergent effects of prolactin upon steroidogenesis by porcine granulosa cells in vitro: Influence of cytodifferentiation. *Endocrinol.*, 107:42-46.
- Verstegen, J.P., Onclin, K., Silva, L.D.M., Donnay, F. (1993). Sbortion induction in the cat using prostaglandin

- F2alfa and a new anti-prolactin agent, cabergoline. *J of Reproduction and Fertility. Supplement* 47:411-417.
- Verstegen, JP, Onclin K., Silva LDM, Concannon PW (1999). Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist Cabergoline in dogs. *Theriogenology*, 51:597-611.
  - Walton, J.S., McNeilly, J.R., McNeilly, A.S., Cunningham, F. J. (1977). Changes in blood levels of prolactin, LH, FSH and progesterone during anestrus in the ewe. *J. Endocrinol.*, 75:127-136.
  - Wang, C., Hsueh, A.J.W., Erickson, G.F. (1980). Prolactin inhibition of estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocr.*, 20:135-144.
  - Webb, R., Lamming, G.E. (1981). Pattern of plasma prolactin in post-partum suckled cow. *J. Endocrinol.*, 90:391-396.
  - Weitz-Carrington, P., Roux, M.E., Mc Williams, Phillips-Quagliata, J.M., Lamm, M.E. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, 75:2928-2932.
  - Wheeler, M.B., Anderson, G.B., Munro, C.J., Stabenfeldt, G.H. (1982). Prolactin response in beef cows and heifers suckling one or two calves. *J. Reprod. Fert.*, 64:243-249.
  - Williams, G.L., Ray, D.E. (1980). Hormonal and reproductive profiles of early post partum beef heifers after prolactin suppression or steroid-induced luteal function. *J. Anim. Science*, 50:906-918.
  - Wright, P.J., Jenkin, G., Heap, R.B. (1981a). Prolactin and LH release in response to LH-RH and TRH in ewes during dioestrus, pregnancy and post partum. *J. Reprod. Fert.*, 62:447-453.
  - Wright, P.J., Geytenbeek, P.E., Clarke, I.J., Findlay, J.K. (1981b). Evidence for a change in oestradiol negative feedback and LH pulsatile frequency in post partum ewes. *J. Reprod. Fert.*, 63:97-102.
  - Yazigi, R.A., Quintero, C.H., Salameh, W.A. (1997) Prolactin disorder. *Fertility and Sterility* 67:215-225.

## Il ruolo della prolattina sull'orientamento ed attitudine al ritorno (homing) del colombo viaggiatore

Sivelli I., Marusi A.,\* Coruzzi G.\*\*

(\*) *Istituto di Ostetricia e Ginecologia Veterinaria.*

(\*\*) *Istituto di Farmacologia. Facoltà di Medicina e Chirurgia. Università di Parma.*

Negli uccelli la prolattina è l'ormone deputato, come nei mammiferi, ad alcuni comportamenti legati alla riproduzione: blocco della ovodeposizione, induzione della cova, stimolo alle cure parentali. Nel colombo, più che in ogni altro uccello, la regolazione della prolattina si presenta di tipo positivo, basata principalmente su fattori inducenti e non limitanti la secrezione e, pertanto, vengono favoriti questi comportamenti.

E' da queste considerazioni che in un precedente lavoro, (Marusi, Coruzzi 1987), abbiamo cercato di chiarire il ruolo che la prolattina sembra svolgere nel determinismo del comportamento di "homing" così avanzato nel colombo.

Durante quella sperimentazione abbiamo osservato gli effetti sul colombo di farmaci agonisti ed antagonisti dei recettori dopaminergici.

Come antagonista abbiamo utilizzato la levosulpiride. La levosulpiride è un neurolettico atipico che ha elevata affinità per i recettori dopaminergici di tipo D2 e, a differenza dei neurolettici classici, non si lega ai recettori di altri neurotrasmettitori. La levosulpiride è comunemente usata nella medicina umana come antipsicotico, come antidepressivo e come antiemicrania (Goodman & Gilman's, 1996). Negli animali ed anche nell'uomo si osserva un notevole incremento dei livelli di prolattina che induce la comparsa di galattorrea e ginecomastia.

Come agonista abbiamo usato la cabergolina. La cabergolina è un derivato della segale cornuta, dotato di potente azione agonista a livello dei recettori dopaminergici D2. La sua emivita estremamente lunga (60-65 ore) comporta una inibizione prolungata della prolattinemia, che viene sfruttata in diverse condizioni patologiche, quali prolattinomi, iperprolattinemie di varia origine, come la pseudogavidanza nella cagna (Ballabio et al., 1990) e nei casi in cui si voglia bloccare la lattazione post-partum (Rains et al., 1995). Nel piccione è stata utilizzata per cercare di porre un freno alla notevole spinta demografica di questi animali che sta diventando un problema sociale nei centri urbani (Ferraro et al., 1992).

Nella precedente sperimentazione (Marusi et al., 1987) i composti vennero somministrati, poco prima del lancio e, precisamente, la l.sulpiride per via parenterale e la cabergolina per os, ad un gruppo di 32 capi, di età fra uno e tre anni, costituito in parti uguali di maschi e femmine. Contemporaneamente venivano trattati, allo stesso modo, capi di controllo con soluzione fisiologica.

I colombi trattati con l. sulpiride fecero ritorno con tempi di rientro sensibilmente minori rispetto ai controlli, mentre quelli trattati con cabergolina mostrarono una notevole caduta di rendimento; alcuni non fecero neanche ritorno.

Nell'attività "atletica" del colombo le gare prevedono la partecipazione di animali in diverse categorie, non solo maschi e femmine, ma anche a diversi livelli legati alla età, alle attività riproduttiva e parentale. Pertanto abbiamo ritenuto nel presente lavoro di prendere in considerazione gli effetti del levosulpiride e della cabergolina nelle diverse categorie:

novelli: i nuovi nati dell'anno che iniziano l'attività agonistica fra le 5-7 settimane di età, con un chilometraggio in genere al di sotto di 150 km;

adulti "naturali": colombi ( in particolare femmine, ma alcuni utilizzano anche i maschi) prelevati dai loro nidi quando sono impegnati nella cova e nella la cura dei piccoli;

adulti "vedovi":precisamente i maschi, cui è stato aumentato lo stimolo al ritorno privandoli della compagna 2-3 giorni prima del lancio.

### Materiali e metodi.

Per la nostra indagine abbiamo avuto a disposizione una colombaia di circa 200 colombi, molti dei quali attivi dal punto di vista agonistico; in tal modo abbiamo potuto approfittare

delle gare del campionato annuale organizzato dalla società colombofila cui appartiene l'allevatore, ovviamente considerando fuori gara i soggetti trattati. In questo modo è stato possibile confrontare il rendimento atletico dei colombi, scelti con il criterio del campionato casuale all'interno della popolazione disponibile, sia con un gruppo di controllo della stessa popolazione che con altri colombi in gara, ma provenienti da altri allevamenti.

Per i novelli sono stati utilizzati solo 12 soggetti, a causa della scarsa disponibilità dei soggetti in età adeguata, in 5 lanci: 2 di addestramento e 3 gare. Più precisamente sono stati lanciati per ciascuna delle 5 gare 4 soggetti trattati con l.sulpiride, 4 con cabergolina e 4 come gruppo di controllo; di conseguenza ogni novello ha disputato 2 lanci di addestramento e 3 gare, eccetto 2 soggetti che sono andati persi e sono stati sostituiti.

Per gli adulti abbiamo utilizzato 18 gare. Per ogni gara sono stati lanciati 12 colombi così suddivisi:

1 maschio naturale in cova, 1 vedovo, 1 femmina in cova, 1 femmina con novelli, tutti trattati con l.sulpiride;

1 maschio naturale, 1 vedovo, 1 femmina in cova, 1 femmina con i novelli, tutti trattati con cabergolina;

4 colombi al naturale e non trattati, corrispondenti ai precedenti, come gruppo di controllo.

Nel totale sono stati utilizzati 36 colombi adulti ovvero tre multipli di 12 in modo da avere per ogni categoria i dati distribuiti su tre soggetti differenti. Ognuno di essi ha potuto così disputare 6 gare su 18, distribuite in 2 di addestramento (100-150 Km), 6 di velocità (150-300 Km), 6 di mezzofondo (300-600 Km) e 4 di fondo (oltre 600 Km), nel periodo da aprile ad agosto.

In realtà i colombi utilizzati sono stati 43 in quanto, durante la sperimentazione, è stato necessario sostituirne 7 andati perduti.

I farmaci utilizzati sono stati la l.sulpiride, disponibile in fiale (100 mg/2ml) per uso parenterale, ma comunque somministrabile per os essendo una soluzione in acqua distillata e la cabergolina, disponibile sul mercato in soluzione per uso orale (50 mcg/ml).

La somministrazione per os della levosulpiride è stata scelta in quanto la somministrazione parenterale, come abbiamo fatto nel lavoro preliminare (Marusi, Coruzzi 1987), avrebbe indotto un trauma che, per quanto leggero, avrebbe potuto influenzare negativamente sul rendimento atletico; secondariamente i lunghi tempi preliminari al lancio, nonché il fatto che i colombi vengono ingabbiati un giorno prima e subito allontanati dall'allevatore, rendono impossibile la somministrazione del farmaco appena all'inizio della gara. Il trattamento per via orale inoltre presenta un'emivita abbastanza lunga da permettere la somministrazione al momento dell'ingabbio, da 12 a 30 ore e più prima del lancio, a seconda delle distanze.

Considerando che i colombi, come in genere gli uccelli, hanno un metabolismo molto più intenso dei mammiferi, abbiamo ritenuto opportuno trattare ogni colombo del peso di 400-500 g., come un animale di 5 kg. In pratica abbiamo somministrato ad ogni soggetto 0,1 ml di soluzione di l.sulpiride e 0,5 ml di soluzione di cabergolina, pari a 25 mcg, con una siringa senza ago al momento dell'ingabbio prima di spedirli al luogo di partenza.

Dal momento che questi trattamenti sono totalmente atraumatici e non stressanti per questi animali, abituati ad essere catturati e manipolati con una certa frequenza, non abbiamo ritenuto necessario eseguire nessun trattamento sul gruppo di controllo.

## Risultati

I risultati relativi alla variabilità negli aspetti comportamentali nell'attitudine al ritorno (homing) del colombo viaggiatore sia negli animali trattati con l.sulpiride, sia in quelli trattati con cabergolina e quelli non trattati considerati controlli sono riassunti nelle tabelle seguenti:

Tab.1. Risultati ottenuti dal lancio di novelli trattati (T) con L. sulphiride.

Distanza Km	Ora di Lancio	Velocità T1 m/min.	Velocità T2	Velocità T3	Velocità T4	Velocità media
80	8.00	803.6394	845.8317	792.0792	851.0638	823.1535
140	7.30	912.580	937.482	965.5172	838.3233	913.4756
225	6.00	918.2527	952.9473	961.0974	928.8069	940.2760
240	7.00	694.5730	706.8259	689.2765	724.2063	703.7204
325	7.30	1026.5289	1103.3660	1033.7693	1061.5359	1056.3000

Tab.2. Risultati ottenuti dal lancio di novelli trattati (T) con cabergolina.

Distanza Km	Ora di Lancio	Velocità T1 m/min.	Velocità T2	Velocità T3	Velocità T4	Velocità media
080	8.00	834.9340	848.3178	783.9439	847.4093	828.512
140	7.30	920.4943	913.0452	995.3041	901.4044	932.562
225	6.00	perso	851.0343	799.3040	910.3839	853.5740
240	7.00	683.0031	699.0357	700.3825	721.8453	701.0666
325	7.30	1003.5947	1111.9340	1033.7693	999.3027	1037.1501

Tab.3. Risultati ottenuti dal lancio di novelli controllo (C).

Distanza Km	Ora di Lancio	Velocità C1 m/min.	Velocità C2	Velocità C3	Velocità C4	Velocità media
80	8.00	851.3940	817.1102	820.5128	717.2348	801.5629
140	7.30	perso	904.6839	927.1523	843.3734	891.7365
225	6.00	961.0974	849.6385	855.5133	845.8946	878.3595
240	7.00	999.1117	700.4601	664.8199	712.1661	749.8894
325	7.30	1040.2106	1069.0367	1058.6319	1051.7799	1054.9147

Dai dati riportati sulle tabelle 1, 2, 3, risulta come il trattamento con L. sulphiride non abbia influito significativamente sul rendimento dei giovani colombi "novelli". E' interessante comunque notare come in genere ci sia stato un aumento delle velocità medie, nonostante il concomitante aumento del chilometraggio. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che i novelli, dopo le prime due gare, abbiano cominciato a prendere progressivamente familiarità con i meccanismi di orientamento, nonché con il volo stesso. Nella penultima gara, quella di 240 Km da Arezzo a Piacenza, i risultati sono stati mediamente peggiori sia nei gruppi trattati che in quello di controllo, ma abbiamo ritenuto che ciò fosse un problema di colombaia, dal momento che gli altri soggetti in gara, provenienti da altre colombaie, hanno avuto risultati riferibili ad una media approssimativa di oltre 800 m/min.

Anche il trattamento con cabergolina non ha sortito risultati rilevanti, facendo supporre che la prolattinemia nei novelli non influisca molto sulla capacità di rientro. La conferma che la cabergolina non induceva effetti significativi sui novelli l'abbiamo avuta tenendo in osservazione alcuni soggetti in colombaia: dopo la somministrazione della cabergolina non abbiamo notato alcun segno che lasciasse presumere uno stato di sofferenza.

#### Sperimentazione con gli adulti.

Per la sperimentazione con i colombi adulti abbiamo approfittato di 18 gare con distanze da 100 Km fino a 820 Km. In ogni gara fra i colombi lanciati è sempre stato incluso un vedovo per controllare se effettivamente la prolattina avesse un ruolo anche in questi animali, costretti a vivere in modo del tutto innaturale, ovvero tenuti lontano dalla propria compagna e dal proprio nido, potendoli incontrare solo per pochi minuti in occasione dell'ingabbio e dell'arrivo dalla gara.

Tab.4. Risultati ottenuti dal lancio di vedovi trattati (T) con L.sulpiride rispetto ai controlli (C)

Distanza Km	Ora di Lancio	Ora arrivo Trattati	Ora arrivo Controlli	Velocità m/min T.	Velocità m/min C.
100	10.30	11.52.27	11.51.03	1219.5121	1234.5679
140	10.30	12.11.36	12.28.50	1287.5878	1172.7178
175	10.30	13.18.07	13.27.52	1045.1076	1010.0525
310	7.30	12.00.42	12.13.26	1163.9453	1111.6547
310	7.30	12.33.13	12.47.35	1039.1249	992.1176
480	7.00	14.43.49	14.46.15	1035.6031	1030.1984
310	7.00	11.15.13	11.19.13	1234.5589	1215.5083
285	6.30	10.45.25	10.50.42	1093.1941	1071.0395
550	6.00	14.21.14	14.18.03	1088.4352	1095.3920
310	6.00	10.27.02	10.31.05	1179.9276	1162.2994
670	6.00	16.54.29	16.24.59	1038.2999	1087.3090
250	6.00	9.25.50	9.17.34	1176.3887	1235.5323
720	6.00	17.57.44	17.45.17	1018.8631	1011.2794
127	7.00	11.09.56	11.11.59	1073.0461	1064.3164
820	5.45	20.14.58	20.03.27	956.8942	969.7012
225	6.00	9.12.52	9.23.02	1355.0962	1275.4768
240	6.00	10.37.37	10.55.06	868.2476	816.8079
320	6.30	11.45.28	11.13.13	1023.1192	1148.3787

Tab. 5. Risultati ottenuti dal lancio di maschi naturali in cova trattati (T) con l.sulpiride e non trattati (C).

Distanza Km	Ora di Lancio	Ora arrivo Trattati	Ora arrivo Controlli	Velocità m/min T.	Velocità m/min C.
100	10.30	12.09.50	12.08.57	1002.6041	1010.4855
140	10.30	12.05.48	12.19.02	1112.9450	1006.5921
245	10.30	13.23.25	13.29.12	1013.1666	980.4688
310	7.30	12.13.26	12.16.07	1111.6547	1101.2291
360	7.30	12.47.35	12.47.19	992.1176	992.6513
480	7.00	14.47.07	14.55.17	1028.2870	1010.6182
310	7.00	11.16.38	11.19.13	1227.7439	1215.5083
285	6.30	10.50.54	10.52.50	1070.2185	1062.3462
550	6.00	14.18.03	14.21.14	1095.3920	1088.4352
210	6.00	10.31.05	10.37.30	1162.2994	1135.4234
670	6.00	17.16.55	16.57.34	1003.8902	1033.4313
250	6.00	non class.	Non class.		
720	6.00	17.56.40	17.57.44	1007.9163	1033.4313
127	7.00	11.12.08	11.14.02	1063.6832	1055.7176
820	5.45	20.32.30	20.24.12	937.9606	946.8153
225	6.00	9.23.02	non class.	1275.4768	-
240	6.00	non class.	non class.	-	-
320	6.00	non class.	non class.	-	-

I colombi non classificati perché fuori tempo, sono stati utilizzati per la sperimentazione in quanto erano gli unici in gara come maschi al naturale. Le gare si sono svolte verso la fine del campionato, nella seconda metà di luglio, e i colombi in sperimentazione sono stati lanciati nonostante la muta in atto, pertanto non sono entrati in classifica per scarso rendimento nel volo presentando le file di piume remiganti incomplete.

Tab. 6. Risultati ottenuti dal lancio di maschi naturali e vedovi trattati (T) con cabergolina.

Distanza Km	Ora di Lancio	Ora arrivo naturali	Ora arrivo vedovi	Velocità m/min N.	Velocità m/min V.
100	10.30	12.09.30	perso	1004.8388	-
140	10.30	perso	12.56.46	-	953.8770
254	10.30	13.23.50	13.23.25	1010.7383	1013.1667
310	7.30	perso	12.19.01	-	1087.6704
310	7.30	13.07.27	12.56.54	933.7087	963.8422
480	7.00	15.03.03	nonclass.	994.3691	-
310	7.00	11.20.31	11.22.36	1209.4428	1199.8477
285	6.30	11.00.36	10.59.06	1033.3189	1037.6068
550	6.00	14.23.02	nonclass.	1084.5405	-
310	6.00	non class.	10.37.30	-	1136.5170
670	6.00	17.37.23	perso	974.4282	-
250	6.00	9.25.50	non class.	1176.3887	-
720	6.00	perso	19.33.32	-	-
270	7.00	11.18.56	non class.	1035.7492	-
820	5.45	20.32.30	non class.	937.9606	-
225	6.00	9.23.02	non class.	1275.4768	-
240	6.00	10.55.06	non class.	816.8079	-
320	6.30	11.45.28	non class.	1023.1192	-

Per i non classificati si intendono i colombi non entrati in classifica ma comunque tornati. Per essi, ad esempio si prenda come punto di riferimento il tempo dell'ultimo classificato della gara di 320 Km. : m/min.808.8107.

Tab.7. Risultati ottenuti dai colombi maschi, Naturali (NC) e Vedovi (VC), non trattati con cabergolina.

Distanza Km	Ora di Lancio	Ora arrivo NC	Ora arrivo VC	Velocità m/min NC.	Velocità m/min VC.
100	10.30	11.51.03	12.11.16	1234.5679	987.5450
140	10.30	12.28.50	12.49.15	1172.7178	1005.3766
245	10.30	13.27.52	13.29.12	1010.0525	980.4688
310	7.30	12.13.26	12.16.07	1111.6547	1101.2291
360	7.30	12.47.35	12.47.19	992.1176	992.9513
480	7.00	12.46.15	14.55.17	1030.1984	1010.6182
310	7.00	11.19.13	11.19.13	1215.5083	1215.5083
285	6.30	10.50.42	10.52.50	1071.0395	1062.3462
550	6.00	14.18.03	14.21.14	1095.3920	1088.4352
210	6.00	10.31.05	10.37.30	1162.2994	1135.4234
670	6.00	16.24.59	16.57.34	1087.3090	1033.4313
250	6.00	9.17.34	non class.	1235.5323	-
720	6.00	17.45.17	17.57.44	1011.2794	1006.4184
127	7.00	11.11.59	11.14.02	1064.3164	1055.7176
820	5.45	20.03.27	20.24.12	969.7012	946.8153
225	6.00	9.23.02	non class.	1275.4768	-
240	6.00	10.55.06	non class.	816.8079	-
320	6.30	11.13.13	non class.	1148.3787	-

La somministrazione di cabergolina ha dato risultati sorprendentemente positivi. La maggior parte dei maschi trattati ha infatti coperto le distanze in tempi notevolmente peggiori rispetto al gruppo di controllo. Molti trattati sono rimasti esclusi dalla classifica o addirittura persi. I risultati peggiori si sono avuti nei maschi naturali rispetto ai vedovi trattati.

Tab. 8. Risultati ottenuti dal lancio di femmine in cova trattate (T) con l.sulpiride rispetto ai controlli (C).

Distanza Km	Ora di Lancio	Ora arrivo Trattate	Ora arrivo Controlli	Velocità m/min T.	Velocità m/min C.
100	10.30	12.06.40	12.07.32	1034.2002	1027.5030
140	10.30	12.34.29	12.37.40	1124.8329	1096.7211
245	10.30	13.21.18	13.25.27	1025.6859	1001.4249
310	7.30	12.24.58	12.27.04	1068.1885	1060.6373
310	7.30	12.58.17	12.59.54	959.7807	955.0773
480	7.00	14.58.41	14.58.41	1003.4400	1003.4400
310	7.00	11.19.13	11.16.38	1215.5083	1227.7439
550	6.00	14.10.59	14.08.17	1111.1579	1117.3021
310	6.00	10.37.30	11.02.53	1135.4234	1040.2685
720	6.00	17.54.17	18.56.09	1011.2794	930.6706
820	5.45	20.24.12	20.13.57	946.8153	957.9838

Mancano i risultati di 7 gare in cui 2 femmine trattate e 5 non trattate non sono state classificate. Dopo l'arrivo dell'ultimo colombo in classifica, i tempi di arrivo degli altri non vengono più registrati, perché a volte occorre aspettare uno o più colombi per ore senza la sicurezza del loro ritorno.

Tab.9. Risultati ottenuti dal lancio di femmine con i novelli trattate (T) con L.sulpiride rispetto ai controlli (C).

Distanza Km	Ora di Lancio	Ora arrivo Trattate	Ora arrivo Controlli	Velocità m/min T.	Velocità m/min C.
100	10.30	12.09.30	12.10.00	1004.9456	999.5732
140	10.30	12.16.45	12.14.50	1023.7433	1038.6389
245	10.30	13.28.44	13.29.12	983.0287	980.4688
310	7.30	12.27.04	12.24.58	1060.6373	1068.1885
360	7.30	13.07.27	13.07.27	933.7087	933.7087
480	7.00	15.03.03	15.07.02	994.3691	986.2364
310	7.00	11.20.46	11.22.36	1208.2833	1199.8477
550	6.00	14.23.02	14.21.14	1084.5405	1088.4352
310	6.00	10.33.15	10.36.49	1166.8801	1151.8454
670	6.00	17.41.38	17.30.02	973.5997	989.9667
250	6.00	9.24.38	9.25.23	1206.3034	1201.9963
270	7.00	11.25.35	11.25.13	1028.3401	1029.7618
240	6.00	11.38.25	11.08.15	750.3177	758.6174
320	6.30	11.45.28	11.52.54	1023.1192	1004.4596

Mancano i risultati di 4 gare in cui 1 femmina trattata e 3 non trattate non sono state classificate.

Tab.10. Risultati ottenuti dal lancio di femmine in cova (A) e con i novelli (B), trattate con cabergolina.

Distanza Km	Ora di Lancio	Ora arrivo gruppoA	Ora arrivo gruppoB	Velocità m/min A	Velocità m/min. B
100	10.30	13.38.44	13.38.35	951.1833	951.9399
140	10.30	persa	non class.	-	-
180	10.30	13.08.58	13.11.09	942.8361	936.8020
310	7.30	12.35.43	12.37.10	1017.1837	1038.0358
310	7.30	13.11.38	non class.	933.3106	-
480	7.00	15.05.51	15.40.20	984.7072	919.4491
310	7.00	11.21.36	non class.	1188.7232	-
285	6.30	11.10.08	non class.	1014.0885	-
550	6.00	15.36.07	persa	955.4141	-
310	6.00	11.27.36	12.55.54	949.2369	769.9207
670	6.00	7.24.08g.d.	non class.	644.4042	-
250	6.00	non class.	9.34.47	-	1148.8322
720	6.00	6.33.20g.d.	non class.	728.0242	-
270	7.00	11.32.53	11.25.44	982.8010	992.9880
820	5.45	persa	9.04.03g.d.	-	723.8294
225	6.00	non class.	non class.	-	-
240	6.00	12.58.09	non class.	637.4190	-
320	6.30	non class.	12.12.54	-	941.2657

Mancano i risultati di 4 gare in cui 1 femmina trattata e 3 non trattate non sono state classificate.

Tab.11. Valori ottenuti dalle femmine non trattate in covia (AC) e con i novelli (BC).

Distanza Km	Ora di Lancio	Ora arrivo gruppo AC	Ora arrivo gruppo BC	Velocità m/min AC	Velocità m/min. BC
100	10.30	12.07.32	12.10.00	1027.5030	999.5732
140	10.30	12.37.40	12.14.50	1096.7211	1038.6389
245	10.30	13.25.27	13.29.12	1001.4249	980.4688
310	7.30	12.27.04	12.24.58	1060.6373	1068.1885
360	7.30	12.59.54	13.07.27	955.0773	933.7087
480	7.00	14.58.41	15.07.02	1003.4400	986.2364
310	7.00	11.16.38	11.22.36	1227.7439	1199.8477
285	6.30	non class.	non class.	-	-
550	6.00	14.08.17	14.21.14	1117.3021	1088.4352
310	6.00	11.02.53	10.36.49	1040.2685	1151.8454
670	6.00	non class.	17.30.02	-	989.9667
250	6.00	9.27.03	9.25.03	1169.4760	1201.9963
720	6.00	18.56.09	non class.	930.6706	-
270	7.00	non class.	11.25.13	-	1029.7618
820	5.45	20.13.57	7.04.41 g.d.	957.9838	807.6563
225	6.00	non class.	9.42.28	-	1163.1625
240	6.00	nonclass.	11.08.15	-	758.6174
320	6.30	12.12.54	11.52.54	941.2657	1004.4596

Anche nelle femmine trattate con cabergolina si è rilevato un generale peggioramento nel ritorno alla colombaia rispetto ai gruppi di controllo. Parimenti a quanto notato nei maschi, le prestazioni peggiori si sono avute sui soggetti che stavano allevando i novelli rispetto a quelli in covia.

#### Considerazioni e conclusioni.

Questa sperimentazione sul campo ci ha permesso di valutare il ruolo della prolattina nella stimolazione al ritorno, " homing", del colombo viaggiatore. Dai risultati emersi dopo la somministrazione di farmaci attivi sulla prolattinemia, si è potuto osservare che, quando la gara si svolgeva entro le 24 ore dal trattamento, i maschi vedovi hanno dimostrato una velocità di rientro superiore non solo rispetto ai maschi naturali di controllo, ma anche ai naturali in covia trattati.

La terapia ha dimostrato un esito decisamente positivo soprattutto per quanto riguarda le gare di velocità. Nelle gare di mezzo fondo e di fondo i risultati sono stati inconsistenti; ciò può essere spiegato

dal fatto che troppo tempo intercorreva dal trattamento, effettuato all'atto dell'ingabbio, al lancio. L'emivita del farmaco infatti non garantiva una copertura sufficiente per assicurare un elevato tasso di prolattinemia fino al termine della gara.

Nei maschi naturali in covia trattati, si è potuto constatare che l'incremento della prolattinemia ha dato risultati positivi nella velocità di rientro, nei primi due terzi della stagione agonistica. Oltre questo periodo, a partire dal mese di luglio, la somministrazione di levosulpiride, si è rivelata dannosa dal punto di vista agonistico. La prolattina è un ormone che oltre alle cure parentali, partecipa anche al meccanismo di regolazione della muta. La l.sulpiride negli animali trattati anticipa il ricambio del piumaggio di circa una settimana rispetto al gruppo di controllo, pertanto i colombe trattati arrivano alle ultime gare con le ali ricoperte da meno remiganti, il che provoca una diminuita portanza e di conseguenza un maggior sforzo durante il volo.

Per quanto riguarda le femmine in covia e con i novelli, abbiamo accertato che esse erano meno sensibili al l.sulpiride dei maschi. Ciò può essere spiegato in quanto la prolattinemia nelle femmine in covia, ma soprattutto in quelle con i novelli, la produzione del latte del gozzo è naturalmente elevata.

Dalla somministrazione di cabergolina si sono avuti risultati molto positivi: la maggior parte dei colombe trattati con questo antiprolattinico ha infatti coperto le distanze in tempi

notevolmente peggiori

rispetto al gruppo di controllo e molti trattati sono rimasti esclusi dalla classifica e addirittura persi. Le femmine sono risultate molto più sensibili alla somministrazione di cabergolina, deducendo che anche nel colombo femmina, come in genere nei mammiferi, la prolattina riveste un ruolo più pesante nelle cure parentali di quanto non sia per i maschi. Osservando infatti il comportamento di coppia anche nel colombo emerge che, sebbene vi sia una stretta collaborazione nella cura della prole, è la femmina ad offrire dedizione maggiore.

Per quanto riguarda i colombi novelli, sia il trattamento con l.sulpiride, che quello con cabergolina non ha influito significativamente sul loro rendimento agonistico. È interessante comunque notare l'aumento delle velocità medie, dopo le prime due gare di addestramento, nonostante il concomitante aumento del chilometraggio. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che i novelli, dopo le prime due gare di addestramento, cominciano a prendere progressivamente familiarità con i meccanismi di orientamento nonché una maggior resistenza alla fatica. La prolattinemia non ha quindi molta influenza sul rientro alla colombaia, in quanto i novelli, quando cominciano a volare, sono ancora impuberi, quindi è probabile che non siano ancora sensibili a variazioni ormonali tali da modificare il comportamento sociale. Quale è allora lo stimolo che spinge i novelli al ritorno, dal momento che essi non hanno ancora né una compagna, né un nido da accudire? Possiamo dire che più che la prolattina sia il senso dell'olfatto a stimolare il ritorno nei novelli. È stata elaborata una "ipotesi olfattiva della navigazione", secondo cui il colombo imparerebbe a riconoscere nell'odore dei venti, quello delle zone in cui è inserita la colombaia: ad ogni odore sarebbe associata una direzione, così che nell'insieme sensoriale del colombo si delinea una mappa geografica olfattiva (Papi 1976). Come avviene per i mammiferi già nella fase prenatale con "l'odore di mamma" acquisito con l'ingestione del liquido amniotico, anche per il colombo novello "l'odore di casa" può essere utilizzabile in territorio limitato intorno alla colombaia. Lo stimolo olfattivo associato alla vista, può nei novelli anticipare l'uso dei meccanismi bussolari cerebrali e le stimolazioni ormonali che caratterizzano "l'homing" nel colombo adulto (Baldaccini 1986).

Per concludere le sostanze attive sulla prolattinemia possono essere utilizzate come doping, nella attività agonistica del colombo? Dalla nostra esperienza risulta che ciò è possibile solo in modo limitato. Da queste esperienze effettuate sul campo emerge infatti che negli animali in cui il tasso di prolattinemia è già naturalmente elevato, un ulteriore aumento di prolattina non provoca variazioni significative.

A ciò si aggiunge la effettiva impossibilità per gli allevatori di somministrare il farmaco ai propri animali nel momento più propizio, in pratica poche ore prima del lancio: l'incremento della prolattinemia pertanto può essere limitato alle gare di velocità a chilometraggio tra i 150 e 300 Km; risulta, come abbiamo notato, molto meno efficace nelle gare di mezzo fondo, addirittura nullo in quelle di fondo oltre i 600 Km.

RIASSUNTO. Il ruolo della prolattina nel comportamento di "homing" durante gare di velocità, fondo e mezzofondo, è stato studiato nel colombo viaggiatore mediante la somministrazione orale di agenti che inducono riduzione e/o aumento dei livelli dell'ormone. Come anti prolattinemico è stata usata la cabergolina, un agonista selettivo dei recettori dopaminergici D2 dotato di elevata emivita plasmatica, mentre come iperprolattinemico si è utilizzata la levo-sulpiride, caratterizzato da attività antagonista a livello dei recettori D2. Gli effetti di questi composti sono stati valutati in diversi tipi di colombi viaggiatori, in cui lo stimolo al ritorno alla colombaia era legato a diverse situazioni; in particolare, si sono usati animali novelli (5-7 settimane di età), adulti in cova e adulti vedovi in cui lo stimolo al ritorno era dato dalla privazione della compagna 2-3 giorni prima del lancio. Né la levo-sulpiride (5 mg) né la cabergolina (25 meg.) hanno significativamente influenzato la velocità di rientro nei colombi novelli; al contrario, l'incremento di prolattina indotto dalla levosulpiride ha significativamente aumentato la velocità di rientro nei maschi vedovi e nei maschi in cova, mentre tempi notevolmente peggiori rispetto ai controlli si sono registrati nei colombi trattati con cabergolina. Gli effetti sono stati evidenti soprattutto nelle gare di velocità che si svolgevano entro 24 ore dal trattamento. Dai risultati ottenuti si può concludere che la prolattina svolge un ruolo importante nel rientro alla colombaia soprattutto nei colombi adulti, come dimostrato dagli effetti dei farmaci che ne influenzano i livelli ematici. Va detto che l'intensità di tali effetti è strettamente dipendente dai livelli dell'ormone preesistenti; al contrario, negli animali novelli le variazioni dei livelli ematici di prolattina non sembrano influenzare significativamente il comportamento sociale, suggerendo che altri fattori sono determinanti in questa fase dello sviluppo.

Parole chiave: Colombo, prolattina, cabergolina, ritorno (homing).

Key words: Pigeon, prolactin, cabergoline, homing.

SUMMARY. The role of prolactin on homing was investigated in the carrier pigeon during speed, middle and long distance race, by means of oral administration of the selective dopaminergic D2 receptor agonist, cabergoline and of the selective D2 receptor antagonist levosulpiride. Different types of pigeons were used: adult brooding males and females, adult parting by brooding females (widowers) and spring pigeons. Neither levosulpiride (5 mg) nor cabergoline (25 meg.) significantly modify the speed of return in spring pigeons; by contrast, levosulpiride significantly sped up homing in brooding males and in widowers, whereas cabergoline had the opposite effect. These effects were particularly evident in speed races, which ended within 24 h from the drug administration. It can be concluded from these data that prolactin can have profound influences on homing behaviour in the carrier pigeon, by accelerating speed of return; this effect was evident only in adult animals and was highly dependent on the preexisting levels of the hormone.

## Bibliografia.

- Baldaccini E. Il colombo viaggiatore. Edagricole, Bologna 1986.
- Ballabio R., Salvo R., Vigo D., Nisoli L.G.C., Colombani C. Controllo della pseudogavidanza nella cagna mediante somministrazione parenterale di cabergolina. Atti SISVET XLIV.1990.
- Ferraro F., Nisoli L.G.C., Maffeo G., Ballabio R. Effetto della somministrazione di un inibitore prolattinico nei piccioni. Documenti Veterinari 11,49,1992.
- Goodman & Gilman's. The Pharmacological basis of Therapeutics. 9th Ed. Hardman J.G., Limbird L.E. (eds). New York 1996.
- Marusi A., Coruzzi G. Effetti di un nuovo antiprolattinico ( cabergolina) nel colombo viaggiatore. Annali.Fac. Med.Vet.Universita' di Parma 231,1987.
- Papi F. The olfactory navigation system of the homing pigeon. Verh.Dtsch Zool.Ges.184,69,1976.
- Rains C.P., Bryson H.M., Fitton A. Cabergoline. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation. Drugs 49,255,1995.

## DOG'S AGGRESSIVENESS TOWARDS MAN. DIAGNOSTIC METHODS AND PREVENTIVE SUGGESTIONS

Chiara Bertani \*, Pier Giovanni Bracchi \*\*

(\*) *Medico Veterinario, E-mail: chiaraber@libero.it.*

(\*\*) *Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma.*

### **Definition of aggressiveness**

Referring to the terms use in psychology, Zingarelli defines "aggressiveness" as an inclination to display a hostile behaviour whose goal is the attacker's increase and the attacked's decrease in power and which is usually manifested as a reaction against an actual or apparent threat to one's own power.

"Aggression" is otherwise defined, in its literal meaning, as the act of aggressing or assaulting.

In ethology, Parmigiani points out the importance of distinguishing between the two terms, which are often misinterpreted as synonyms. As a matter of fact, aggressiveness does not always results in aggression.

By the term "aggressiveness" we mean the motivational factors which predispose to aggressive action whereas the word "aggression" concerns those manifestations of threat, anger and possibly attack upon an animal of the same species or of a different species or even upon any kind of object.

Aggressiveness is not therefore insomuch a measurable entity but a conceptual term used in ethology to describe the direct causes within the individual, that is to say the neural, neurochemical and physiological substrates which, in response to certain environmental stimuli, start up or inhibit motivation to attack an animal of the same species or of a different species (Parmigianui, 1992).

Thence derives that the only scientifically acceptable way of measuring an individual's level of aggressiveness is the evaluation of aggressive actions manifested by the individual in different situations.

Concerning this, Overall has recently graduated and measured the intensity of dog's aggressiveness using posture, vocalization and mouth attitude as indicators.

In the end it must be said that dog's aggressiveness, as well as the aggressiveness of other animal species and man, might not always be held as noxious and undesirable.

On the contrary, aggressiveness is the most refined and sublime expression of that complicated mechanism which regulates the preservation of a species. Aggression can be, in a particular context, a suitable response, as in the case of a dog defending its own master against a robber or from any kind of danger by growling, snarling, showing teeth or even biting.

### **Canine aggressiveness towards man**

Aggressiveness towards human beings certainly represents the most relevant aspect of this behaviour problem in dogs, both with reference to the scope of the phenomenon and to its socioeconomic implications. It is enough to say that just in the United States about 10 traumatic deaths from dogs attacks per annum are recorded, and that most of the victims are children (Pinckney and coll., 1982); moreover the 50% of attacks victims ensue permanent scars of aesthetic and/or functional consequence, while the 30% of cases result in absence from work or school (Berger & coll., 1974; Pinckney & coll., 1982; both quoted by Overall, 1997).

Without getting into the field of legal competence or legal medicine, a throughout analysis of such a phenomenon, which is reaching epidemic proportions, is plainly important, together with an attempt at suggesting possible solutions.

A survey of literature proves, in fact, that all over the world the interest in this specific problem remains restricted to that narrow group of researchers studying animal behaviour.

Notwithstanding the problem's proportion and the stress put by the Mass-Media upon frequent events of dogs attacks towards people, preventive and precautionary measures have not been taken by competent A.S.L., nor have veterinarians or dogs' owners shown any particular interest. Through a recent enquiry, Caruso and Dondi pointed out the general absolute indifference to such an issue: customers rarely ask a veterinarian's advice about the breed of the dog they want to buy or about its possible aggressiveness; on the other hand the veterinarian himself seldom spontaneously give information about the matter on his medical examination of the puppy.

The cause of aggression in dogs may depend on several reasons that include bad social relationships, fear, territoriality, dominance, jealousy and also overfeeding (Voith & coll., 1980; Voith & coll., 1982). Dogs can recognize human gesticulatory code which can be related to signals of dominance and represent a menace to the dog (Voith & coll., 1982). Dominance aggression is generally manifested towards people the dog knows very well and often belong to the closest circle of the family (Voith & coll., 1982). The aggression, whose scenario is usually represented by the dog's dwelling's vicinity, can express important components of territoriality. On the contrary, a stray dog is usually afraid of human beings and is rarely aggressive. Nevertheless many authors keep on asserting the opposite thesis, believing a stray dog can be much more aggressive than a pet dog.

Concerning the cause of dog aggressiveness towards children, see what has been previously said.

### ***Incidence***

As it has been previously stated, the incidence of dogs' aggressions towards people is so elevated that some authors (Sacks & coll., 1996; Harris and coll., 1974) actually talk of a problem which should be considered as having epidemic characteristics.

An inquiry held by the "American Pet Food Institute" pointed out that the 38% of the American families owns a dog; the N.A.C.S. reports that medical costs related to dog bites is second only to the medical costs for sexually transmitted disease.

Among cases of animal bites in human beings, dogs occupy a preeminent place. In the United States, over a canine population of 55 million individuals, the "Human Society of the United States" reports an annual average of about 3 million dog bites, with a climax of 4.7 million in 1995.

In the city of St. Louis (Missouri) 396 people over a population of 100 thousand are annually attacked by a dog (Beck & coll., 1975), while in Norfolk (Virginia) the average is 274 attacked people every 100 thousand inhabitants every year (Morton, 1973).

In Australia, Thompson (1997) points out that, from January 1990 to June 1993, the Queen Elizabeth Hospital in Adelaide treated 356 victims of dog bites, while during 1992 3093 cases have been registered by the "South Australian Health Omnibus Survey".

In Adelaide, 6500 people on the whole undergo dog attacks every year and 810 of them usually need to be treated in hospital. This means that every year 7.3 over 10 thousand inhabitants of Adelaide undergo major trauma which cannot be treated in surgery (GB).

In the Netherlands the "Foundation for Consumption and Safety" (Bouw, Aggressive Behaviour in dog) reports that, with a canine population of one million 700 thousand individuals, annually seek medical care for dog bites.

In Italy, Lodetti and Bertasio (1990) report 40 thousand charged incidents every year, while the ISTAT reports evidence of 16 fatal incidents between 1985 and 1993, four of which concerned children between 5 and 9 years old.

In the light of these figures, although concerning only a few countries, the problem clearly reveals an epidemiologic quality comparable in percentage to all civilized countries; this suggests the urgent need to detect specific operative strategies in order to reduce the problem's incidence to an acceptable number of traumatic events.

### ***Characteristics of the aggressing dogs***

Concerning dog aggressions towards human beings, it is quite difficult to detect precise information about the dog breed. There are several reasons for this. In first place, one important reason is the diverse geographical distribution of the various breeds. Nevertheless it must be said that in an inquiry about the most popular dog breeds in the United States, held comparatively with a similar enquiry in the United Kingdom, Bredshaw and his collaborators (1999) noticed that of 56 dog breeds they had been studying, 36 corresponded to the same breeds in Britain, and 24 of them, showed comparatively similar qualities in terms of aggressiveness and in the frequency of attacks towards people.

A second reason is the fact that registrations are often incomplete or inconclusive; in fact, only the 29.1% of owned dogs are regularly registered. A last but not least reason is the extreme mutability in popularity of certain dog breeds in time: nowadays' most dangerous breed is undoubtedly very different from the one of future days (Sacks & coll., 1989).

It has been previously hinted at the possibility of dividing dog breeds in categories on the basis of their tendency to aggressiveness. Data in literature suggest that dogs whose breeds have been ascertained as among the most aggressive ones are those most frequently responsible for attacks towards man. The German shepherd or Alsatian, for instance, seems to be the one more frequently involved in attacks towards people, although we should consider that most dogs with wolf physical characteristics, but of different breed, are often mistaken for German shepherds.

### ***Characteristic of the victims***

One of the first elements which has to be taken into consideration is the age of the victim. All case histories agree in recognizing in children the category more violently struck by this phenomenon.

After an accurate survey of literature, Wright (1985) points out that children under 10 are those most frequently involved in dog attacks, with an average percentage of 48.2% to 48.9%.

In particular, children between 5 and 9 years old result to be the victims of dog attacks in a percentage swinging between 24.3% and 30.5% depending on single cases.

Concerning this, Daniels (1986) observed that in the Arizona Navajo Reserve, 42.1% of children under 10 undergo dog bites, even though they represent only a 26.4% of the whole population.

In StLouis children only represent the 8% of the population; nevertheless 27.4.% of them, in an age between 5 and 9 years old, is involved in traumatic attacks, with a rate of 1231 bites every 100 thousand children every year (Beck, 1975).

In Norfolk, Virginia, the incidence of victims of the same age is of 1851 dog bites every 100 thousand children every year.

Nevertheless, it may be interesting to observe that some case histories offer different proportions, which can be the result of a different distribution of age-groups in the population or of different activities and opportunities of meeting between children and dogs.

For instance, Brobst and his collaborators (1959) presented a case history in which in Pittsburgh in 1957 the population under 20 represented the 35% of the whole population and suffered dog attacks at a rate of 76.7%.

In Dallas, on the other hand, in 1985, the same kind of young population represented the 31% of the whole inhabitants, but suffered traumatic dog bites only at a rate of 52% of cases (Wright, 1985). According to Thompson (1997), children under 4 years old suffer dog attacks, which then require medical treatment in hospital, twice as much as individuals between 11 and 45 years old; in the same way adults over 76 are involved in dog aggressions twice as much as adults between 36 and 75 years old.

We should then consider that there is a strict relation between the entity of injuries from dog bites and the age of victims, since the highest tribute, also in terms of mortality, is obviously paid by children.

As concerns sex, male human beings are usually more frequently involved attacks by dogs. In a survey of several studies, Wright (1985) observes that among the Indian population male individuals are involved in severe dog attacks for a 65% of the whole population, which may seemingly depend upon the fact that the relation between males and dogs usually is the most common one.

In an inquiry held in Sacramento, it has been observed that 67% of 2,767 contacts between dogs and people corresponds to a male/dog contact (Westbrook & coll., 1979). Another element which apparently accounts for the highest incidence of dog bites in male individuals in these latter's stronger willingness to keep a dog as a companion animal.

### ***Relation between biting dogs and victims***

Existing and verifiable cases are essentially of two sorts:

- The dog knows the victim;
- The dog does not know the victim.

In this area we can then range from dogs owned by the victim to dogs owned by the victim's neighbour or even stray dogs whose owners remain unknown. Undoubtedly, thanks to preventive strategies towards stray dogs in the United States, today's statistics report a very low degree of stray dogs' involvement in attacks towards people (between 9.5% and 22%), particularly when compared to figures of thirty years ago (Beck, 1985). As a matter of fact, studies made in New York and Pittsburgh in the 1950s and 1960s (Harris, 1974) showed estimates of 19-22%, which went down to 10.6 - 14.5% in the years 1970s and 1980s already (Westbrook & coll., 1979).

From a research held in Pennsylvania over more than 3 thousand pupils, it was discovered that 45% of them had been bitten by a dog, which was, in 30% of cases, their own owned dog (Beck & coll., 1985).

A research held in Dallas over 1,754 cases of bites by owned and stray dogs shows that the former are generally much more dangerous than the latter: owned dogs are, in fact, responsible for several cases of bites in the head, face and nose (Wright).

The 85% of cases are then represented by dogs which are much close to the victim, being either owned by the victim himself or by friends or relatives (Kizer, 1979).

Most woundings by dogs take place around the victim's house (Avner & coll., 1991). It is interesting to notice how Shewell and his collaborators (1991), collecting data of 107 cases from 1982 through 1989, could come to the conclusion that dog bites generally occur while playing with them, (12%) stroking them (13%) or in the act waking them up (15%).

As concerns fatal attacks, studies clearly show owned dogs as more frequently involved than stray dogs. Taking a glance at figures, owned dogs were involved in all 71 cases of death by dog bite related in the United States between 1966 and 1980, as well as in the 16 cases in South Carolina between 1979 and 1982 and in the 12 cases related in 1986 (Lockwood & coll., 1987).

### ***Seat of dog bite injury***

The most common seat of dog bite injuries is certainly represented by the body extremity.

The average percentage of injuries to body extremities as verified over a wide number of cases (Beck, 1985) is of 76.4%: 42.8% concerns legs, 33.5% arms, 15% head and neck, and 8% the trunk.

According to a research made by Wright, it is interesting to notice how stray dogs seem to prefer human limbs (86.8% versus 76.8%), specially fingers (stray dogs 36.3%, owned dogs 20.5%), whereas owned dogs tend to prefer heads and faces (16.53% versus 5.89%). That may depend on the different behavioural relation existing between man and dogs in the two different cases.

In children, in particular, stray dogs show a tendency towards biting hands, those parts of the body which more often move, while pet dogs tend to attack the child's face, with particular reference to the mouth area.

The aggression usually takes place during play, when both dog and child are engaged in play on the ground. By playing, children often increase the possibility of a dog's attack, since they are often used to playfully assaulting the animal either verbally or physically (Line & coll., 1986).

Other reasons which can account for dogs' tendency to attack head and neck in children are children's low bodily height and their natural promptness in protecting the face with hands (Fleisches & coll., 1986).

Karlson's inquiry in 1984 and Thomson's in 1995 give evidence of this: in 1984 at the Wisconsin Hospital among 87 treated facial injuries, more than 50% concerned children under 6 years old. In the same way more than 50% of 112 serious cases of facial dog bites in Chicago hospitals concerned children under 4.



Hand and forearm dorsum scalp



Cheer injurie



Nose amputation



Eyelid burting



Ear amputation



Labium substance loss

## ***Fatal dog attacks***

Though the victim's death does not occur so frequently, such a severe fatality deserves special attention. Pinkey (1982) states that the highest tribute is usually paid by children and old people. Between 1966 and 1980, in fact, every 100 deaths by dog bites 86.4 concerned children under 12 (Pinkey & coll., 1982), and from 1979 to 1988 70% of the dead were children under 9 years old (Rubin & coll., 1982).

Sacks (1996) reports a case history of 109 deaths in the United States from 1989 to 1994, to be added to other 9 reported accidents between 1993 and 1994.

Kneafsey and Brogan respectively report one and two fatal cases in 1995.

A recently published research by Sacks (1996) is particularly interesting: he draws attention to 85 well documented fatal dog attacks - among 118 presented - and points out that 72.9% of them involves only one dog, 21.1% two dogs and 5.9% of the attacks concern children under 10 years old.

A singular aspect of fatal dog attacks is represented by teasing victims to pieces. In the United States, in 1959, Parrish & coll. report an incidence of 10 cases every year, while Borchelet & coll. report a far higher percentage in 1983.

Cortivo & coll. report a survey of studies held all over the world in 1988 and report, starting from 1903, 38 cases of fatal dog attacks, to which they add two personal reports. Children's age more vividly struck by these accidents seems to be the one between 1 and a half month and 10 years old.

Though the incidence of this phenomenon results to be irrelevant in figures when compared to the whole canine population of the United States (7.1 cases for 100 million inhabitants every year), it is nevertheless worth reminding that, according to Pinckney and Kennedy, in 1982 the risk of death by dog attack in the United States was far superior to the risk of death by rabid dog bite.

Concerning this, Harris (1974) noticed that most attacks towards human beings, either resulting in violent death or non-fatal injuries, usually involved awned dogs. Dogs more frequently involved in fatal attacks were those of large size, often trained to be watch-dogs or for personal defence.

About 50% of fatal attacks towards human beings involve two or more dogs; on the contrary non-fatal bites almost ever involve one only dog. In fact, it is commonly acknowledged that being part of a pack usually makes dogs feel braver and more aggressive, increasing the probability of the victim's death in the attack. As far as breed is concerned, the dog most frequently involved in fatal attacks towards human beings is the German shepherd, responsible for 25 attacks over 40.

Ethological studies so far have not been able to elucidate those factors which cause a dog to attack man and, above all, to go on with the attack until the victim's man and, above all, to go on with the attack until the victim's death: that is to say that it is not possible to decide whether dogs are intentional or unintentional killers.

If territoriality seems to be one of the major motivations for dog bites in bibliography, the same cannot be said of cases of victims torn to pieces. Attacks of such a gravity as these, in fact, often occur in territories habitually unfrequented by the dog.

As far as "provocation" is concerned, it is often invoked to explain reasons for dog bites but it remains most improbable as a justification for fatal attacks. Dealing with big dogs of a notoriously aggressive breed, which can sometimes attack in groups, we can hardly imagine a man, though strong and fit, deliberately trying to provoke such animals.

A relevant aspect of dog attacks by tearing victims to pieces is that such victims as newly-born children or babies (Pinckney, 1982) are usually killed at home, mainly when they have been brought home when a dog was already present, according to a kind of behaviour in the dog that man generally classifies as "jealousy".

Trying to explain aggressiveness of such a considerable extent, in 1967 Lorenz stressed the role of breed selection in determining the occurrence of psychic hereditary taints in dogs.

In 1975, Handel related the story of a Great Dane that slaughtered a young girl of 6. A retrospective inquiry revealed that the dog came from a family characterized by hereditary taints, that it had changed eight owners in nearly four years and had already attacked several people. No owner had managed to tame or train the dog.

Undoubtedly hunger is not a valid motivation for slaughtering people. Borchelet (1983) noticed, in fact, that no considerable parts of human flesh are ever missing in victims' bodies. In most cases, a fatal dog attack remains void of any logical explanation, and its actual motivations seem to escape us (Pinckney, 1982).

Borchelet & coll. (1983) accurately analyze three cases of attack by tearing victims to pieces by packs of dogs - 25 packs altogether - , and take into consideration some potential causes of aggression. They put aside the hypothesis of hunger because, even if the dogs nutrition conditions were not excellent, those parts of the corpse which had been removed had not actually been eaten, if not just partially.

They also consider the role of predatory aggressiveness, since some of the dogs used to hunt together and had been seen chasing a prey just before the attack. The aggression seemed to have been started by only one dog which excites the whole group of dogs to further attack, drawing back to a sort of facilitated predatory behaviour.

The role of territory defence may also have been an important element in determining the three attacks, which all occurred close to or even inside the estate where the dogs lived, and all involved people the dogs had already been in contact with.

On the other hand Beck & coll. (1975) remind that 45% of 2,538 cases of dog bites in 1975 occurred inside or close to the estate the dogs lived in; Winkler (1977) records 11 fatal aggressions which also occurred inside the estates the dogs lived in.

In these specific cases, all dogs had developed an aggressive social behaviour towards people and had been encouraged to threaten anyone who approached their area. Moreover some of the dogs were used to chasing cars and motorbikes.

The elevated number of animals forming the pack of dogs undoubtedly made the attack easier, both because of the higher probability to wound the victim and the fact that the pack was formed by a considerable number of big dogs.

Even though there is no evidence that hunger had any role in the attack, it must be remembered that these dogs had often hunted together and this understanding in hunting may have been of first rate importance in determining the attack and provoking the consequent eating of flesh.

In no one of these cases the victim had provoked the dogs, even if it is apparent that any manifestation of fear and self - defence may have increased the violence of the dogs' attack.

As a conclusion, it seems that the combined action of different elements can increase dogs' aggressiveness and make it easier to perform violent attacks towards people. In this context, the possibility of gathering in groups, better when formed by dogs of big size, undoubtedly plays a fundamental role.

Fatal attacks often occur in isolated places. As a constant lack of witnesses demonstrates, when they occur inside a victim's house this latter is almost always alone.

There is a strict relation between the distribution along the day both of fatal attacks and non-fatal bites (Parrish, 1959; Harris, 1974; Daniels, 1986), with a climax in the afternoons, whereas nocturnal activity is practically nonexistent. This is certainly due to the coincidence of human and canine maximum activity during afternoon hours.

There are no important seasonal differences in dog attacks, even if Harris (1986), Chun (1982) and Daniels (1986) record that a climax is represented by summertime, while attacks in winter remain at a lower level.

It is also interesting to point out that the victims of fatal attacks by slaughtering can be divided into three groups: newly-born children and babies, children under eight, and old people (mainly women). All three groups are made of weak individuals, generally unable to protect or defend themselves properly; as a matter of fact dogs hardly ever assault strong healthy adults in the utmost of their physical strength.

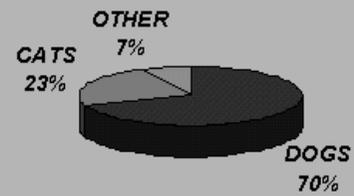
It seems significant to report Handel's observation (1975): an important element of distinction that dogs and not men are responsible for the murder is the fact that the victim of the fatal attack is completely stripped off, except for socks and shoes, and his dresses are scattered all around the area of the aggression.

The victim's death can be provoked by different factors: it can be a consequence of a prolonged attack by the dog; it can be determined by fatal injuries as soon as the attack had started; or it can be provoked by complications occurred after the state of illness determined by dogbites.

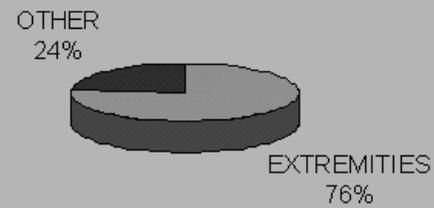
In most cases, death occurs by haemorrhage, sometimes by cerebral damage caused by a bite on the head. Death by suffocation for windpipe occlusion is rare.

One case of gaseous embolism (Hoffman, 1919) and one of adipose embolism (Houtrow, 1931) have been reported.

## ANIMALS BITES

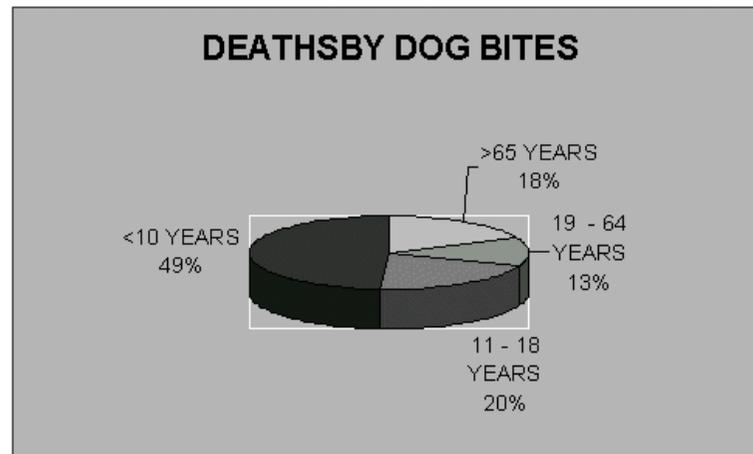
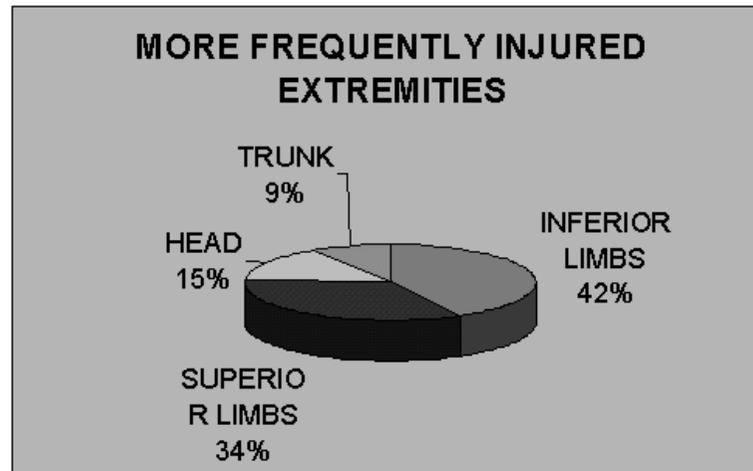


## SEATS OF INJURIES



## DOG BREEDS INVOLVED IN 40 CASES OF AGGRESSION TOWARDS CHILDREN





#### **Prevention**

Considering the severity of the problem of dog aggressiveness, mainly in terms of risk factors for man, it is necessary to put into practice the largest possible number of measures for prevention and treatment.

Two kinds of preventive actions seemed to have a favourable outcome. The first one aims at directing a dog's owner-to-be towards a selection of the best companion puppy for his family. Several authors (Overall, 1997; Hart & Hart, 1997; Don Rieck, 1997) agree in saying that, before adopting a puppy, a responsible owner-to-be should try to answer a series of fundamental questions in order to avoid a wrong choice. General information about breed and gender specifics should be collected, along with those necessary information to understand the dog's social relationships, its degree of domestication and its behavioural profile.

It is also important to consider which characteristics one expects to find in a dog and to select the best dog breed in respect of this consideration.

Moreover, the adult dog's size should also be taken into consideration. This factor implies, in fact, a long series of implications such as the owner's life style, the entity and quality of the exercise required by the dog, dog's toileting requirements, maintenance and medical costs, the overall treatment of the dog and, last but not least, the quantity of excrements to be got rid

of.

The dog's size also concerns its degree of activity, which is itself related to the dog's age and to the kind of job its breed has been selected for.

It should always be remembered that dogs daily require moments of interaction with their owner, contact with other dogs, walks, and play; the lack of all this or of one of these elements could help the dog to develop sort of "frustration" which is the premise of behavioural problems and aggressiveness.

Accordingly, the different stages of an animal's development should be taken into serious consideration. It is quite impossible to foresee a puppy's future behaviour and its social adaptation as an adult dog just on the basis of how it behaves towards other puppies.

The second kind of preventive action, which takes advantage from tests to evaluate a dog's temperament, aims at detecting genetical troubles in order to eliminate from reproduction programmes those subjects which show behavioural problems, contributing in this way to a more responsible dog breeding.

Tests on a dog's temperament and attitude, largely used by dog breeders to evaluate an animal's degree of obedience, may serve as indicators of the puppy's future behaviour and may help to choose the best family and environment for the puppy (Campbell, 1975).

One of these tests has been adapted and perfected to fit any situation and is made of 2 sections: the first part evaluates five behavioural features of the puppy (social attraction, tendency to follow, answer to compulsion, social dominance and dominance through raising); the second section takes into consideration puppy's reactions towards execution in relation to the positive outcome of some obedience tests (carrying back, sensitivity to touch, sensitivity to sounds, hunting instinct, stability and energy degree) (Barlett, 1979, 1987). The main goal is to define a puppy's fitness by elucidating its temperament and abilities in some specific tasks or jobs (Tameses, Fishner & Volhard, 1985). Dog breeders largely make use of this method to match correctly puppies and owners-to-be, and, to a lesser extent, to foresee the dog's temperament (Bartlett, 1987).

A few considerations must be made in order to evaluate the reliability of such a test. In first place, this kind of test is just a "corrective" test, which does not allow the analysis of those elements pushing a puppy to behave correctly or incorrectly. Moreover, this test is usually held when the puppy is about seven weeks old, in order to take advantage of the relative absence of strong environmental influences on the development of a puppy's behaviour; nevertheless, at this stage the environmental factor still has enough room to influence the process of definition of the dog's temperament. That is to say that if the test, on the one hand, allows an early corrective intervention on the puppy, on the other it does not preclude the possibility of future behavioural problems, which can still remain undeveloped at the age of 7 weeks. We should not then forget that the test judges the dog in a precise stage of its life, and that there are no scientific data helping to foresee specific troubles connected with behavioural problems.

Dominance aggressiveness, in particular, generally develops during the dog's social maturity (18-24 months of age). Generally, aggressive dominant dogs never show any signs of aggressiveness or dominance at an earlier stage of their life, even though they may have had some warning attitudes which foreshadowed the whole behavioural syndrome.

In the first phases of its manifestation - characterized by a specific behaviour like staring at the master, pushing, resistance to stroke or touch on paws and head, growling when disturbed in sleep -, dominance aggressiveness in dogs usually remains concealed even to tests on dog's temperament.

It is then safer to consider these tests just as indicators of a behaviour which must be corrected: if the puppy manifests any sign of improper or aggressive behaviour, it should be immediately and decisively corrected. Of course, in this case the test represents a warning and not a definite condemnation; in the same way, no signs of behavioural troubles in puppies do not guarantee for the future.

Another kind of preventive action comes from the United States, where, since a few years now, an opinion campaign has been held in favour of early dog sterilization in order to restrain both the stray dogs problem - only pure - breed dogs are being born - and the aggression problem. As a matter of fact, since hormones play an important role in the outbreak of behavioural problems in dogs, sterilization, which is now mainly used in Italy as a therapeutic treatment, can be a good preventive action when performed after 6-12 weeks of life (Sacks & coll., 1996).

At last, it is very important and to adopt specific preventive measures on the basis of the different forms of aggressiveness a dog can show:

- Nother's aggressiveness: dealing with blitches undergoing frequent pseudo-pregnancies, ovariohysterectomy represents a solution to a problem bound to be a regular and reiterated one.
- Aggressiveness caused by pain: when caused by children who play too violently with the dog, it is advisable to teach both children and dog to interact properly.

- Aggressiveness in play: it is very important to keep the situation under control when playing with the dog; since it is a puppy, in fact, a particular mechanism may be started and the dog may feel encouraged to become more and more aggressive. The owner should then be very careful not to reinforce a wrong behaviour in his dog.
- Possessive aggressiveness: in this case, it is advisable to escape any occasion of direct contact or clash with the problem dog.
- Aggressiveness on food: it is important not to give the dog any actual or fake bones, preferring biscuits or titbits, and letting the animal eat in a safe and undisturbed place. Children should not be allowed to handle food in presence of the problem dog.
- Predatory aggressiveness: this case is dangerous mainly for children, in particular when the dog shows a predation behaviour on small animals. It is then advisable not to leave children alone with the dog without an adult's supervision, at least until children reach a full degree of autonomy.
- Aggressiveness towards dogs of the same race? In case of dogs of the same sex, bound to share the same environment, it is advisable to resort to preventive castration of at least one of the two dogs, in order to avoid the outbreak of such a problem. (or Territorial aggressiveness)
- Aggressiveness for territoriality: dogs presenting such behavioural aggressiveness should never be left alone without the supervision of a master.
- Dominance aggressiveness: here is another case in which preventive castration can represent a help, though not a solution.
- Aggressiveness towards children: in view of a child's birth, it is advisable to perform a preventive plan before the child's arrival at home. The plan should include a refinement of the dog's training to obedience, anticipation of any environmental change inside the house, training to accustom the dog to the child's presence, when this latter is still in hospital, using a doll with the child's dresses and registered tapes to accustom the dog to baby's crying. At the child's arrival, the baby and the dog should get to know each other gradually; the dog's owner should work in order to accustom the baby and the dog to each other, as well as to accustom the dog to the child's changes in growth. Never should the dog be ignored or left alone with the baby.

## **Diagnosis**

The collection of anamnestic data has a fundamental role in the diagnosis of dog behavioural pathologies (Overall, 1997). In fact, several troubles such as dogs aggressiveness are influenced by age, sex and reproductive status, which lead to the anamnesis. Consequently, a series of data must be collected on the occasion of a reported accident:

- Motivation for the request of intervention;
- Responsibilities in taking care of the animal;
- Animal's activities;
- Clinical considerations (clinical anamnesis, actual clinical troubles, administered medicines);
- Description of the manifestation of the behavioural problem;
- List of problem events together with frequency and duration of every event;
- Behavioural anamnesis;
- Any previous treatment;
- Age of problem outbreak and duration;
- Members of the family;
- Modules of interaction between animal and owner;
- Considerations about the adaptation to a new family or euthanasia.

It is also important to point out cause-effect relations to be considered in any behavioural diagnosis connected with phenotype, genotype, neuroanatomy, neurophysiology/neurochemistry and molecular structure.

More complex cases are obviously connected with aetiological and physiopathological heterogeneity (multiple factor troubles);

in these cases it is possible to give a suspicious diagnosis on the basis of the description of events, and to find a help in pharmacology or, less comfortably, to perform techniques of behaviour correction.

The logic process to give out very specific diagnosis, based on the description of the animal's behaviour, is that of enlisting and explaining the single behavioural manifestations to be treated, as well as trying to elucidate the areas in which a specific intervention at behavioural level may be useful (Overall, 1997).

## **Therapy**

In the treatment of behavioural problems, intervention is usually performed on three levels: the physical level, the behavioural level, the physiological level.

Physical level. Intervention is based on the modification of the environment in order to solve the problems connected with this latter. That is the case of fences, which can make a territorial dog more aggressive and should then be removed.

Behavioural level. The second step towards the improvement of a behavioural problem such as aggressiveness is the performance of a corrective plan divided into 6 stages:

1. Accustoming: decrease of negative reaction to a new element in the environment, in relation to increasing intensity or frequency of contact with this element.
2. Extinction: a process through which normal or conditioned reactions are reduced or soothed after the exposition to a stimulus without receiving any reward back.
3. Desensitizing: reduction of the reaction produced by the gradual exposition to the stimulus.
4. Counter-conditioning: a process through which a negative behaviour is eliminated or controlled by teaching the animal a different way of behaving, usually nice and funny, which creates a competitive interference with the negative behaviour. It should be associated with desensitizing.
5. Flooding: prolonged exposition to the stimulus until any negative reaction is cancelled; this method should be performed without giving the dog any opportunity to escape.
6. Punishment: presentation of an unsympathetic stimulus as an answer to a certain behaviour is repeated in the future; it must be performed during the first 30-60 seconds after the manifestation of the negative behaviour. Temperativity, consistence, fitful intensity and conditioned answer are crucial.

Physiological level. To solve problem aggressiveness, two levels of intervention seem to be necessary, especially as a support to the techniques of behavioural correction: an endogenous intervention, represented by sterilization, and an exogenous intervention, represented by medicines administration.

Endogenous intervention. In favour of castration as a method to reduce dog aggressiveness, we can quote a quite large number of experiments made at the University of Davis, California, and at the University of Utrecht, Netherlands, all resulting in a considerable reduction of the problem a few hours after the medical intervention already. In fact, the reduction of the testosterone ematic level starts in 6 hours (Neilson, 1997). Orchiectomy reduces dogs' aggressive behaviour inside the house in 26% of cases, and outside the house in 52%. On the other hand, in some cases it is possible to notice a growth in aggressiveness both towards familiar people and unfamiliar dogs. Anyway, orchiectomy undoubtedly modifies the behaviour of fearful dogs (Maarschalkeweerd & coll., 1997).

The most important reaction to orchiectomy is the reduction of aggressiveness in male dogs from 60% to 90% (Hopkins & coll., 1976; Fry, 1987; Heidenberger & coll., 1990).

The only collateral effects of this kind of intervention are the increase in body weight (47%), the increase in hunger (25%) and the reduction of athletic outcome (21%) (Maarschalkeweerd, 1997).

Neilson & coll., (1997) studied the existence of a possible relation between the dog's age, the duration of the behavioural problem and the degree of improvement after castration: this relation resulted to be of a minimum degree or utterly non-existent.

From a retrospective revision of Neilson's work, held over 57 male dogs from 2 to 10 years of age, whose owners had been interviewed about any improvement after castration, Hart and Hart (1997) calculated the percentage of dogs presenting improvements and divided them into two groups: dogs improved for a 50% and dogs improved for a 90% and more.

Exogenous intervention. First of all, we must remember that it is always a mistake to prescribe behavioural medicines when these are not connected to a therapy which includes techniques of dogs temperament correction. Without the support of a behavioural therapy, medicines are not strong enough to eliminate all the signs of the problem in an individual (Perse, 1988).

As it normally happens in veterinary medicine, some considerations must be made before the prescription of any remedy:

1. One must be sure of the correctness of the diagnosis;
2. One must know the mechanisms of action of behavioural medicines;
3. One must have a clear idea of any collateral effect, of which the owner must be undoubtedly conscious;
4. One must evaluate the state of the animal's health (in laboratory).

**Behavioural medicines as a therapy against dog's aggressiveness:**

ANTISTAMINICS		Useful to control behavioural problems
ANTICONVULSIVES		To inhibit aggressiveness
PROGESTINICS EXTOGENS		Soothing effect against typical male behaviour
STIMULATING	Amphetamine	Paradoxical effect: they soothe hyperactive patients
SEROTONINERGICS AGENTS (Beta-blockers)	Floxedine (Dodman & coll., 1996)	They block the response of the sympathetic which is at the basis of dominance aggression.

It is important to point out that tranquillizers are not suitable for a therapy against dog aggressiveness. Fenotiazines are not suitable since they soothe both negative and normal behaviour.

Acepromazina, in particular, must be carefully used, since aggressive dogs become more reactive to sounds and disturbing elements.

As an explication, we schematically report the therapeutic suggestions for the most common forms of dog aggressiveness as elaborated by Dodman in his work: "The Dog who Loved too Much. Dogs' Behaviour and Psychology" (1999).

Dominance aggression.

1. To intensify dog's physical exercise and choose a rational diet
2. To refine training to obedience (5-10 minutes training every day, in an undisturbed environment, using just one word as order, rewarding immediate response and ignoring lack of response)
3. Food, toys, attention, cuddles, freedom must be gained by the dog itself
4. Never perform harsh games
5. Give the dog medicines when they are prescribed.

Territorial aggression

1. Physical exercise
2. Hyper-proteinic diet (16-20% of dry proteins for each food ration), except for growing dogs, dogs affected by particular disease and pregnant bitches
3. Desensitizing and counter-conditioning
4. Refinement of training and obedience
5. Allow the dog to urinate only in one place
6. Give the dog medicines when they are prescribed, for instance Propandolo.

Aggressiveness towards other dog breeds.

Connected with dominance:

1. Keep the dog under control working on obedience
2. Stop the dog, when necessary, with a leash
3. Give medicines.

Connected with predation:

1. Avoid animals which can be object of predation
2. Other therapies.

Parole chiave: aggressività, cane, uomo

Key words: aggression, dog, man

Mots clé: agressivité, chien, homme

Schlüsselwörter: aggressivität, hunde, mann

RIASSUNTO: Le patologie comportamentali possono essere considerate la malattia che più frequentemente coinvolge il cane. Non esistono dati definitivi relativi all'aggressività canina, ma si tratta certamente di un evento estremamente diffuso ed assolutamente sottostimato, oltre che scarsamente documentato. L'entità del fenomeno è caratterizzata da un incremento progressivo proporzionale a quello del numero dei cani domestici. I disturbi comportamentali sono caratterizzati da una forte componente genetica che viene alimentata da esperienze specifiche e da pressioni ambientali e gli incroci, effettuati non tenendo conto di considerazioni etiche, portano all'esacerbazione del problema. Raramente il veterinario viene consultato per avere consigli sull'acquisto di un cane, sia in riferimento alla razza, che alle attenzioni da porre in essere per una corretta educazione del cucciolo. La scarsa conoscenza del problema conduce poi il proprietario a non interpretare come patologici certi comportamenti del proprio cane ed a non ricorrere al consiglio del veterinario, lasciando che il disturbo iniziale si traduca in una patologia conclamata. Ne conseguono eventi drammatici di cui si rende protagonista il cane quali casi di morsi a bambini o addirittura di sbranamento.

ZUSAMMENFASSUNG: Die Verhaltenspathologien können die häufigsten Hundkrankheiten gehalten werden. Es gibt keine endgültigen Daten über die aggressivität des Hundes aber hierbei handelt es sich sicher um ein sehr verbreitetes und absolut vor allem wenig bezeugtes Ereignis. Der Umfang des Fenomens wird von einer progressiven proportionalen Steigerung zur Zahl der Haushunde verursacht. Die Verhaltensstörungen werden von einem stark genetischen Bestandteil charakterisiert, der durch spezifische Erfahrungen und Umwelteindrücke beeinflusst wird. Die Kreuzungen, die die ethische Seite nicht in Betracht ziehen, führen zur Verschlechterung des Problems. Selten wird der Tierarzt konsultiert, was den Kauf eines Hundes betrifft: hinsichtlich der Rasse, oder einer korrekten Erziehung des Welpen. Die geringen Kenntnisse des Problems führen den Besitzer dazu: er interpretiert manche pathologischen Verhaltensstörungen und wendet sich nicht an den Tierarzt, sodass die anfänglichen Störungen zu einer manifesten Pathologie werden. Daraus folgen oft dramatische Ereignisse, deren Protagonist der Hund selbst ist; unter ihnen leant man Fälle von Bissen an Kindern oder sogar von Zerfleischungen verzeichnet.

RÉSUMÉ: Les pathologies du comportement peuvent être considérées comme la maladie la plus fréquente chez le chien. Il n'existe pas de données définitives concernant l'agressivité du chien, mais il s'agit certainement d'un événement particulièrement diffus et absolument sous-estimé et, en plus, peu documenté. L'importance du phénomène est caractérisée par une augmentation progressive, proportionnelle à l'augmentation du nombre des chiens domestiques. Les troubles comportementaux sont caractérisés par une forte composante génétique qui est alimentée par des expériences spécifiques, par des pressions ambiantes et par des mélanges qui, effectués sans tenir compte d'aucune considération éthique, portent à l'exacerbation du problème. Il est rare qu'on demande son avis au vétérinaire pour avoir des conseils à l'occasion de l'achat d'un chien, aussi bien en ce qui concerne la race que les soins nécessaires pour une éducation du chiot correcte. La faible connaissance du problème amène le propriétaire à ne pas considérer comme pathologiques certains comportements de son propre chien, et à ne pas recourir aux conseils du vétérinaire, permettant ainsi que les troubles initiaux se traduisent en une pathologie évidente. Il en résulte des situations dramatiques où le chien devient protagoniste comme dans le cas de morsures ou même de mises en pièces.

SUMMARY: Behavioural pathologies can be considered as the most frequent disease affecting dogs. Although there are no conclusive information about dogs aggressiveness, it is unquestionably widespread disease which is generally underrated and scarcely recorded. The entity of this phenomenon is characterized by a strong genetic element, backed by specific experiment and environmental pressures, and worsen by breed crosses made in total scorn of ethical considerations. A veterinarian is rarely asked for advice about the acquisition of a correct education of the puppy. A scarce knowledge or consciousness of the problem usually is the first cause for owners' inability to recognize their dogs weird behaviour as pathological, and generally prevents them from asking for a veterinarian' advice, letting the original trouble grow into an evident disease. As a result, dogs get involved into dramatic events such as bites on children or murder by tearing victims to pieces.

## Bibliography

- AVNER J. R., BAKER M. D., 1991. *Dog bites in urban children*, Pediatrics; 88:1, 55-57.
- BAN B., 1994. *From growl to whimper: the aspect of canine behavior modification*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 205: 855-863.
- BARTLETT M., 1979. *Anovice looks at puppy aptitude testing*, Purebred dog AKC Gazette; March:31-42.
- BARTLETT M., 1987. *Follow up: puppy aptitude testing*, Purebred dog AKC Gazette; May: 64-71.
- BEAVER B. V., 1993. *Profiles of dogs presented for aggression*, Journal of the American animal hospital association; 29: 564-569.
- BECK A. M., LORING H., LOCKWOOD R., 1975. *The ecology of dog bite injury in St. Louis, Missouri*, Public health rep.; 90:262-267.
- BECK A. M., JONES B. A., 1985. *Unreported dog bites in children*, Public health rep.; 100: 315-321.
- BERGON D., DEHOFF J., 1974. *Medical costs and other aspects of dog bites in Baltimore*, Public health rep.; 89:377-381.
- BORCHELT P. L., 1983. *Aggressive behavior of dogs kept as companion animals: classification and influence of sex, reproductive status and breed*, Appl. Anim. Ethol.; 10: 45-61.
- BORCHELT P. L., LOKWOOD L., BECK A. M., VOITH V. L., 1983. *Attacks by packs of dogs involving predation on human beings*, Public health rep.; 98: 57.
- BORCHELT P. L., VOITH V. L., 1987. *L'aggressività come mezzo per esprimere la dominanza nei rapporti sociali tra cani*, Veterinaria; 1: 55-64.
- BORCHELT P. L., VOITH V. L., 1986. *Dominance aggression in dogs*, Compend. Contin. Edu. Pract. Vet.; 8: 36-44.
- BRADSHAW J. W. S., GOODWIN D., 1999. *Determination of behavioural traits of pure-breed dogs using factor analysis and cluster analysis; a comparison of studies in the USA and UK*, Research in veterinary science; 66(1): 73-76.
- BROBST D., PARRISH H. M., CLACK F. B., 1959. *The animal bite problem*, Vet. Med. May.; 54: 251-256.
- CAMPBELL W. E., 1975, 1992. *Behavior problems in dogs*, American veterinary publications, Santa Barbara, Calif..
- CHUN Y. T., BERKELHAMMER J. E., HEROLD T. L., *Dog bites in children less than 4 years old*, Pediatrics; 69:119.
- CORNEWELL J. M., 1997. *Dog bite prevention: responsible pet ownership and animal safety*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 210, 8: 1147-1148.
- CORTIVO P., RODRIGUEZ D., BORDIGNON D., TAMISO B., ALBERTON F., 1988. *Sbramento mortale da cani*, Riv. It. Med. Leg.; Vol. X
- DANIELS T. J., 1986. *A study of dog bites on the Navajo reservation*, Public health rep.; 101: 50-59.
- DODMAN N. H., 1999. *"Il cane che amava troppo. Comportamento e psicologia dei cani."* Ed. TEA PRATICA.
- DODMAN N. H., DONNELLY R., SHUSTER L., MERTENS P., RAND W., HICKZEK K., 1996. *Use of fluoxetine to treat dominance aggression in dogs*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 209:9: 1585-1587.
- DON RIECK B. S., 1997. *Dog bite prevention from animal control's perspective*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 210,8: 1145-1146.
- FLEISHER G. R., BOENNING D. A., 1981. *The treatment of animal bites in humans*, Compend Contin. Educ.; 3: 366-370.
- FRY P. D., 1987. *Veterinary practice*; 19,4.
- GERSHMAN K. A., SACKS J. J., WRIGHT J. C., 1994. *Which dogs bites? A case-control study of risk factors*, Pediatrics; 93:913-917.
- GREENHALGH C., COCKINGTON R. A., RAFTOS S. J., 1991. *An epidemiological survey of dog bites presenting to the emergency department of a childrens hospital*, Journal of pediatrics and child health; 27: 171-174.
- HANDEL K., 1975. *Nochmals: hunde können gefährlich werden*, Kriminalistik; 6:268.
- HARRIS D., IMPERATO P. J., OKEN B., 1974. *Dog bites: an unrecognized epidemic*, Bull N.J. Acad. Med.; 50: 981-1000.
- HART B. L., 1974. *Gonadal androgen and socio-sexual behavior of male mammals: a comparative analysis*, Psych Bull; 81 (7): 383-400.
- HART B. L., HART L. A., 1984. *Selecting the best companion animal: breed and gender specific behavioral profiles*, in "The pet connection: its influence on our health and quality of life.", Ed ANDERSON R. K., HART B. L., HART L. A., University of Minnesota Press, Minneapolis; 180-193.
- HART B. L., HART L. A., 1997. *Selecting, raising and caring for dogs to avoid problem aggression*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 210,8:1129-1134.
- HART B. L., MILLER M. F., 1985. *Behavioral profiles of dog breeds: a quantitative approach*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 186 8(11): 1175-1180.
- HEINDENBRGER E., UNSHEIM J., 1990. *Tierärztliche praxis*, 18:69.
- HOFMANN E. R., HABERADA A., 1919. *Lehrbuch der gerichtlichen medizin, urban und schwarzenberg*, Berlin-Wien; 308.
- HOPKINS S. G., SCHUBERT T. A., HART B. L., 1976. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 168: 1108.
- HOUTROW T., 1931. *Über die gerichtlich-medizinische würdigung von biberletzungsgendurch mensch und tier*, Z.f.d. Ges. Gerichtl. Med.; 16: 89.
- IARUSSI V., 1986. *L'aggressività nel cane domestico*, Bollettino A.I.V.P.A. N° 4.
- KARLSON T. A., 1984. *The incidence of facial injuries from dog bites*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 251:3265-3267.
- KIZER K. W., TOWN M., 1979. *Epidemiologic and clinical aspects of animal bite injuries*, J.A.C.E.P.; 8:134-141.
- LANDSBERG G. M., 1991. *The distribution of canine behavior cases at three behavior referral practice*, Vet. Med.; 86: 1011.
- LAUER E. A., WITHE W. C., LAUER B. A., 1982. *Dog bites: a neglected problem in accident prevention*, Am. J. Dis. Child; 136:202-204.

- LINE S., VOITH V. L., 1986. *Dominance aggression of dogs towards people: behavior profile and response to treatment*, Applied animal behavior science; 16: 77-83.
- LOCKWOOD R., 1979. *Dominance in wolves: useful construct or bad habit*, in "The behavior and ecology of wolves". Ed. KLINGHAMMER, New York, Garland STPMS Press; 225-244.
- LOCKWOOD R., RINDY K., 1987. *Are "pit-bulls" different? An analysis of the pit bull terrier controversy*, Anthrozoos; 1:2-8.
- LODETTE E., BERTASIO R., 1990. *Identikit del cane morsicatore*, Sel. Vet., 31:712.
- MAARSCHALKERWEERD R. J., ENDENBURG N., KIRPENSTEIJN J., KNOL B. W., 1997. *Influence of orchietomy on canine behavior*, The veterinary record; 617-619.
- MECH B. L., 1974. *The wolf. The ecology and behavior of male mammals: a comparative analysis*, Psych. Bull.; 81 (7): 383-400.
- MECH I. d., 1966. *The wolves of isle royale*, U.S. National Park service fauna service N° 7.
- MORTON C., 1973. *Dog bites in Norfolk*, Va.health services reports; 88: 59-64.
- NELSON J. C., ECKSTEIN R. A., HART B. L., 1997. *Effects of castration on problem behaviors in male dogs with reference to age and duration of behavior*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 211(2): 180-182.
- NEWMAN R. A., 1989. *Developmental plasticity of Scaphiopus Couchii tadpoles in an unpredictable environment*, Ecology; 70:1775-1787.
- O'FARRELL V., PEACHEY E., 1990. *Behavioural effects of ovariectomy on bitches*, J. Sm. Anim. Pract.; 31: 595-598.
- OVERALL K. L., 1997. *Clinical behavioral medicine for small animals*, Ed. Mosby, St. Louis.
- PARMIGIANI S., 1992. *Aggressività. "Dizionario di etologia"* diretto da MAINARDI D.; Ed. Einaudi, Torino.
- PARRISH H. M., CLACK F. B., BROBST D., MOCK J. F., 1959. *Epidemiology of dog bites*, Public health rep.; 74: 891-903.
- PERSE T., 1988. *Obsessive-compulsive disorder: a treatment review*, J. Clin. Psychiatry; 49: 48-55.
- PINCKNEY L. E., KENNEDY L. A., 1982. *Traumatic deaths from attacks in the United States*, Pediatrics; 69:193.
- PODBERSCEK A. L., BLACKSHAW J. K., 1993. *A survey of dog bites in Brisbane, Australia*, Australian veterinary practitioner; 23:178-183.
- RABB G. B., WOOLPY J. H., GINSBURG B. E., 1967. *Social relationships in a group of captive wolves*, An. Zool.; 7: 305-311.
- REISNER I. R., ERB H. E., HOUPK K. A., 1993. *Risk factors for behavior-related euthanasia among dominant-aggressive dogs: 110 cases (1989-1992)*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 205: 855-863.
- RUBIN H. D., BECK A. M., 1982. *Ecological behavior of free-ranging urban pet dogs*, Applied animal ethology; 8:161.168.
- SACKS J. J., LOCKWOOD R., HORNREICHT J., SATTIN R. W., 1996. *Fatal dog attacks, 1989-1994*, Pediatrics; 97: 891-895.
- SACKS J. J., KRESNOW M., MOUSTON B., 1996. *Dog bites: how big problem?*, Jnjury Prev.; 2:52-54.
- SACKS J. J., SATTIN R. W., BONZO S. E., 1989. *Dog bite: related fatalities from 1979 trough 1988*, J. Am. Vet. Med. Assoc.; 262:1489-1492.
- SCHENKEL R., 1947. *Ausdrucks-studien an wolfen-genangenschafts-beobachtungen*, Behavior; 1(2): 81-129.
- SHEWELL P. C., NANCARROW J. D., 1991. *Dog that bite*, B.M.J.; 303: 6816,1512-1513.
- STAFFORD K. J., 1996. *Opinions of veterinarians regarding aggression in different breeds of dogs*, New Zeland Veterinary Journal; 138-141.
- SZPAKOWSKI N. M., BONNET B. N., MARTIN S. W., 1989. *An epidemiological investigation into the reported incidents of dog biting in the City of Guelph*, Can. Vet.; 30: 937.
- TAMASES-FISHER G., VOLHARD W., 1985. *Puppy personality profile*, AKC Gazette, March: 36-42.
- THOMPSON P. G., 1997. *The public health impact of dog attacks in a major australian city*, Med. J, Aust.; 167(3): 129-132.
- TUGGIE D. W., TAYLOR D. V., STEVENS R. J., 1993. *Dog bites in children*, J. Pediatr. Surg.; 18: 533-536.
- VET. PRODUCT NEWS, 1996. 8(5): 12.
- VOITH V. L., BORCHELT P. L., 1982. *Diagnosis and treatment of dominance aggression in dogs*, Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.; 12(4): 655-663.
- VOITH V. L., 1981. *Dignosing dominance aggression*, Mod. Vet. Pract.; 62(9): 717-718.
- VOLIMER P. J., 1978. *Socially influenced aggression: the alpha syndrome*, Vet. Med. Small Anim. Clin.; 73: 141-142.
- WESTBROOK W. H., ALLEN R. D., 1979. *Animal field research*, in "Handbook of animal welfare" New York, Garland press; 148-167.
- WILSON E. O., 1975. *"Sociobiology: the new syntesis"*, Cambridge, MA, Beltkanap press of Harvard university press.
- WIESMAN N. E., CHOCHINOV H., FRASER V., 1983. *Major dog attack in children*, J. Pediatr. Surg.; 18: 533-536.
- WRIGHT J. C., 1985. *Severe attacks by dogs: characteristics of the dogs, the victims and the attack setting*, Public health rep.; 100:55.
- WRIGHT J. C., *Reported dog bites: are owned and stray dogs different?*, Anthrozoos; in press.
- WRIGHT J. C., 1991. *Canine aggression toward people: bite scenarios and prevention*, Vet. Clin: North Am. Pract.; 21829. 299-314.

Ringrazio Michela indispensabile aiuto per la traduzione del testo dall'italiano all'inglese.

# ALCUNI ASPETTI ECONOMICI DELLA ZOOTECNIA BIOLOGICA IN ALTO ADIGE<sup>1</sup>

Andrea Salghetti<sup>2</sup>, Nicolina Ruggiero<sup>3</sup>

(1) Il lavoro è frutto della collaborazione degli autori. In particolare Andrea Salghetti ha curato i paragrafi 1,2 e 3 ; Nicolina Ruggiero i paragrafi 4 e 5.

(2) *Istituto di Economia Rurale e Zooeconomia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.*

(3) *Servizio Veterinario, Azienda Speciale Unità Sanitaria Locale Est, Provincia Autonoma di Bolzano.*

## 1. Introduzione

Di fronte al terzo millennio i produttori agricoli debbono sostenere nuove sfide legate alla concorrenza comunitaria e alla globalizzazione dei mercati. Nel nostro Paese il settore primario è ancora carente nella organizzazione mercantile, mentre non ha nulla da invidiare ad altri Paesi per quanto concerne le capacità tecniche dei produttori.

In particolare negli ultimi decenni la nostra zootecnia ha fatto grandi passi in avanti dimostrando di non essere da meno degli altri paesi dell'Unione Europea sul piano tecnologico e produttivo, pur attraversando alcune difficoltà organizzative.

Il comparto zootecnico ha subito un'intensa industrializzazione col verificarsi di un'elevata specializzazione ed intensificazione produttiva con forte impiego di pesticidi, concimi chimici, mangimi concentrati integrati e farmaci, introdotti non solo per la terapia delle malattie ma anche per la profilassi e la metafilassi.

Attraverso le economie di scala, che si sono fatte più diffuse, si è allargato il budget delle imprese ed è aumentato il reddito. A caratterizzare la dimensione dell'impresa non è più la dimensione fisica delle aziende, bensì il volume d'affari, con produzioni che si possono realizzare anche nelle aziende senza terra. Quindi, nel caso degli allevamenti bovini, è la mandria che rende meglio il concetto della dimensione aziendale.

L'ampliamento della mandria e l'aumento della produttività hanno accresciuto il fabbisogno di mezzi produttivi, con particolare riguardo per quelli di origine extra-aziendale.

Accanto a questa strategia produttiva di tipo convenzionale si sono fatti avanti negli ultimi anni nuovi modi di produrre, più rispettosi dell'ambiente e della salubrità dei prodotti, cosiddetti "alternativi", che hanno in un primo tempo coinvolto le produzioni vegetali e più recentemente quelle animali, in particolare dei bovini da latte.

Il metodo biologico può essere considerato uno di questi. In termini prettamente economici tali metodi si sono dimostrati efficaci nella differenziazione dei prodotti sul mercato, riscuotendo il consenso del consumatore, che si è reso disponibile al riconoscimento di un maggiore prezzo.

Più recentemente i ritmi di diffusione dell'agricoltura ecocompatibile in Italia si sono fatti accelerati, grazie agli incentivi finanziari pubblici previsti dai regolamenti comunitari.

Anche gli imprenditori agricoli dell'Alto Adige hanno avviato questo nuovo modo di produrre, sia pure con ritmi diversi rispetto ad altre aree del Paese e con tipologie aziendali peculiari della natura del territorio e delle condizioni economico-sociali.

Essendo ormai conclusa la fase pionieristica ed avviata a tutti gli effetti la filiera dei prodotti biologici, si è ritenuto di condurre un'indagine specifica sulla realtà dell'agricoltura biologica in Alto Adige, con particolare riguardo per il comparto zootecnico, cercando di individuare le caratteristiche organizzative, strutturali ed economiche di una realtà nuova ed in rapida diffusione.

## 2. Breve quadro normativo

La regolamentazione sulle produzioni biologiche ha interessato essenzialmente tre livelli istituzionali:

- comunitario;

- nazionale;

- regionale.

Tali normative sono state precedute e accompagnate dai regolamenti elaborati dagli Organismi di rappresentanza dei produttori biologici.

Un primo tentativo di intervento pubblico risale al 1985 con un regime di aiuti comunitari per l'agricoltura ecocompatibile. Il riferimento specifico all'agricoltura biologica viene fatto nel 1987 (regolamento Ce 1760/87) con la possibilità di finanziare iniziative per ottenere prodotti agrobiologici.

L'intervento comunitario non è limitato agli aspetti ecocompatibili dei prodotti biologici, quanto alle conseguenze che ne derivano: riduzione delle eccedenze produttive con minori spese per il loro smaltimento, salvaguardia degli equilibri ambientali e della salubrità delle produzioni.

Il principale intervento normativo sull'agricoltura biologica si deve al regolamento Ce 2092/91, relativo al metodo di produzione biologica di prodotti agricoli ed all'indicazione di tale metodo sui prodotti e le derrate alimentari. Il regolamento definisce anche le norme del sistema di controllo, che in Italia viene svolto da Enti privati con il coordinamento del Ministero dell'Agricoltura. Attualmente gli Organismi di controllo riconosciuti a livello nazionale sono nove: AIAB, Associazione Suolo e Salute, BIOAGRICOOOP, CCCP, CODEX, ECOCERT Italia, IMC, O.C.&I. e Bios. A questi va aggiunto il BIOZERT con sede ad Augsburg in Germania, riconosciuto solo nella Provincia di Bolzano.

La normativa comunitaria è stata preceduta da iniziative spontanee di Organizzazioni di promozione e tutela delle produzioni biologiche. Gli interventi degli Enti pubblici hanno invece fatto seguito alla regolamentazione comunitaria, salvo alcune eccezioni.

In realtà il regolamento Ce 2092/91 si occupava solamente delle produzioni biologiche vegetali e rimandava a tempi successivi (1995) la regolamentazione sulle produzioni animali.

Solamente nel 1999, forse per sollecitazione di eventi eccezionali quali la "mucca pazza" e i "polli alla diossina", si è giunti a fissare delle norme anche per le produzioni animali con il regolamento Ce 1804/99 del 19/7/99 pubblicato sulla GU Ce L 222 del 24/8/99.

Secondo il regolamento sulla zootecnia biologica sono escluse dall'alimentazione le farine animali, i mangimi che fanno uso di solventi chimici, foraggi non biologici e ottenuti con l'impiego di organismi geneticamente modificati e/o prodotti derivati da tali organismi.

La normativa si estende comunque a tutta la filiera produttiva: dall'origine degli animali, al loro benessere, all'alimentazione, alla profilassi e cure veterinarie, alla gestione zootecnica, agli edifici, al trasporto, ecc.

Il carico massimo di bestiame per ettaro SAU non deve superare l'apporto di 170 kg di azoto per anno, frutto delle rispettive deiezioni. Sulla base di questo parametro si può risalire al carico di animali per ettaro per singola specie.

Ciò nonostante le produzioni biologiche di origine animale hanno avuto possibilità di sviluppo, in attesa del nuovo regolamento, perchè ritenute valide le regolamentazioni convenute dagli Organismi di rappresentanza dei produttori biologici internazionali e nazionali (IFOAM, FIAO, AIAB ecc.) e altre normative specifiche dei singoli Paesi e di Enti locali.

La Provincia Autonoma di Bolzano è stata una delle prime ad occuparsi delle produzioni biologiche grazie alla Legge Provinciale n. 12 del 30/4/91 relativa alle norme per la regolamentazione e promozione dell'agricoltura biologica e della produzione integrata.

Molto importante per la diffusione delle produzioni biologiche è stata poi l'emanazione del regolamento Ce 2078/92 relativo a metodi di produzione agricola compatibili con le esigenze di protezione dell'ambiente e con la cura dello spazio "naturale", in quanto prevede un regime di aiuti per le attività a minore impatto ambientale, come è appunto l'agricoltura biologica.

Ai regolamenti comunitari hanno fatto seguito le iniziative nazionali e regionali di recepimento, con successive modifiche e integrazioni.

La Provincia Autonoma di Bolzano ha recepito il regolamento Ce 2078/92 con il Programma Operativo approvato nel dicembre 1993 ed attivato già dal 1994.

Le misure approvate sono 9, tra queste la 6 riguarda proprio le produzioni biologiche. I premi previsti consistono in 1.668.000 lire ad ettaro per le produzioni frutticole-viticole e 596.100 per quelle orticole. In pratica i premi medi per le aziende biologiche, secondo un'indagine dell'INEA relativamente al periodo 1994/97, si aggirano tra i 5 ed i 6 milioni di lire.

Il regolamento Ce 2078/92 ha avuto un ruolo determinante nel coprire i maggiori costi della produzione biologica rispetto alle tecniche convenzionali, ed i riconoscimenti di prezzo dei prodotti di nicchia hanno fatto il resto. Ben si comprende quindi l'efficacia della misura del programma agroambientale, caratterizzata da un trend molto marcato nel quadriennio.

In ogni modo è opportuno sottolineare come l'intervento finanziato nell'ambito del regolamento Ce 2078/92 della Provincia Autonoma di Bolzano ha riguardato per il 90% circa degli stanziamenti l'obiettivo del mantenimento dell'agricoltura nelle zone di alta montagna, trovando una stretta coerenza tra gli obiettivi del Programma provinciale e la formulazione delle misure.

Ulteriori azioni legislative faranno seguito al recente regolamento sulle produzioni biologiche animali, rendendo assai più complesso il quadro normativo al quale si dovranno attenere i produttori agricoli che vogliono applicare il metodo biologico.

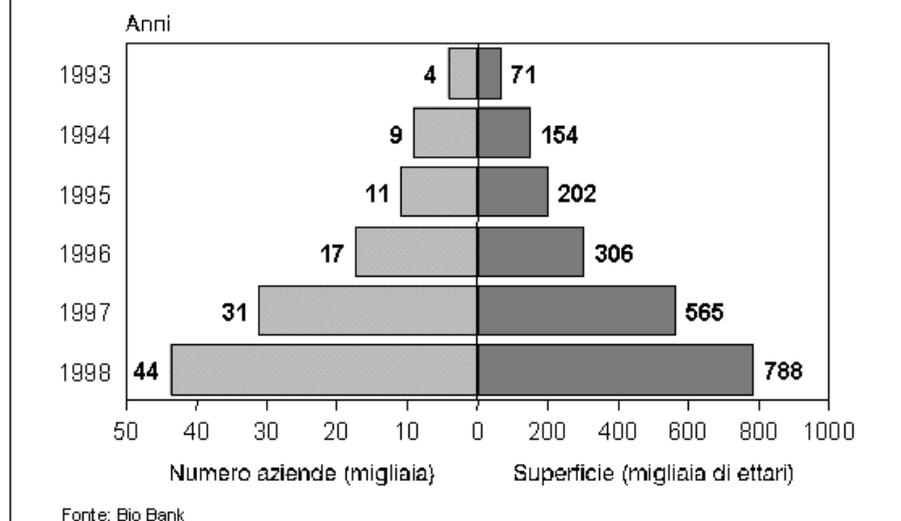
Anche i programmi previsti dalla riforma della PAC con Agenda 2000 tendono a privilegiare, tramite le azioni di accompagnamento, le produzioni più rispettose dell'ambiente, della salute dei consumatori e del benessere animale.

### 3. I ritmi di sviluppo dell'agricoltura biologica

L'agrobiologia in Italia ha iniziato i suoi primi passi negli anni Ottanta, mentre è dal 1995 in poi che i ritmi di diffusione si sono fatti più marcati, in coincidenza con il recepimento del regolamento Ce 2078/92 avvenuto con un certo ritardo in Italia ed in forma alquanto differenziata dalle Regioni.

Dalle pubblicazioni EUROSTAT nel 1987 le aziende biologiche in Italia erano quantificate in 800 unità con 9.000 ettari di superficie. Nel 1990, secondo un'indagine della Lega Ambiente, risultavano presenti 1.700 aziende che coltivavano con metodo biologico 17.000 ettari. Dai dati statistici forniti dal MIRAFAF nel 1993 risultavano iscritte 4.092 aziende per una superficie complessiva di 91.639 ettari. Dalle elaborazioni fornite da Bio Bank i dati del 1993 sono leggermente diversi, risulta comunque evidente la progressione dal 1995 in poi, infatti nel 1998 si arriva a 43.698 aziende con 788.070 ettari di superficie. Pertanto dal 1987 al 1998 le aziende si sono moltiplicate per 55 e la superficie per 88. Le stime da parte degli Organismi di settore per il 1998 ci pongono al primo posto in Europa.

Graf. 1 - Aziende biologiche in Italia e relativa superficie



La diffusione dell'agrobiologia non è solo un fenomeno italiano ma interessa molti altri Paesi. Secondo i dati raccolti dall'IFOAM in Italia interessa oltre il 5% della SAU, ma si attesta sul 7% in Svizzera, Svezia e Finlandia, mentre raggiunge il 10% in Austria.

Con riferimento al 1997, quasi la metà delle aziende biologiche si trova nelle isole (42,4%) segue l'Italia meridionale con il 24,4%. Complessivamente al Sud si concentra il 66,8% delle aziende, il restante 33,2% si ripartisce invece tra le regioni dell'Italia centro-settentrionale.

La maggiore estensione della superficie è collocata sempre nelle Isole (46,3%), seguita dal Sud (24,7%), mentre il Centro (14,3%) e il Nord (14,7%) si trovano in una posizione analoga.

Viceversa se guardiamo alle aziende di trasformazione la loro collocazione è per oltre la metà al Nord, dove esistono anche le reti di commercializzazione e le aree di maggior consumo.

All'inizio l'agricoltura biologica era rivolta principalmente alle produzioni vegetali, solo più tardi ha assunto importanza anche l'allevamento per la produzione di alimenti biologici di origine animale.

Le cause di questo ritardo sono molteplici ma quelle principali sono essenzialmente due:

- maggiore complessità alla conversione al metodo biologico di produzione degli animali rispetto alle colture;
- ritardo nell'emanazione del regolamento comunitario per le produzioni biologiche animali.

La specie maggiormente interessata al metodo biologico è quella bovina per la produzione del latte. Per la carne esistono ancora dei problemi mercantili nella differenziazione della produzione biologica rispetto a quella convenzionale, anche se alcune recenti iniziative hanno cercato di superare questo problema.

Secondo una ricerca condotta nel 1995 sulla zootecnia biologica nell'Italia settentrionale (Salghetti, 1997) è emerso chiaramente il dualismo tra le numerose e piccole aziende lattifere di collina e montagna che valorizzano il prodotto con la trasformazione, la vendita diretta e l'agriturismo rispetto ai pochi e grossi allevamenti della pianura che sono i fornitori di materia prima per l'industria di trasformazione e la grande distribuzione.

Gli allevamenti da carne sono invece funzionali alle produzioni vegetali biologiche, rappresentando una specie di "male necessario", anche se la vendita diretta della carne in loco ha consentito di valorizzare anche questa produzione con un riconoscimento di prezzo.

Sempre dall'indagine citata, i prodotti biologi hanno dimostrato di godere di un *premium price* che va dal 10 al 20% del prezzo di mercato del prodotto convenzionale.

Naturalmente i costi di produzione del biologico sono maggiori a fronte di quantitativi prodotti spesse volte inferiori. Il produttore biologico riesce a far fronte a questi *handicaps* con un maggior riconoscimento di prezzo dei prodotti sul mercato e col sostegno finanziario pubblico previsto dal regolamento Ce 2078/92.

#### 4. Situazione in Alto Adige

##### 4.1. Alcuni elementi sull'agricoltura e la zootecnia

L'agricoltura dell'Alto Adige è fortemente integrata con l'economia del territorio, caratterizzato in prevalenza da aree montane, dove le uniche attività primarie possibili sono quella forestale, il pascolo e le coltivazioni di foraggi.

Per il resto, nelle zone di media collina e nei fondovalle, frutticoltura a base di mele e viticoltura fanno la parte del leone, mentre allevamenti di trote e coltivazione di piccoli frutti e ortaggi costituiscono valide attività di nicchia.

La superficie agricola utile rappresenta solamente il 37% del territorio, di questa ben il 61% è rappresentata dai pascoli e il 28% dai prati che fanno da supporto all'allevamento bovino, che rappresenta il comparto più importante dell'economia del primario. Le altre coltivazioni di rilievo sono la frutticoltura (6,5%) e la viticoltura (2%). Infatti il 48% delle aziende sono interessate all'allevamento zootecnico, al quale si aggiunge un altro 10% ad indirizzo zootecnico-forestale. Seguono per importanza, con il 27%, le aziende frutticole, quelle fruttivicole (7%), viticole (5%) e forestali (3%).

Tab. 1 - Patrimonio zootecnico in Alto Adige

Specie	A N N O		
	1982 (1)	1990 (1)	1998 (2)
Bovini	139.708	151.143	147.850
Equini	2.593	3.319	5.200
Ovini	25.796	32.293	41.000
Caprini	7.930	11.130	15.000
Suini	34.923	25.273	24.910
Avicoli	261.986	188.387	190.000
Conigli	41.910	32.485	30.500

(1) Fonte: ISTAT

(2) Stime dell'Ispettorato all'Agricoltura della Provincia di Bolzano

Il patrimonio bovino tende a stabilizzarsi sui 150.000 capi, nonostante la lieve contrazione del numero degli allevamenti per la chiusura delle piccole stalle, non più economiche, con una ulteriore espansione delle aziende più grandi.

Tra le altre specie stanno acquistando sempre più peso gli ovini, i caprini e gli equini destinati all'equitazione. Abbastanza stabili sono le altre specie: suini, avicoli e conigli.

La produzione lattiera è in continua espansione nonostante la crisi di mercato dei prodotti lattiero caseari che ha avuto inizio nel 1995. Si tratta comunque di un fenomeno generalizzato in tutta Italia.

Per molti agricoltori l'allevamento delle specie minori costituisce una valida alternativa, quando non può essere ampliata la produzione bovina.

Il settore agricolo è tenuto in grande considerazione in Alto Adige non solamente per la funzione produttiva ma anche per la sua funzione sociale, di salvaguardia del territorio e dell'ambiente, per la conservazione della cultura e delle tradizioni locali. Ne sono testimonianza i massicci interventi pubblici di sostegno e le normative specifiche per il settore.

Una particolarità della struttura fondiaria in Alto Adige è costituita dal "maso chiuso", tipico istituto dell'azienda familiare locale, che garantisce l'integrità del fondo anche nelle successioni familiari e la cui presenza assume ruoli di plurifunzionalità (architettura rurale, paesaggio, turismo, conservazione dell'ambiente).

La frammentazione fondiaria è infatti una delle cause dell'abbandono e dello spopolamento delle aree di montagna e l'istituto del "maso chiuso" ha fatto da freno a questo degrado.

#### 4.2 Stato attuale dell'agrobiologia

Secondo i dati forniti dall'Ispettorato all'Agricoltura della Provincia Autonoma di Bolzano, nel 1998 erano presenti 166 aziende biologiche in Alto Adige, delle quali 105 a completo regime biologico, 12 miste (parte biologiche e parte convenzionali) e 49 di trasformazione.

Nei primi mesi del 1999 si sono aggiunte altre 40 adesioni, per cui il numero complessivo delle aziende biologiche è passato a 206 unità. Tra le aziende di trasformazione la quota più significativa attiene alla commercializzazione dell'ortofrutta (15).

La ripartizione della superficie delle prime aziende vede l'affermarsi della frutticoltura (52,8%), seguita dalla foraggicoltura (35,5%) e dalla viticoltura (6,9%), a seguire diversi altri indirizzi produttivi.

Delle 32 aziende biologiche con allevamento va tenuto conto che 8 sono ancora in fase di conversione e 3 sono ad indirizzo misto, pertanto quelle biologiche complete sono 21.

Tab. 2- Ripartizione della superficie delle aziende biologiche per tipo di coltivazione

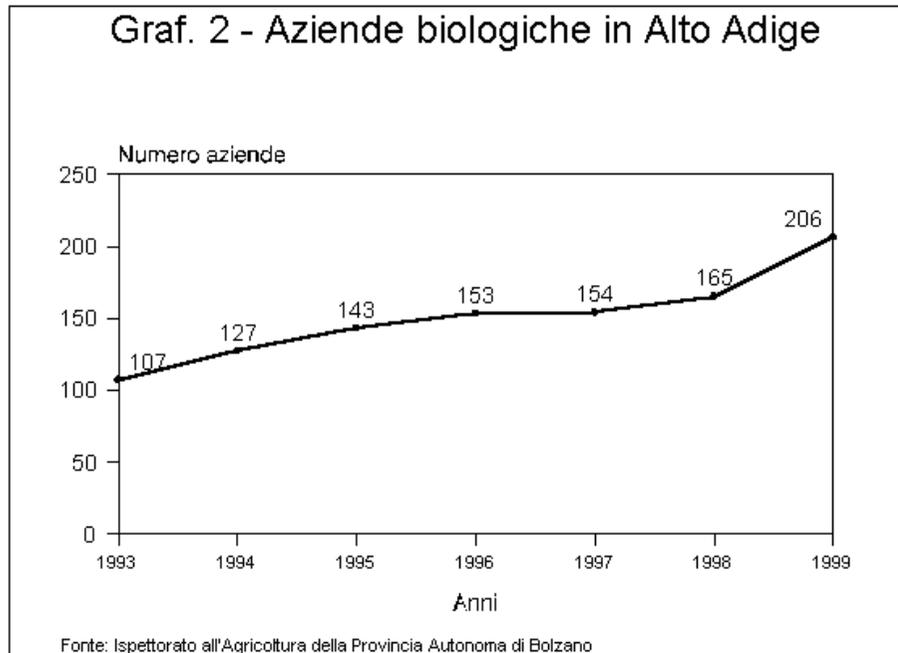
Tipo di coltivazione	Superficie biologica	
	ettari	%
- Frutticoltura	405,88	52,8
- Viticoltura	52,75	6,9
- Arativo	12,55	1,6
- Orticoltura	10,30	1,3
- Seminativi	10,23	1,3
- Piante officinali	2,00	0,3
- Vivai	2,59	0,3
- Prati permanenti	273,09	35,5
TOTALE	769,39	100,0

La parte dell'Alto Adige dove è più diffusa l'agrobiologia e l'allevamento biologico è quella intorno a Merano e in Val Venosta. Quivi sono presenti anche due realtà interessanti legate alla produzione biologica:

- la commercializzazione di carne biologica presso un macellaio di Terlano;
- la commercializzazione di latte biologico presso la latteria sociale di Merano.

Nel primo caso viene riconosciuto ai produttori di carne un premium price del 10%, mentre per il latte si arriva all'11%. In complesso, a partire dal mese di giugno del 1998, sono stati commercializzati in media 600 litri di latte biologico al giorno.

Graf. 2 - Aziende biologiche in Alto Adige



L'espansione dell'agrobiologia è destinata a continuare, grazie anche all'elargizione dei contributi previsti dal regolamento Ce 2078/92 che ormai è entrato in pieno regime.

Se guardiamo in retrospettiva osserviamo che i maggiori ritmi espansivi del biologico si sono avuti in Alto Adige dal 1993 al 1996. Nel conteggio del 1999 sono state aggiunte le nuove adesioni (40), inoltre sono sommate anche le aziende biologiche presenti prima del 1993, in tal modo si arriva alle 206 aziende biologiche del 1999.

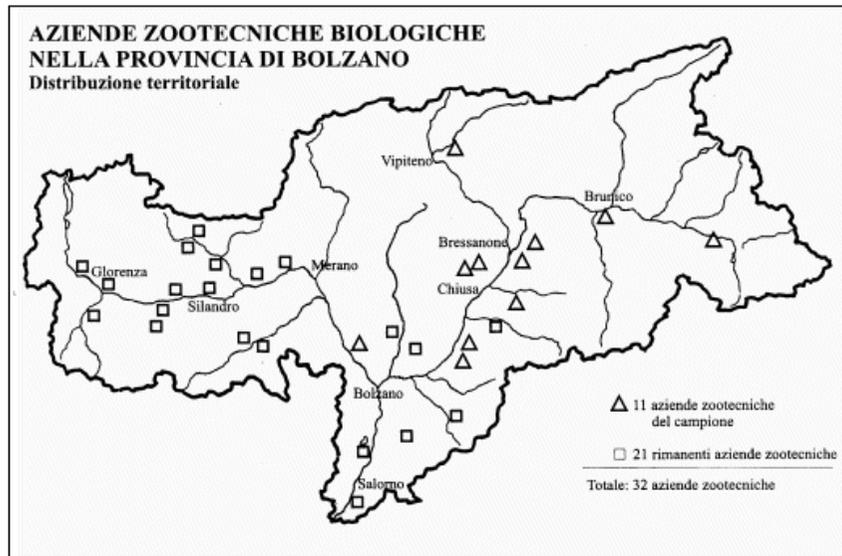
La conversione al metodo biologico di produzione nel 1993 da parte dei produttori agricoli ha coinciso con l'approvazione di un programma di intervento della Giunta Provinciale Altoatesina per lo stanziamento di fondi a favore di un'agricoltura più rispettosa dell'ambiente.

Nel 1999 vi è stato un altro boom di adesioni al metodo biologico dal momento che è stato elaborato un analogo piano provinciale di intervento.

Il nuovo piano è impostato su otto misure di intervento e precisamente:

- contributi per le aziende zootecniche;
- disposizioni per l'allevamento;
- misure per la cerealicoltura nelle zone di montagna;
- requisiti per la viticoltura ecocompatibile;
- requisiti per l'agricoltura biologica;
- disposizioni per l'orticoltura ecocompatibile;

- premi per l'alpeggio;
- contributi per la cura del paesaggio.



#### 4.3. L'attività delle Associazioni biologiche

Nella Provincia di Bolzano sono presenti tre Associazioni biologiche alle quali aderiscono praticamente tutte le aziende agricole e di allevamento che adottano il metodo dell'agricoltura biologica e biodinamica.

La principale Associazione che vi opera è la BIOLAND-Alto Adige, con sede a Terlano, come emanazione dell'Associazione BIOLAND della Germania a cui aderiscono oltre la metà delle aziende presenti.

L'organismo di controllo è il BIOZERT, sempre della Germania, e riconosciuto anche in Italia per la zona dell'Alto Adige. L'Associazione ha emanato delle proprie direttive per la gestione delle aziende zootecniche biologiche che attengono a tutta la filiera: dalla produzione di foraggi all'acquisto di capi, al governo degli animali, alla macellazione degli animali sino alla commercializzazione della carne. Da questa Associazione si è staccato recentemente un gruppo di agricoltori della Val Venosta, per costituire la BIO-VALVENOSTA.

Segue l'Unione Coltivatori Alternativi (UCA) con sede a Morter in Val Venosta. L'organismo di controllo è l'AIAB, riconosciuto in tutto il territorio nazionale. E' un'associazione nata nel 1987 e finalizzata principalmente alla tutela delle produzioni biologiche vegetali ecocompatibili più che a quelle zootecniche.

L'Associazione promuove metodi naturali di coltivazione che venivano utilizzati anticamente per conservare la fertilità naturale del terreno quali:

- la diversificazione delle colture;
- la lavorazione mirata del suolo;

- la rotazione delle coltivazioni;
- l'uso del concime organico;
- l'uso del compost come concime.

Anche in questo caso sono state elaborate delle direttive alle quali i produttori si devono attenere. E' naturale che gli animali nutriti con foraggi e cereali provenienti da aziende soggette a tali direttive forniscano prodotti del tutto conformi ai requisiti dell'agricoltura biologica.

In generale le aziende aderenti si dedicano principalmente alla produzione di frutta, ortaggi, erbe aromatiche e miele; in alcune si affianca anche l'allevamento biologico di varie specie (bovini, suini, ovicaprini, avicoli, cunicoli ed in un'azienda anche daini).

La terza è l'Associazione BIODINAMICA, legata appunto all'agricoltura biodinamica, con sede a Lana. L'organismo di controllo è la CODEX, anch'essa riconosciuta a livello nazionale.

I produttori biodinamici possono conferire i loro prodotti al Consorzio OSIRIS, con sede a Gargazzone, che si occupa della commercializzazione.

Le norme di produzione sono quelle peculiari dell'agricoltura biodinamica i cui canoni rientrano a pieno titolo tra quelli della produzione biologica. L'agricoltura biodinamica propugna una più stretta connessione tra produzioni vegetali e zootecniche per garantire un armonico divenire della chiusura naturale del ciclo della vita.

## 5. Indagine su un gruppo di aziende biologiche con bovini in Alto Adige

### 5.1. Metodologia

Per avere una conoscenza più approfondita della zootecnia biologica è stato necessario entrare nelle aziende per cogliere dall'interno le peculiarità del nuovo modo di produrre, le motivazioni della scelta, gli adattamenti aziendali, la gestione tecnica, quella economica sino alla commercializzazione dei prodotti.

L'indagine aziendale è stata condotta tramite un apposito questionario in lingua tedesca, prendendo in esame 11 allevamenti bovini biologici, un terzo degli allevamenti biologici dell'Alto Adige e la metà di quelli che hanno superato la fase di conversione nel 1998.

Rappresenta un campione significativo della zootecnia biologica locale, in grado di offrire un quadro realistico del nuovo modo di produrre e di fornire delle indicazioni utili sulle reali prospettive di sviluppo del nuovo comparto.

Trattasi di aziende a conduzione familiare, come di regola nella zona, caratterizzate dalla presenza di bestiame bovino sia da latte che da carne. In alcune aziende accanto ai bovini, come vedremo di seguito, si accompagnano anche altre specie animali.

Le aziende hanno offerto la massima collaborazione all'indagine, dimostrando una notevole apertura verso il mondo esterno, grazie anche ad un livello culturale abbastanza elevato da parte degli imprenditori, nonostante le piccole dimensioni aziendali e la collocazione in aree svantaggiate di montagna.

Le informazioni raccolte hanno spaziato in tutte le direzioni ed in particolare riguardano:

- aspetti sociali;
- caratteristiche strutturali;
- riparto della produzione;
- distribuzione dei costi;

- redditività dei processi produttivi;
- trasformazione e commercializzazione dei prodotti.

I dati raccolti sono stati quindi inseriti in un foglio elettronico per il successivo trattamento ed elaborazione con output per singola azienda e di gruppo.

Si è pertanto giunti alla redazione del bilancio economico delle aziende e alla formazione degli indici più significativi sulla gestione aziendale. I risultati ci forniscono uno spaccato dell'agrobiologia locale che presenta delle peculiarità rispetto ad altre aree del Paese.

La recente espansione della produzione biologica sta portando fuori dalla posizione di nicchia il comparto con ricadute sulle prospettive future delle aziende ed anche del territorio, rivitalizzando alcune aree che erano prossime all'abbandono.

Le produzioni biologiche sono infatti un'occasione di richiamo dei consumatori, contribuendo all'allargamento della domanda interna, che costituisce il vero motore dello sviluppo.

## 5.2. Caratteristiche socio-strutturali delle aziende

La conversione al metodo biologico di produzione è stata fortemente motivata da scelte culturali e solo in secondo ordine si sono poste quelle economiche più vantaggiose, grazie al prezzo più alto che i consumatori sono disposti a pagare per i prodotti biologici e ai contributi pubblici.

Non è estraneo a queste scelte il titolo di studio abbastanza elevato che caratterizza gli imprenditori. Infatti, oltre la metà degli intervistati ha acquisito un titolo di scuola media superiore, o scuola professionale agricola, oppure un titolo universitario.

La limitata dimensione aziendale e il diffuso autoconsumo sono funzionali ad un'azienda di tipo part-time. Un terzo dei titolari svolge infatti anche un'altra attività in contemporanea a quella agricola, senza contare la diffusa presenza di familiari che lavorano in altri settori produttivi e che collaborano in forma saltuaria ai lavori aziendali.

In pratica le aziende indagate hanno fatto la scelta del metodo biologico principalmente per soddisfare le esigenze maturate in famiglia e in un secondo tempo come scelta funzionale all'integrazione del reddito, grazie alla vendita diretta di prodotti biologici con un elevato riconoscimento di prezzo e ai contributi pubblici.

Ciò ha contribuito ad elevare il budget di queste piccole aziende che non potendosi allargare in termini di superficie, hanno trovato una soluzione nel realizzare valori aggiunti più elevati con la trasformazione dei prodotti e la vendita diretta, che ha consentito di ampliare il volume d'affari. In pratica alla carenza di dimensione fisica si è ovviato con un allargamento della dimensione economica.

La ridotta dimensione delle aziende tende a valorizzare l'autoconsumo dei prodotti aziendali e la vendita diretta; infatti ben 8 aziende pongono alla base della scelta biologica la qualità, la salubrità e la genuinità dei prodotti nonché le condizioni migliori di vita e di alimentazione per la famiglia che può così conoscere l'origine dei prodotti. E' implicita la preoccupazione per la salute dei consumatori ma anche per il benessere degli animali allevati.

Risulta carente invece il ricorso all'assistenza tecnica esterna, che è legata principalmente alle Associazioni biologiche. Quando esiste, riguarda le produzioni vegetali e non quelle zootecniche.

Le aziende non sono sempre in grado di assicurare lavoro a tutta la famiglia anche se in certi periodi dell'anno i familiari collaborano nei lavori stagionali. E' questa elasticità della famiglia che consente di fare fronte alle impennate stagionali del fabbisogno di lavoro, che rimane pressochè costante per l'intero anno nelle produzioni zootecniche, mentre richiede molto impegno in un breve periodo di tempo per la raccolta dei prodotti (fieno, frutta, uva, piccoli frutti ecc.). L'impiego del lavoro familiare tende ad escludere il ricorso alla manodopera avventizia.

La presenza di più attività, in particolare la trasformazione in azienda dei prodotti, l'agriturismo, le prestazioni di macchine aziendali verso l'esterno ecc. sono funzionali a soddisfare l'occupazione aziendale quando al lavoro dell'imprenditore si aggiunge quello di altri familiari. Rimane comunque un'area di sottooccupazione della famiglia che viene coperta con il part-time.

Le aziende del campione hanno tutte dei terreni in montagna finalizzati alla produzione di foraggi e al pascolo. I rimanenti terreni del fondovalle sono investiti a colture intensive (frutteti e vigneti). Mediamente le aziende biologiche sono collocate sui 1.000 metri di quota, condizione diffusa in Alto Adige anche per le aziende convenzionali.

L'intera superficie delle aziende è condotta con metodo biologico di produzione, un'azienda dichiara di adottare il più impegnativo metodo biodinamico.

L'interesse per le produzioni ecocompatibili è assai radicato in Alto Adige. Lo testimoniano anche le aziende oggetto dell'indagine la cui prima conversione al metodo biologico risale al 1977, altre aziende hanno aderito nel 1983 (3), le rimanenti adesioni (7) sono successive all'emanazione del regolamento comunitario sul biologico e al relativo recepimento da parte della Provincia Autonoma di Bolzano.

Gli organismi di controllo del metodo biologico di produzione delle aziende sono il BIOZERT (6) e l'AIAB (5); tutte le aziende indagate hanno presentato la domanda per i contributi previsti per le produzioni biologiche.

Tab. 3 - Alcuni dati strutturali

Descrizione	Unità di misura	Media per azienda
- Colture vendibili	ha	1,9
	%	21,4
- Colture foraggere	ha	7,0
	%	78,6
SAU	ha	9,0
	%	100,0
- Bosco	ha	3,8
- ULU fam.	n	1,4
- Capo bovini	n	14,2
- Di cui vacche	n	4,7
- UGB	n	9,8

Per quanto riguarda le caratteristiche strutturali delle aziende, emerge la ristrettezza della dimensione aziendale che è di soli 9 ettari SAU. Destinata al foraggio è il 78,6% della superficie, e ciò evidenzia l'orientamento funzionale alla trasformazione zootecnica, l'unica in grado di valorizzare la povertà delle risorse foraggere. In pratica lo spazio riservato alle coltivazioni biologiche vendibili è limitato (21,4%). D'altra parte oltre certe altitudini la foraggicoltura e l'allevamento del bestiame rimangono le uniche alternative. Solo nel fondovalle, per la presenza di condizioni ambientali più favorevoli, le possibilità di coltivazione si allargano all'ortofrutta, alla viticoltura e ai piccoli frutti fino a costituire le principali fonti di reddito. Anche la presenza del bosco contribuisce ad integrare l'occupazione in certi periodi dell'anno e a dare origine a produzioni complementari.

Nonostante le ridotte dimensioni (9 ettari SAU) la presenza di addetti per azienda raggiunge le 1,4 ULU con un rapporto di 6,3 ettari SAU per unità lavoratrice a tempo pieno. Il ricorso ai salariati avventizi è limitato ad una sola azienda per la raccolta della frutta in carenza di manodopera familiare.

Meraviglia come in aree difficili possa esistere una intensità di occupazione in agricoltura così elevata. Questa è comunque la condizione migliore per assicurare la presenza umana sul territorio e la salvaguardia dell'ambiente. Il metodo biologico di produzione, con la presenza della zootecnia, fornisce un ulteriore contributo al raggiungimento di questi obiettivi.

La maggior parte delle aziende alleva bovine da latte, in realtà a queste si accompagnano sempre anche dei bovini da carne che, aggiunti alle aziende con soli bovini da ingrasso, porta in posizione minoritaria il numero delle lattifere. Infatti ogni azienda ha in media 14 capi bovini, di cui 5 vacche da latte. Tradotti in capi grossi si tratta di 9,8 UGB

in media per azienda, con un carico di 6,9 UGB per addetto e di 1,4 UGB per ettaro a foraggiare.

Nel calcolo non abbiamo incluse le altre specie allevate. Si tratta principalmente di suini, ovicaprini e avicoli. Questi animali vengono allevati principalmente per la famiglia e la vendita diretta al consumatore.

### 5.3 Le produzioni

Le aziende riescono a realizzare in media oltre 71 milioni di lire di produzione, costituita in prevalenza da prodotti non trasformati: carne, latte, frutta, ortaggi, uova ecc. Le produzioni animali sono quelle prevalenti con il 42,9% della Plv, seguite da quelle vegetali (30,9). In alcune aziende la produzione vegetale supera largamente quella animale, trattasi in particolare di frutta biologica coltivata nel fondovalle.

La differenziazione dell'attività produttiva dipende molto dall'altitudine a cui si trova l'azienda e dalla possibilità di trovare nelle vicinanze un mercato dei prodotti biologici, in grado di assicurare una continuità di vendita dei prodotti ad un prezzo remunerativo.

Tab. 4 - Produzione lorda vendibile

Tipo di produzione	Media per azienda	
	Valore (000 lire)	%
- Vegetale	22.109	30,9
- Animale	30.640	42,9
- Vegetale trasformata	4.027	5,6
- Animale trasformata	5.209	7,3
- Servizi prestati	3.182	4,5
- Contributi pubblici	6.299	8,8
TOTALE	71.466	100,0

E' limitato al 12,9% l'apporto dei prodotti trasformati, sia vegetali (conserve, succhi ecc.) che animali (formaggi, burro, insaccati, speck ecc.). Nella prospettiva di un loro ampliamento si dovranno fare i conti con le nuove disposizioni igienico-sanitarie, con la messa a norma dei locali e delle attrezzature.

Si presume che queste norme saranno un vincolo all'auspicata espansione delle trasformazioni in azienda; è più probabile infatti che portino ad una futura contrazione.

Le prestazioni di servizi contribuiscono a rimpinguare del 4,5% la produzione, a queste si aggiungono i contributi pubblici (8,8%) che si riferiscono ai vari interventi previsti con il recepimento del regolamento Ce 2078/92.

Le misure attivate dalla Provincia Autonoma di Bolzano sono 9; la numero 6 riguarda le produzioni biologiche. In realtà le aziende possono concorrere a più misure, cumulando i relativi contributi.

Tenuto conto della ristrettezza delle aziende la riscossione di oltre 6 milioni di lire di contributi pubblici porta ad una incidenza media di 700.000 lire per ettaro SAU. Ciò nonostante le aziende non si adagiano sui proventi dei contributi perchè riescono a realizzare, si ripete, oltre 71 milioni di lire di entrate.

I risultati produttivi confermano che le motivazioni della scelta biologica sono principalmente di tipo culturale e salutistica, mentre la motivazione del contributo pubblico viene in secondo piano. Ciò non toglie che i risultati economici delle aziende biologiche non siano consistenti, trattasi di quasi 8 milioni di lire di ricavi per ettaro SAU e 50 per addetto,

anche se ci troviamo di fronte a delle piccole aziende collocate in zone di montagna.

Nelle aziende biologiche si torna alla riscoperta della complessità dell'indirizzo produttivo, della trasformazione e della valorizzazione dei prodotti all'interno dell'azienda. Non stupisce quindi la pluralità delle colture praticate (nonostante l'ambiente difficile), delle specie allevate, delle trasformazioni di prodotti e della presenza dei servizi forniti dalle aziende.

Molte produzioni sono funzionali alla vendita diretta al consumatore e all'autoconsumo familiare, per soddisfare un'ampia gamma di bisogni. Le trasformazioni portano ad elevare il valore aggiunto dei prodotti e ad ampliare il volume d'affari per ovviare alla ristrettezza della dimensione aziendale, a cui vanno aggiunte le prestazioni di servizi.

Se alle colture praticate, agli allevamenti presenti, alle trasformazioni dei prodotti e alla prestazione dei servizi aggiungiamo una serie di contributi pubblici si creano le condizioni propizie affinché delle piccole aziende, anche in zone svantaggiate, possano raggiungere un budget sufficiente che dia loro motivo di esistere e consentire la permanenza delle attività agricole e di addetti sul territorio.

In caso di particolari difficoltà esiste sempre la possibilità del part-time che è presente in diverse aziende.

Tab. 5 - Le attività aziendali

ATTIVITA'	Aziende n	ATTIVITA'	Aziende n
COLTURE VENDIBILI		ALLEVAMENTI	
- Castagno	1	- Avicoli	8
- Erbe aromatiche	1	- Bovini da carne	5
- Farro	1	- Bovini da latte	6
- Frumento tenero	2	- Caprini	1
- Frutteto (mele)	2	- Ovini	2
- Ortaggi	5	- Equini	2
- Patate	5	- Suini	8
- Piccoli frutti	3	PRODOTTI TRASFOR.	
- Vigneto	3	- Burro	3
COLTURE FORAGGERE		- Carne	1
- Pascolo	10	- Conserve vegetali	2
- Prato permanente	11	- Formaggio bovino	3
- Prato avvicendato	2	- Salumi	2
ATTIVITA' FORESTALE		- Uova	5
- Bosco	2	- Vino	2
		SERVIZI	
		- Agriturismo	2
		- Contoterzismo	1

La presenza dell'allevamento bovino è comune a tutte le aziende indagate, ad esso si accompagnano spesso quello suino e avicolo. Gli equini sono funzionali all'agriturismo ed alle attività equestri della famiglia.

La valorizzazione di una parte del latte avviene tramite la trasformazione in formaggio e burro ed in parte con la vendita diretta al consumo, il rimanente viene conferito al caseificio senza la differenziazione di prodotto biologico.

E' interessante notare la frequente presenza dei suini e degli avicoli che danno luogo alla vendita diretta di carne, di salumi (speck) e di uova, per ottenere una crescita del volume d'affari con un aumento dell'occupazione, senza la necessità di un ampliamento della superficie aziendale.

#### 5.4. Costi e reddito aziendale

I costi espliciti sostenuti dalle aziende corrispondono sostanzialmente alle spese di reintegrazione che incidono solamente per il 23% sulla Plv. I compensi aziendali infatti (affitti, salari, interessi) sono quasi inesistenti, a conferma del fatto che ci troviamo di fronte ad aziende familiari in proprietà.

In pratica il reddito netto corrisponde al prodotto netto e tutti i compensi ai fattori vanno all'imprenditore proprietario-coltivatore.

L'analisi dei costi mette in evidenza la ridotta dipendenza delle aziende dai mezzi produttivi del mercato e la valorizzazione delle risorse interne.

Le spese variabili sono quelle che rivestono maggiore peso e rappresentano il 40% di tutti i costi. Si riferiscono in particolare ai materiali di consumo (sementi, concimi, mangimi, foraggi, spese energetiche e varie). Le aziende tendono a risparmiare sugli acquisti facendo leva sul reimpiego dei prodotti aziendali.

La spesa principale riguarda l'acquisto di alimenti per il bestiame, segue quella per i carburanti, veramente modeste sono le spese per sementi e concimi.

Tab. 6 - Ripartizione dei costi aziendali

Descrizione	Media per azienda	
	Valore (000 lire)	%
- Spese varie	6.857	40,0
- Quote	5.964	34,9
- Servizi extra-aziendali	3.941	23,0
- Compensi aziendali	364	2,1
TOTALE	17.126	100,0

L'alimentazione del bestiame è strettamente legata ai foraggi prodotti in azienda e ottenuti con metodo biologico di produzione, nonché dai pascoli di alta quota.

L'impiego dei MCI non è generalizzato, infatti in alcuni allevamenti non ne viene fatto uso, una parte dei mangimi deriva dalla preparazione aziendale e una parte viene acquistata sul mercato da mangimifici certificati, presenti uno a Merano e l'altro a Vandoies in Val Pusteria. I mangimi biologici vengono usati principalmente per le bovine in lattazione e per i suini.

E' in ogni caso diffuso per i bovini il pascolo estivo in malga, che assicura le migliori condizioni di salubrità per gli animali. Nei restanti periodi dell'anno gli animali vengono stabulati, per le condizioni climatiche avverse tipiche delle zone montane.

Tra le razze allevate prevale la Grigia Alpina e la Bruna Alpina, accompagnate da altre razze quali la Simmenthal, la Pinzgauer, la Frisona e la Aberdeen Angus per la linea vacca-vitello e relativi incroci per la produzione di carne.

La stabulazione fissa interessa 7 aziende, mentre 4 sono passate a quella libera, soprattutto per gli animali da carne.

Le modalità di allevamento e il tipo di alimentazione degli animali consentono di contenere le spese sanitarie al minimo indispensabile. Solo in tre casi si ricorre a farmaci allopatrici mentre è generalizzata la pratica omeopatica, a testimonianza della forte propensione del produttore ad ottenere alimenti salubri, che rappresentano anche una quota importante dei consumi della famiglia.

Gli allevatori sono convinti che il cambiamento dall'agricoltura convenzionale a quella biologica abbia influito positivamente sulla salute degli animali, che raramente necessitano di terapie veterinarie.

In ogni caso la medicina alternativa, con l'uso dell'omeopatia e della fitoterapia, è abbastanza conosciuta dagli allevatori e praticata dai veterinari in Alto Adige. La diffusione della medicina alternativa nelle vicine Austria e Germania può avere avuto un influsso importante.

Seguono per importanza le spese fisse rappresentate dalle quote (ammortamento, manutenzione e assicurazione) che incidono per il 34,9%. In realtà gli investimenti fissi delle aziende sono limitati e buona parte sono già stati ammortizzati. Sono comunque indispensabili per migliorare le condizioni di lavoro degli agricoltori, anche se il lavoro manuale riveste ancora notevole importanza in aziende di piccola dimensione e in aree montane.

Il peso dei servizi extra-aziendali (23,0%) è riconducibile principalmente ai contributi INPS per gli oneri sociali degli addetti familiari (ex CAU). Sono rapportati alle unità lavorative iscritte, tenuto conto che nelle aree montane vigono per altro delle contribuzioni agevolate.

In complesso i costi aziendali ammontano mediamente a 17 milioni di lire per azienda, a fronte di una produzione di 71. Pertanto il reddito netto che ne risulta è di 54 milioni di lire, il che non è poco per aziende di limitata estensione (9 ettari) e in zona montana.

Il reddito medio per ettaro SAU è abbastanza elevato con 6 milioni di lire; rapportato alle unità lavoratrici familiari si raggiungono i 38 milioni di lire. Se consideriamo che la remunerazione ai capitali agrario e fondiario è di limitata entità, per i bassi investimenti e i ridotti saggi di interesse, rimane una buona remunerazione del lavoro familiare.

A questo proposito basti ricordare che in una ricerca del 1995 (Salghetti, 1997) su aziende biologiche dell'Italia Settentrionale era stato accertato un reddito netto di 3,6 milioni di lire per ettaro SAU e di 54,8 per unità lavoratrice familiare, ma con una dimensione tre volte superiore, comprendente imprese lavoratrici di pianura e di montagna.

Pertanto possiamo concludere dicendo che i risultati economici delle aziende biologiche con bovini dell'Alto Adige sono molto soddisfacenti, tenuto conto della ridotta dimensione fisica delle aziende, della presenza di mandrie piuttosto piccole, in condizioni ambientali difficili, tipiche delle zone montane.

Concorrono alla realizzazione di questi risultati positivi tutta una serie di condizioni che riescono a contrastare gli handicaps lamentati:

- forti motivazioni ideali e culturali;
- attaccamento alla terra e all'ambiente rurale;
- coesione e collaborazione del nucleo familiare;
- diversificazione delle produzioni per cogliere tutte le opportunità;
- ridotta dipendenza dal mercato dei mezzi produttivi;
- valorizzazione delle risorse aziendali;
- commercializzazione diretta della produzione;

- integrazione di reddito extraagricolo;

- ruolo sociale riconosciuto all'agricoltore dalla popolazione locale.

La zootecnia biologica in Alto Adige può quindi fornire un importante contributo all'economia del territorio, alla salvaguardia dell'ambiente, alla protezione del suolo e al mantenimento in loco di popolazioni in grado di trovare risposte adeguate alle loro aspettative.

### 5.5 Organizzazione produttiva e commerciale

La vendita dei prodotti biologici avviene principalmente in azienda, a cui fa seguito la vendita tramite i dettaglianti. Solo in un caso si passa tramite i grossisti e all'Associazione biologica, mentre è marginale la quota esportata (si tratta di mele destinate alla Germania e alla Gran Bretagna).

Sta prendendo piede anche la vendita diretta sui mercatini zonali, come già avviene in altri luoghi. Un mercatino esclusivamente biologico è presente a Bressanone con cadenza quindicinale. Le mele invece vengono vendute direttamente all'Associazione di appartenenza che le distribuisce alle cooperative.

In tutte le aziende è presente l'autoconsumo dei prodotti con quote che raggiungono il 10% della produzione in diversi casi, in coerenza con la motivazione principale nella scelta del metodo biologico di produzione che è quella della qualità e salubrità dei prodotti agricoli destinati alla famiglia.

L'incidenza degli autoconsumi familiari è in gran parte legata alle ridotte dimensioni aziendali ed in parte ai prelievi di parenti più o meno lontani ai quali viene corrisposto in natura il compenso per la collaborazione prestata nei periodi della raccolta dei prodotti. Ed ecco allora che il nucleo familiare d'origine riesce ad approvvigionare di frutta, verdura, salumi, vino, carne ecc. più nuclei familiari senza un corrispettivo in denaro.

E' molto bello e di elevato significato sociale e di valore morale e culturale vedere come le piccole aziende, in particolare quelle biologiche che assicurano prodotti sani e genuini, siano ancora un punto di riferimento per tante persone costrette ad abbandonare la terra per esigenze di lavoro ma che ambiscono a mantenere un legame continuativo con il luogo d'origine.

E' in questa ricerca dell'ambiente naturale e delle proprie origini la chiave di lettura della continuità delle piccole aziende che non sono lasciate a se stesse, grazie proprio al valore sociale che viene riconosciuto all'azienda-famiglia.

La vendita dei prodotti in azienda consente di realizzare un prezzo a volte più che doppio rispetto a quello corrente sul mercato. Si sono infatti riscontrati in alcuni casi dei prezzi molto interessanti, come la vendita di latte alimentare a 1.700 lire il litro, le uova a 500 lire l'una, il frumento a 2.000 il chilogrammo, le patate a 1.500 lire il chilogrammo ecc. Questa non è certamente la regola, ma nelle piccole nicchie di mercato è un'opportunità che i produttori biologici possono cogliere.

E' interessante notare come la famiglia contadina colga l'occasione nella vendita diretta dei prodotti biologici per instaurare anche nuovi rapporti sociali e di amicizia con i clienti abituali, che condividono la scelta dell'agrobiologia, dando soddisfazioni economiche e morali all'imprenditore e come i prodotti biologici siano di stimolo a proseguire l'attività.

La clientela affezionata rappresenta un capitale di avviamento per l'azienda e consente di ottenere un canale commerciale di "passaparola" a costo zero. Per tale motivo il produttore biologico cerca di adattare i prezzi alla disponibilità di acquisto dei clienti abituali (prezzo opportunità) rifuggendo da proposte allettanti ma episodiche di vendita dei prodotti biologici ai commercianti.

Le modalità di vendita dei prodotti e il volume limitato della produzione rendono poco frequenti le forme programmate di commercializzazione. Si sta comunque avviando un proficuo rapporto di collaborazione con le macellerie locali per l'approvvigionamento di carne biologica, a Terzano infatti è stata avviata la commercializzazione di carne con marchio biologico.

Pertanto i marchi di vendita e l'attività pubblicitaria per i prodotti biologici da parte dei produttori sono poco diffusi (cartelli stradali, depliant), a parte quelli delle Associazioni di appartenenza (BIOLAND, AIAB, UCA).

Nella vendita diretta i rapporti con il consumatore sono improntati sulla reciproca fiducia e l'informazione del consumatore avviene con il "passaparola", con risparmio sui costi di

marketing e quindi con un contenimento del prezzo dei prodotti offerti al consumatore. E' la strategia vincente per i piccoli produttori che riescono a richiamare in loco un numero di consumatori consistente per collocare i prodotti biologici. Oltre certe dimensioni questa strategia deve lasciare il passo a forme di integrazione mercantili che assicurino la collocazione dell'intera produzione per non perdere i vantaggi della differenziazione tra prodotto biologico e convenzionale. In realtà parte della produzione biologica segue ancora il canale commerciale dei prodotti convenzionali, soprattutto per quanto riguarda il latte e la carne.

## 6. Alcune conclusioni

L'agrobiologia in Italia è di recente introduzione in base alle normative del regolamento Ce 2092/91 ed ha avuto un rapido sviluppo grazie agli incentivi finanziari previsti dal regolamento Ce 2078/92.

In un primo tempo hanno trovato diffusione le produzioni biologiche di origine vegetale, successivamente hanno assunto importanza anche quelle di origine animale. Il ritardo è imputabile in parte alla maggiore complessità della conversione degli allevamenti e in parte alla tardiva introduzione del regolamento specifico per le produzioni animali. Infatti il regolamento Ce 1804/99 relativo al metodo biologico per le produzioni animali porta la data del 19 luglio 1999 ed è stato pubblicato sulla G.U. della Ce il 24 agosto 1999.

In Alto Adige l'agrobiologia ha interessato 166 aziende nel corso del 1998, di cui 32 con produzioni zootecniche (19%). I ritmi di espansione sono assai elevati, visto che nel 1999 hanno già fatto domanda di adesione altre 40 aziende.

In realtà le produzioni biologiche di origine animale sono inferiori a quelle desumibili dal numero degli allevamenti, perchè buona parte del latte e della carne non viene ancora commercializzata con marchio biologico. Infatti prevale la commercializzazione dei prodotti biologici di fondovalle (frutta, ortaggi, uva), mentre la zootecnia è pressochè esclusiva della montagna e si integra con l'agricoltura di fondovalle, dove l'allevamento è di supporto alle produzioni vegetali biologiche assicurando la fertilizzazione organica del terreno.

In alcune aziende è sviluppata la trasformazione dei prodotti vegetali (conservate, succhi ecc.) e animali (formaggio, burro, salumi ecc.) che permette di elevare sensibilmente il valore aggiunto dei prodotti e il reddito netto, pur disponendo di limitate superfici aziendali.

La vendita dei prodotti biologici consente all'imprenditore di realizzare riconoscimenti di prezzo interessanti (10-20%) e a volte doppi rispetto ai prodotti convenzionali. Il canale di commercializzazione preferito è la vendita diretta e quella ai dettaglianti.

L'indagine condotta su 11 aziende biologiche con allevamento bovino ha messo in evidenza la vitalità dell'imprenditore biologico in Alto Adige: a fronte di limitate risorse ed in un ambiente difficile esso è in grado di dare occupazione e reddito soddisfacente agli addetti familiari.

Grazie alla valorizzazione biologica dei prodotti, alla loro trasformazione, alle prestazioni di servizi e ai contributi pubblici l'imprenditore riesce a realizzare una produttività media di quasi 8 milioni di lire per ettaro SAU e di ottenere un reddito netto per unità lavoratrice familiare di 38 milioni di lire, il che non è poco. Se a questo aggiungiamo gli apporti di reddito del lavoro part-time, abbastanza diffuso in loco, si creano le condizioni favorevoli per la permanenza in azienda degli addetti e la continuazione dell'attività agricola.

La scelta dell'agricoltura ecocompatibile in Alto Adige è fortemente motivata da scelte culturali e dalla prospettiva di ottenere alimenti di qualità, sani e genuini ai quali si approvvigiona anche il nucleo familiare.

La valorizzazione dei prodotti biologici è prevalentemente legata a nicchie di mercato, mentre risulta carente l'organizzazione mercantile, anche se alcune Associazioni biologiche cercano di supplire con l'aggregazione dell'offerta dei propri aderenti.

In conclusione nelle aree di montagna, come in Alto Adige, la scelta dell'agricoltura ecocompatibile può rappresentare una delle soluzioni più interessanti, non necessariamente l'unica, per permettere agli addetti rimasti di ottenere un reddito soddisfacente e assicurare la presenza umana sul territorio quale presidio alla salvaguardia degli equilibri ambientali a favore di tutta la comunità.

Parole chiave: Alto Adige, zootecnia biologica, economia.

Key words: : Alto Adige, organic zootechnology, economics

Schlüsselworte: Südtirol, biologische Viehzucht, Wirtschaft.

RIASSUNTO - L'agricoltura biologica è in rapida diffusione grazie alla maggiore sensibilità del consumatore verso i prodotti alimentari più salubri e di qualità per i quali è disposto a corrispondere prezzi più elevati. L'Unione Europea ha riconosciuto la validità ambientale di questo nuovo modo di produrre predisponendo una regolamentazione specifica di sostegno con finanziamenti pubblici per un'agricoltura ecocompatibile.

In Alto Adige si è sempre avuto un occhio di riguardo per un'agricoltura rispettosa dell'ambiente. Con l'attuazione dei regolamenti comunitari sull'agricoltura ecocompatibile si è voluto accentuare l'intervento preferibilmente nelle zone di montagna, quelle più a rischio di degrado ambientale e di abbandono del territorio. La produzione di foraggi e l'allevamento del bestiame sono le sole attività praticabili in aree di montagna. Una possibilità di valorizzare i prodotti zootecnici viene offerta dal metodo biologico di produzione. L'indagine su un gruppo di allevamenti bovini con produzione biologica in Alto Adige ha messo in evidenza la possibilità di elevare il reddito delle aziende, nonostante la ristrettezza della maglia aziendale. Ciò è possibile grazie al maggior riconoscimento di prezzo sui prodotti e agli incentivi finanziari pubblici di sostegno all'agricoltura ecocompatibile.

Ne viene avvantaggiata l'agricoltura di montagna con la permanenza di addetti sul territorio e la salvaguardia dell'ambiente, con vantaggi per tutta la collettività.

SUMMARY - *Some economic aspects of organic zootechnology in Alto Adige.*

Organic agriculture is spreading rapidly because consumers are better informed about food products that are more wholesome and of better quality, but which also cost more. The European Union has recognized the environmental value of this new kind of production and has set out specific regulations with public financial aid in support of environmentally friendly agriculture.

The people of Alto Adige have always had an interest in farming methods which respect the environment. With the activating of European Community regulations concerning environmentally friendly agriculture, emphasis has been placed on the best type of intervention to be applied in mountain regions, where there is the greatest risk of environmental degradation and abandoning of the land.

The production of fodder and the breeding of livestock are the only activities that can be practised in the mountains. The possibility of exploiting zootechnological products is offered by organic production methods.

The study of a group of organic production cattle farms in Alto Adige has highlighted the possibility of increasing the profits of farms, despite their small size. This is possible because of the high price of the product and the public financial support given to environmentally friendly farming.

Policies have been designed to favour mountain farming with workers remaining in the area and respect being shown for the environment, with advantages for all involved.

ZUSAMMENFASSUNG - *Einige ökonomischen Aspekte der biologischen Viehzucht in Südtirol.*

Die biologische Landwirtschaft erfährt dank der steigenden Nachfrage des Verbrauchers nach gesünderen Qualitätslebensmitteln einen großen Aufschwung. Der Verbraucher ist auch bereit, für diese Produkte einen höheren Preis zu zahlen. Die Europäische Union hat den Nutzen dieser neuen Landwirtschaft für die Umwelt anerkannt und hat spezielle Richtlinien und Gesetze zur Förderung und Unterstützung mit öffentlichen Mitteln für eine umweltfreundliche Landwirtschaft verabschiedet.

In Südtirol wurde der umweltverträglichen Landwirtschaft schon immer große Bedeutung beigemessen. Mit der Umsetzung der EU-Richtlinien bezüglich der umweltverträglichen Landwirtschaft sollten insbesondere die bergigen Gebiete gefördert werden, da die Landwirte sich immer mehr aus diesen Gebieten zurückziehen und diese Gebiete somit besonders stark umweltbedingten geologischen Folgeschäden ausgesetzt sind.

Die Futtermittelproduktion und die Viehzucht sind die einzigen Tätigkeiten, die im bergigen Gebiet Südtirols ausgeübt werden können. Die biologischen Produktionsverfahren stellen eine Möglichkeit dar, den Absatz der Landwirtschaftsprodukte zu fördern.

Bei einer Untersuchung von biologischen Rinderzuchtbetrieben in Südtirol wurde festgestellt, daß das Einkommen dieser Betriebe durch die Anwendung biologischer Zuchtverfahren erhöht werden konnte, obwohl es sich um kleine Betriebe handelt. Dies ist dem höheren Verkaufspreis und der Förderung der umweltverträglichen Landwirtschaft mit öffentlichen Mitteln zuzuschreiben. Durch der Förderung der umweltverträglichen Landwirtschaft werden die Landwirte in die Lage versetzt, ihre Tätigkeit weiter ausüben zu können und sind nicht mehr gezwungen, ihren Boden aufzugeben, was im Endeffekt den Umweltschutz gewährleistet und somit der gesamten Gemeinschaft zu Gute kommt.

## Bibliografia

- 1) AA. VV. (1999). Tutto Bio '99 - Guida completa al biologico. Distilleria EcoEdi-toria, Forlì.
- 2) ACCADEMIA DEI GEORGOFILI (1989). Agricoltura biologica: il senso, la realtà, i problemi. Firenze.
- 3) ANSALONI F., SALGHETTI A. (1996). Latte biologico e derivati: l'organizzazione della filiera. Rivista di Economia Agro-alimentare, n.1, 147-169, SIEA.
- 4) BARTOLA A., POLLASTRI F., ZANOLI R. (1990). L'agricoltura biologica: produzione di qualità nel rispetto dell'ambiente. Il caso dell'Emilia-Romagna. Rivista di Economia Agraria, n. 3, INEA- Il Mulino.
- 5) BERNI P., FABBRIS (1996). L'agricoltura biologica nel Veneto: aspetti economico-sociali e comportamenti d'impresa. (a cura di), Istituto di Economia e Politica Agraria, Università di Verona. Pubblicazione RAISA-CNR, n. 2423, Arcadia Ed., Modena.
- 6) CESARO L., ROSSETTO L. (1999). Applicazione del Regolamento 2078/92 nella Provincia di Bolzano. Valutazione Socioeconomica e strutturale (a cura di). INEA, Osservatorio di Economia Agraria per il Veneto e Trentino Alto Adige, Padova.
- 7) CHIRONI G. (1995). Filiere atte allo sviluppo di aree collinari e montane: il caso dell'agricoltura biologica. (a cura di), Dip. di Economia, Ingegneria e Tecnologie Agrarie, Settore Economia, Università degli Studi di Palermo. Pubblicazione RAISA-CNR, n. 2218.
- 8) DEL FABRO A. (1990). L'agricoltura biologica in Italia: le strutture produttive. In "Agricoltura e Innovazione", n. 12-13.
- 9) FOTI S., STURIALE C. (1993). Aspetti e problemi economici e normativi dell'agricoltura biologica: quali prospettive? Rivista di Economia Agraria, n. 4, INEA-II Mulino.
- 10) GREGORI M., PRESTAMBURGO M. (1996). Produzioni biologiche ed adattamenti d'impresa. F. Angeli, Milano.
- 11) KAISERMANN F. (1994). Zootecnica biologica in ambienti montani. In "Bio-agricoltura", n. 31.
- 12) LAMPKIN N.H. (1994). Organic farming: Sustainable Agriculture in Practice. In "The Economics of Organic Farming". (Edited by Lampkin N. H. - Padel S.), CAB International, Wallingford, UK.
- 13) LONGIARDI A. (1993). Disciplina del metodo di produzione biologico e tutela del consumatore. In "L'Informatore Agrario", n. 38.

- 14) MONTANARI E. (1995). Il cammino dell'agricoltura biologica in Italia. In Atti del Convegno "Stato attuale e prospettive delle produzioni alimentari biologiche in Italia". In "Parma Economica", n. 4. C.C.I.A.A., Parma.
- 15) PROVINCIA AUTONOMA DI BOLZANO (1998). Relazione agraria e forestale.
- 16) ROMANO M. (1989). Agricoltura biologica e convenzionale a confronto. In "Demetra", n. 11.
- 17) SALGHETTI A. (1995). Le produzioni biologiche di origine animale. In "Parma Economica", n. 4. C.C.I.A.A., Parma. Pubblicazione RAISA-CNR, n. 2420.
- 18) SALGHETTI A. (1997). Produzioni biologiche e convenzionali negli allevamenti bovini. Università degli Studi di Parma, Istituto di Economia rurale e zoeconomia. Pubblicazione RAISA-CNR, n. 3010.
- 19) SALGHETTI A. (1998). Agricoltura biologica e territorio. In Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Vol.XVII, Parma, 145-163.
- 20) SANSAVINI S., WOLLESEN J. (1992). Le potenzialità ed i limiti dell'agricoltura biologica. In "Terra e Vita", n. 9.
- 21) SANTUCCI F.M. (1994). Confronto tra aziende biologiche e convenzionali in Umbria. In "Bioagricoltura", n. 31.

# ALCUNI ASPETTI ECONOMICI DELLA ZOOTECNIA BIOLOGICA IN ALTO ADIGE<sup>1</sup>

Andrea Salghetti<sup>2</sup>, Nicolina Ruggiero<sup>3</sup>

(1) Il lavoro è frutto della collaborazione degli autori. In particolare Andrea Salghetti ha curato i paragrafi 1,2 e 3 ; Nicolina Ruggiero i paragrafi 4 e 5.

(2) *Istituto di Economia Rurale e Zooeconomia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.*

(3) *Servizio Veterinario, Azienda Speciale Unità Sanitaria Locale Est, Provincia Autonoma di Bolzano.*

## 1. Introduzione

Di fronte al terzo millennio i produttori agricoli debbono sostenere nuove sfide legate alla concorrenza comunitaria e alla globalizzazione dei mercati. Nel nostro Paese il settore primario è ancora carente nella organizzazione mercantile, mentre non ha nulla da invidiare ad altri Paesi per quanto concerne le capacità tecniche dei produttori.

In particolare negli ultimi decenni la nostra zootecnia ha fatto grandi passi in avanti dimostrando di non essere da meno degli altri paesi dell'Unione Europea sul piano tecnologico e produttivo, pur attraversando alcune difficoltà organizzative.

Il comparto zootecnico ha subito un'intensa industrializzazione col verificarsi di un'elevata specializzazione ed intensificazione produttiva con forte impiego di pesticidi, concimi chimici, mangimi concentrati integrati e farmaci, introdotti non solo per la terapia delle malattie ma anche per la profilassi e la metafilassi.

Attraverso le economie di scala, che si sono fatte più diffuse, si è allargato il budget delle imprese ed è aumentato il reddito. A caratterizzare la dimensione dell'impresa non è più la dimensione fisica delle aziende, bensì il volume d'affari, con produzioni che si possono realizzare anche nelle aziende senza terra. Quindi, nel caso degli allevamenti bovini, è la mandria che rende meglio il concetto della dimensione aziendale.

L'ampliamento della mandria e l'aumento della produttività hanno accresciuto il fabbisogno di mezzi produttivi, con particolare riguardo per quelli di origine extra-aziendale.

Accanto a questa strategia produttiva di tipo convenzionale si sono fatti avanti negli ultimi anni nuovi modi di produrre, più rispettosi dell'ambiente e della salubrità dei prodotti, cosiddetti "alternativi", che hanno in un primo tempo coinvolto le produzioni vegetali e più recentemente quelle animali, in particolare dei bovini da latte.

Il metodo biologico può essere considerato uno di questi. In termini prettamente economici tali metodi si sono dimostrati efficaci nella differenziazione dei prodotti sul mercato, riscuotendo il consenso del consumatore, che si è reso disponibile al riconoscimento di un maggiore prezzo.

Più recentemente i ritmi di diffusione dell'agricoltura ecocompatibile in Italia si sono fatti accelerati, grazie agli incentivi finanziari pubblici previsti dai regolamenti comunitari.

Anche gli imprenditori agricoli dell'Alto Adige hanno avviato questo nuovo modo di produrre, sia pure con ritmi diversi rispetto ad altre aree del Paese e con tipologie aziendali peculiari della natura del territorio e delle condizioni economico-sociali.

Essendo ormai conclusa la fase pionieristica ed avviata a tutti gli effetti la filiera dei prodotti biologici, si è ritenuto di condurre un'indagine specifica sulla realtà dell'agricoltura biologica in Alto Adige, con particolare riguardo per il comparto zootecnico, cercando di individuare le caratteristiche organizzative, strutturali ed economiche di una realtà nuova ed in rapida diffusione.

## 2. Breve quadro normativo

La regolamentazione sulle produzioni biologiche ha interessato essenzialmente tre livelli istituzionali:

- comunitario;

- nazionale;

- regionale.

Tali normative sono state precedute e accompagnate dai regolamenti elaborati dagli Organismi di rappresentanza dei produttori biologici.

Un primo tentativo di intervento pubblico risale al 1985 con un regime di aiuti comunitari per l'agricoltura ecocompatibile. Il riferimento specifico all'agricoltura biologica viene fatto nel 1987 (regolamento Ce 1760/87) con la possibilità di finanziare iniziative per ottenere prodotti agrobiologici.

L'intervento comunitario non è limitato agli aspetti ecocompatibili dei prodotti biologici, quanto alle conseguenze che ne derivano: riduzione delle eccedenze produttive con minori spese per il loro smaltimento, salvaguardia degli equilibri ambientali e della salubrità delle produzioni.

Il principale intervento normativo sull'agricoltura biologica si deve al regolamento Ce 2092/91, relativo al metodo di produzione biologica di prodotti agricoli ed all'indicazione di tale metodo sui prodotti e le derrate alimentari. Il regolamento definisce anche le norme del sistema di controllo, che in Italia viene svolto da Enti privati con il coordinamento del Ministero dell'Agricoltura. Attualmente gli Organismi di controllo riconosciuti a livello nazionale sono nove: AIAB, Associazione Suolo e Salute, BIOAGRICOOOP, CCCP, CODEX, ECOCERT Italia, IMC, O.C.&I. e Bios. A questi va aggiunto il BIOZERT con sede ad Augsburg in Germania, riconosciuto solo nella Provincia di Bolzano.

La normativa comunitaria è stata preceduta da iniziative spontanee di Organizzazioni di promozione e tutela delle produzioni biologiche. Gli interventi degli Enti pubblici hanno invece fatto seguito alla regolamentazione comunitaria, salvo alcune eccezioni.

In realtà il regolamento Ce 2092/91 si occupava solamente delle produzioni biologiche vegetali e rimandava a tempi successivi (1995) la regolamentazione sulle produzioni animali.

Solamente nel 1999, forse per sollecitazione di eventi eccezionali quali la "mucca pazza" e i "polli alla diossina", si è giunti a fissare delle norme anche per le produzioni animali con il regolamento Ce 1804/99 del 19/7/99 pubblicato sulla GU Ce L 222 del 24/8/99.

Secondo il regolamento sulla zootecnia biologica sono escluse dall'alimentazione le farine animali, i mangimi che fanno uso di solventi chimici, foraggi non biologici e ottenuti con l'impiego di organismi geneticamente modificati e/o prodotti derivati da tali organismi.

La normativa si estende comunque a tutta la filiera produttiva: dall'origine degli animali, al loro benessere, all'alimentazione, alla profilassi e cure veterinarie, alla gestione zootecnica, agli edifici, al trasporto, ecc.

Il carico massimo di bestiame per ettaro SAU non deve superare l'apporto di 170 kg di azoto per anno, frutto delle rispettive deiezioni. Sulla base di questo parametro si può risalire al carico di animali per ettaro per singola specie.

Ciò nonostante le produzioni biologiche di origine animale hanno avuto possibilità di sviluppo, in attesa del nuovo regolamento, perchè ritenute valide le regolamentazioni convenute dagli Organismi di rappresentanza dei produttori biologici internazionali e nazionali (IFOAM, FIAO, AIAB ecc.) e altre normative specifiche dei singoli Paesi e di Enti locali.

La Provincia Autonoma di Bolzano è stata una delle prime ad occuparsi delle produzioni biologiche grazie alla Legge Provinciale n. 12 del 30/4/91 relativa alle norme per la regolamentazione e promozione dell'agricoltura biologica e della produzione integrata.

Molto importante per la diffusione delle produzioni biologiche è stata poi l'emanazione del regolamento Ce 2078/92 relativo a metodi di produzione agricola compatibili con le esigenze di protezione dell'ambiente e con la cura dello spazio "naturale", in quanto prevede un regime di aiuti per le attività a minore impatto ambientale, come è appunto l'agricoltura biologica.

Ai regolamenti comunitari hanno fatto seguito le iniziative nazionali e regionali di recepimento, con successive modifiche e integrazioni.

La Provincia Autonoma di Bolzano ha recepito il regolamento Ce 2078/92 con il Programma Operativo approvato nel dicembre 1993 ed attivato già dal 1994.

Le misure approvate sono 9, tra queste la 6 riguarda proprio le produzioni biologiche. I premi previsti consistono in 1.668.000 lire ad ettaro per le produzioni frutticole-viticole e 596.100 per quelle orticole. In pratica i premi medi per le aziende biologiche, secondo un'indagine dell'INEA relativamente al periodo 1994/97, si aggirano tra i 5 ed i 6 milioni di lire.

Il regolamento Ce 2078/92 ha avuto un ruolo determinante nel coprire i maggiori costi della produzione biologica rispetto alle tecniche convenzionali, ed i riconoscimenti di prezzo dei prodotti di nicchia hanno fatto il resto. Ben si comprende quindi l'efficacia della misura del programma agroambientale, caratterizzata da un trend molto marcato nel quadriennio.

In ogni modo è opportuno sottolineare come l'intervento finanziato nell'ambito del regolamento Ce 2078/92 della Provincia Autonoma di Bolzano ha riguardato per il 90% circa degli stanziamenti l'obiettivo del mantenimento dell'agricoltura nelle zone di alta montagna, trovando una stretta coerenza tra gli obiettivi del Programma provinciale e la formulazione delle misure.

Ulteriori azioni legislative faranno seguito al recente regolamento sulle produzioni biologiche animali, rendendo assai più complesso il quadro normativo al quale si dovranno attenere i produttori agricoli che vogliono applicare il metodo biologico.

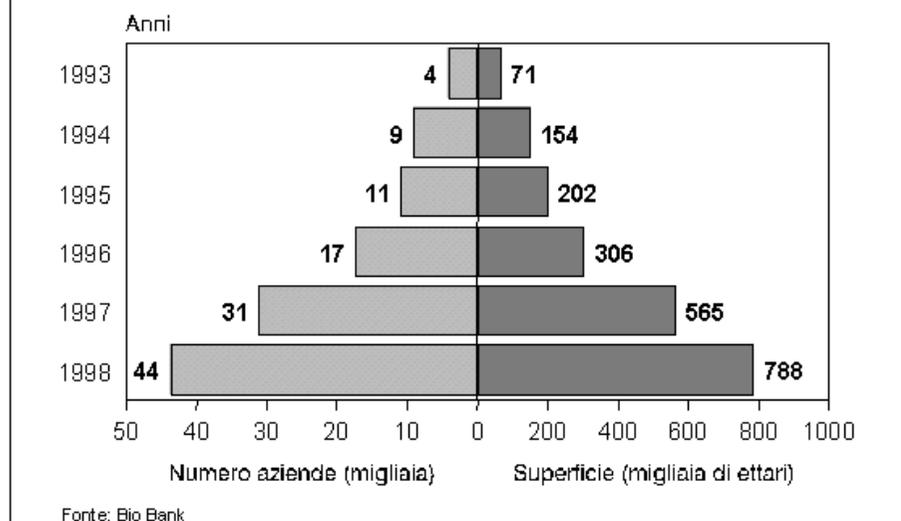
Anche i programmi previsti dalla riforma della PAC con Agenda 2000 tendono a privilegiare, tramite le azioni di accompagnamento, le produzioni più rispettose dell'ambiente, della salute dei consumatori e del benessere animale.

### 3. I ritmi di sviluppo dell'agricoltura biologica

L'agrobiologia in Italia ha iniziato i suoi primi passi negli anni Ottanta, mentre è dal 1995 in poi che i ritmi di diffusione si sono fatti più marcati, in coincidenza con il recepimento del regolamento Ce 2078/92 avvenuto con un certo ritardo in Italia ed in forma alquanto differenziata dalle Regioni.

Dalle pubblicazioni EUROSTAT nel 1987 le aziende biologiche in Italia erano quantificate in 800 unità con 9.000 ettari di superficie. Nel 1990, secondo un'indagine della Lega Ambiente, risultavano presenti 1.700 aziende che coltivavano con metodo biologico 17.000 ettari. Dai dati statistici forniti dal MIRAFAF nel 1993 risultavano iscritte 4.092 aziende per una superficie complessiva di 91.639 ettari. Dalle elaborazioni fornite da Bio Bank i dati del 1993 sono leggermente diversi, risulta comunque evidente la progressione dal 1995 in poi, infatti nel 1998 si arriva a 43.698 aziende con 788.070 ettari di superficie. Pertanto dal 1987 al 1998 le aziende si sono moltiplicate per 55 e la superficie per 88. Le stime da parte degli Organismi di settore per il 1998 ci pongono al primo posto in Europa.

Graf. 1 - Aziende biologiche in Italia e relativa superficie



La diffusione dell'agrobiologia non è solo un fenomeno italiano ma interessa molti altri Paesi. Secondo i dati raccolti dall'IFOAM in Italia interessa oltre il 5% della SAU, ma si attesta sul 7% in Svizzera, Svezia e Finlandia, mentre raggiunge il 10% in Austria.

Con riferimento al 1997, quasi la metà delle aziende biologiche si trova nelle isole (42,4%) segue l'Italia meridionale con il 24,4%. Complessivamente al Sud si concentra il 66,8% delle aziende, il restante 33,2% si ripartisce invece tra le regioni dell'Italia centro-settentrionale.

La maggiore estensione della superficie è collocata sempre nelle Isole (46,3%), seguita dal Sud (24,7%), mentre il Centro (14,3%) e il Nord (14,7%) si trovano in una posizione analoga.

Viceversa se guardiamo alle aziende di trasformazione la loro collocazione è per oltre la metà al Nord, dove esistono anche le reti di commercializzazione e le aree di maggior consumo.

All'inizio l'agricoltura biologica era rivolta principalmente alle produzioni vegetali, solo più tardi ha assunto importanza anche l'allevamento per la produzione di alimenti biologici di origine animale.

Le cause di questo ritardo sono molteplici ma quelle principali sono essenzialmente due:

- maggiore complessità alla conversione al metodo biologico di produzione degli animali rispetto alle colture;
- ritardo nell'emanazione del regolamento comunitario per le produzioni biologiche animali.

La specie maggiormente interessata al metodo biologico è quella bovina per la produzione del latte. Per la carne esistono ancora dei problemi mercantili nella differenziazione della produzione biologica rispetto a quella convenzionale, anche se alcune recenti iniziative hanno cercato di superare questo problema.

Secondo una ricerca condotta nel 1995 sulla zootecnia biologica nell'Italia settentrionale (Salghetti, 1997) è emerso chiaramente il dualismo tra le numerose e piccole aziende lattifere di collina e montagna che valorizzano il prodotto con la trasformazione, la vendita diretta e l'agriturismo rispetto ai pochi e grossi allevamenti della pianura che sono i fornitori di materia prima per l'industria di trasformazione e la grande distribuzione.

Gli allevamenti da carne sono invece funzionali alle produzioni vegetali biologiche, rappresentando una specie di "male necessario", anche se la vendita diretta della carne in loco ha consentito di valorizzare anche questa produzione con un riconoscimento di prezzo.

Sempre dall'indagine citata, i prodotti biologi hanno dimostrato di godere di un *premium price* che va dal 10 al 20% del prezzo di mercato del prodotto convenzionale.

Naturalmente i costi di produzione del biologico sono maggiori a fronte di quantitativi prodotti spesse volte inferiori. Il produttore biologico riesce a far fronte a questi *handicaps* con un maggior riconoscimento di prezzo dei prodotti sul mercato e col sostegno finanziario pubblico previsto dal regolamento Ce 2078/92.

#### 4. Situazione in Alto Adige

##### 4.1. Alcuni elementi sull'agricoltura e la zootecnia

L'agricoltura dell'Alto Adige è fortemente integrata con l'economia del territorio, caratterizzato in prevalenza da aree montane, dove le uniche attività primarie possibili sono quella forestale, il pascolo e le coltivazioni di foraggi.

Per il resto, nelle zone di media collina e nei fondovalle, frutticoltura a base di mele e viticoltura fanno la parte del leone, mentre allevamenti di trote e coltivazione di piccoli frutti e ortaggi costituiscono valide attività di nicchia.

La superficie agricola utile rappresenta solamente il 37% del territorio, di questa ben il 61% è rappresentata dai pascoli e il 28% dai prati che fanno da supporto all'allevamento bovino, che rappresenta il comparto più importante dell'economia del primario. Le altre coltivazioni di rilievo sono la frutticoltura (6,5%) e la viticoltura (2%). Infatti il 48% delle aziende sono interessate all'allevamento zootecnico, al quale si aggiunge un altro 10% ad indirizzo zootecnico-forestale. Seguono per importanza, con il 27%, le aziende frutticole, quelle fruttivicole (7%), viticole (5%) e forestali (3%).

Tab. 1 - Patrimonio zootecnico in Alto Adige

Specie	A N N O		
	1982 (1)	1990 (1)	1998 (2)
Bovini	139.708	151.143	147.850
Equini	2.593	3.319	5.200
Ovini	25.796	32.293	41.000
Caprini	7.930	11.130	15.000
Suini	34.923	25.273	24.910
Avicoli	261.986	188.387	190.000
Conigli	41.910	32.485	30.500

(1) Fonte: ISTAT

(2) Stime dell'Ispettorato all'Agricoltura della Provincia di Bolzano

Il patrimonio bovino tende a stabilizzarsi sui 150.000 capi, nonostante la lieve contrazione del numero degli allevamenti per la chiusura delle piccole stalle, non più economiche, con una ulteriore espansione delle aziende più grandi.

Tra le altre specie stanno acquistando sempre più peso gli ovini, i caprini e gli equini destinati all'equitazione. Abbastanza stabili sono le altre specie: suini, avicoli e conigli.

La produzione lattiera è in continua espansione nonostante la crisi di mercato dei prodotti lattiero caseari che ha avuto inizio nel 1995. Si tratta comunque di un fenomeno generalizzato in tutta Italia.

Per molti agricoltori l'allevamento delle specie minori costituisce una valida alternativa, quando non può essere ampliata la produzione bovina.

Il settore agricolo è tenuto in grande considerazione in Alto Adige non solamente per la funzione produttiva ma anche per la sua funzione sociale, di salvaguardia del territorio e dell'ambiente, per la conservazione della cultura e delle tradizioni locali. Ne sono testimonianza i massicci interventi pubblici di sostegno e le normative specifiche per il settore.

Una particolarità della struttura fondiaria in Alto Adige è costituita dal "maso chiuso", tipico istituto dell'azienda familiare locale, che garantisce l'integrità del fondo anche nelle successioni familiari e la cui presenza assume ruoli di plurifunzionalità (architettura rurale, paesaggio, turismo, conservazione dell'ambiente).

La frammentazione fondiaria è infatti una delle cause dell'abbandono e dello spopolamento delle aree di montagna e l'istituto del "maso chiuso" ha fatto da freno a questo degrado.

#### 4.2 Stato attuale dell'agrobiologia

Secondo i dati forniti dall'Ispettorato all'Agricoltura della Provincia Autonoma di Bolzano, nel 1998 erano presenti 166 aziende biologiche in Alto Adige, delle quali 105 a completo regime biologico, 12 miste (parte biologiche e parte convenzionali) e 49 di trasformazione.

Nei primi mesi del 1999 si sono aggiunte altre 40 adesioni, per cui il numero complessivo delle aziende biologiche è passato a 206 unità. Tra le aziende di trasformazione la quota più significativa attiene alla commercializzazione dell'ortofrutta (15).

La ripartizione della superficie delle prime aziende vede l'affermarsi della frutticoltura (52,8%), seguita dalla foraggicoltura (35,5%) e dalla viticoltura (6,9%), a seguire diversi altri indirizzi produttivi.

Delle 32 aziende biologiche con allevamento va tenuto conto che 8 sono ancora in fase di conversione e 3 sono ad indirizzo misto, pertanto quelle biologiche complete sono 21.

Tab. 2- Ripartizione della superficie delle aziende biologiche per tipo di coltivazione

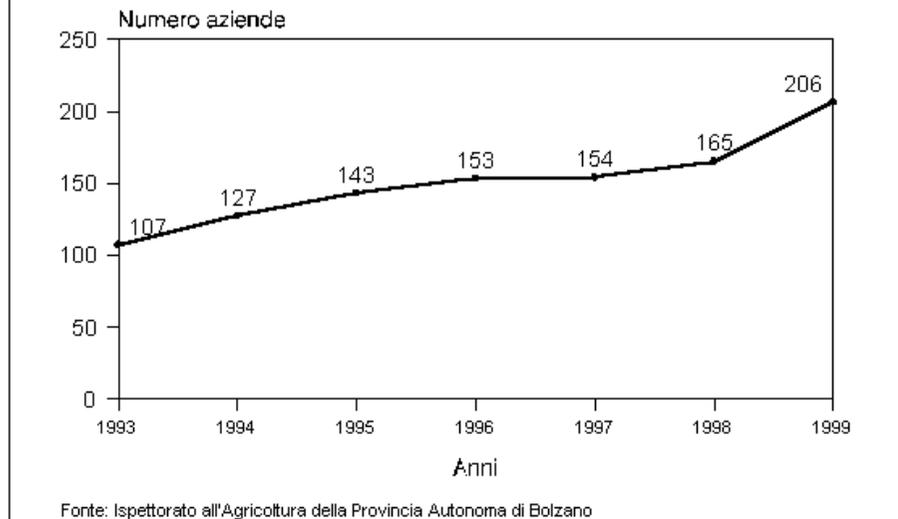
Tipo di coltivazione	Superficie biologica	
	ettari	%
- Frutticoltura	405,88	52,8
- Viticoltura	52,75	6,9
- Arativo	12,55	1,6
- Orticoltura	10,30	1,3
- Seminativi	10,23	1,3
- Piante officinali	2,00	0,3
- Vivai	2,59	0,3
- Prati permanenti	273,09	35,5
TOTALE	769,39	100,0

La parte dell'Alto Adige dove è più diffusa l'agrobiologia e l'allevamento biologico è quella intorno a Merano e in Val Venosta. Quivi sono presenti anche due realtà interessanti legate alla produzione biologica:

- la commercializzazione di carne biologica presso un macellaio di Terlano;
- la commercializzazione di latte biologico presso la latteria sociale di Merano.

Nel primo caso viene riconosciuto ai produttori di carne un premium price del 10%, mentre per il latte si arriva all'11%. In complesso, a partire dal mese di giugno del 1998, sono stati commercializzati in media 600 litri di latte biologico al giorno.

## Graf. 2 - Aziende biologiche in Alto Adige



L'espansione dell'agrobiologia è destinata a continuare, grazie anche all'elargizione dei contributi previsti dal regolamento Ce 2078/92 che ormai è entrato in pieno regime.

Se guardiamo in retrospettiva osserviamo che i maggiori ritmi espansivi del biologico si sono avuti in Alto Adige dal 1993 al 1996. Nel conteggio del 1999 sono state aggiunte le nuove adesioni (40), inoltre sono sommate anche le aziende biologiche presenti prima del 1993, in tal modo si arriva alle 206 aziende biologiche del 1999.

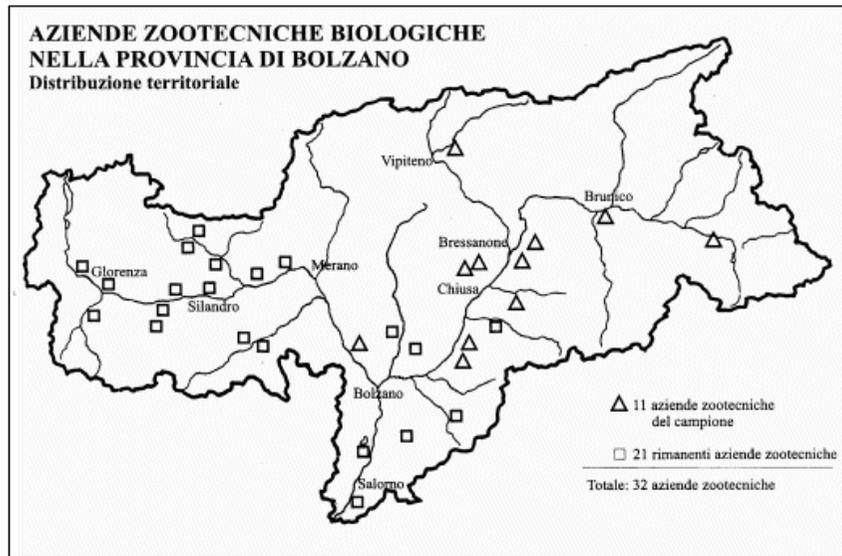
La conversione al metodo biologico di produzione nel 1993 da parte dei produttori agricoli ha coinciso con l'approvazione di un programma di intervento della Giunta Provinciale Altoatesina per lo stanziamento di fondi a favore di un'agricoltura più rispettosa dell'ambiente.

Nel 1999 vi è stato un altro boom di adesioni al metodo biologico dal momento che è stato elaborato un analogo piano provinciale di intervento.

Il nuovo piano è impostato su otto misure di intervento e precisamente:

- contributi per le aziende zootecniche;
- disposizioni per l'allevamento;
- misure per la cerealicoltura nelle zone di montagna;
- requisiti per la viticoltura ecocompatibile;
- requisiti per l'agricoltura biologica;
- disposizioni per l'orticoltura ecocompatibile;

- premi per l'alpeggio;
- contributi per la cura del paesaggio.



#### 4.3. L'attività delle Associazioni biologiche

Nella Provincia di Bolzano sono presenti tre Associazioni biologiche alle quali aderiscono praticamente tutte le aziende agricole e di allevamento che adottano il metodo dell'agricoltura biologica e biodinamica.

La principale Associazione che vi opera è la BIOLAND-Alto Adige, con sede a Terlano, come emanazione dell'Associazione BIOLAND della Germania a cui aderiscono oltre la metà delle aziende presenti.

L'organismo di controllo è il BIOZERT, sempre della Germania, e riconosciuto anche in Italia per la zona dell'Alto Adige. L'Associazione ha emanato delle proprie direttive per la gestione delle aziende zootecniche biologiche che attengono a tutta la filiera: dalla produzione di foraggi all'acquisto di capi, al governo degli animali, alla macellazione degli animali sino alla commercializzazione della carne. Da questa Associazione si è staccato recentemente un gruppo di agricoltori della Val Venosta, per costituire la BIO-VALVENOSTA.

Segue l'Unione Coltivatori Alternativi (UCA) con sede a Morter in Val Venosta. L'organismo di controllo è l'AIAB, riconosciuto in tutto il territorio nazionale. E' un'associazione nata nel 1987 e finalizzata principalmente alla tutela delle produzioni biologiche vegetali ecocompatibili più che a quelle zootecniche.

L'Associazione promuove metodi naturali di coltivazione che venivano utilizzati anticamente per conservare la fertilità naturale del terreno quali:

- la diversificazione delle colture;
- la lavorazione mirata del suolo;

- la rotazione delle coltivazioni;
- l'uso del concime organico;
- l'uso del compost come concime.

Anche in questo caso sono state elaborate delle direttive alle quali i produttori si devono attenere. E' naturale che gli animali nutriti con foraggi e cereali provenienti da aziende soggette a tali direttive forniscano prodotti del tutto conformi ai requisiti dell'agricoltura biologica.

In generale le aziende aderenti si dedicano principalmente alla produzione di frutta, ortaggi, erbe aromatiche e miele; in alcune si affianca anche l'allevamento biologico di varie specie (bovini, suini, ovicaprini, avicoli, cunicoli ed in un'azienda anche daini).

La terza è l'Associazione BIODINAMICA, legata appunto all'agricoltura biodinamica, con sede a Lana. L'organismo di controllo è la CODEX, anch'essa riconosciuta a livello nazionale.

I produttori biodinamici possono conferire i loro prodotti al Consorzio OSIRIS, con sede a Gargazzone, che si occupa della commercializzazione.

Le norme di produzione sono quelle peculiari dell'agricoltura biodinamica i cui canoni rientrano a pieno titolo tra quelli della produzione biologica. L'agricoltura biodinamica propugna una più stretta connessione tra produzioni vegetali e zootecniche per garantire un armonico divenire della chiusura naturale del ciclo della vita.

## 5. Indagine su un gruppo di aziende biologiche con bovini in Alto Adige

### 5.1. Metodologia

Per avere una conoscenza più approfondita della zootecnia biologica è stato necessario entrare nelle aziende per cogliere dall'interno le peculiarità del nuovo modo di produrre, le motivazioni della scelta, gli adattamenti aziendali, la gestione tecnica, quella economica sino alla commercializzazione dei prodotti.

L'indagine aziendale è stata condotta tramite un apposito questionario in lingua tedesca, prendendo in esame 11 allevamenti bovini biologici, un terzo degli allevamenti biologici dell'Alto Adige e la metà di quelli che hanno superato la fase di conversione nel 1998.

Rappresenta un campione significativo della zootecnia biologica locale, in grado di offrire un quadro realistico del nuovo modo di produrre e di fornire delle indicazioni utili sulle reali prospettive di sviluppo del nuovo comparto.

Trattasi di aziende a conduzione familiare, come di regola nella zona, caratterizzate dalla presenza di bestiame bovino sia da latte che da carne. In alcune aziende accanto ai bovini, come vedremo di seguito, si accompagnano anche altre specie animali.

Le aziende hanno offerto la massima collaborazione all'indagine, dimostrando una notevole apertura verso il mondo esterno, grazie anche ad un livello culturale abbastanza elevato da parte degli imprenditori, nonostante le piccole dimensioni aziendali e la collocazione in aree svantaggiate di montagna.

Le informazioni raccolte hanno spaziato in tutte le direzioni ed in particolare riguardano:

- aspetti sociali;
- caratteristiche strutturali;
- riparto della produzione;
- distribuzione dei costi;

- redditività dei processi produttivi;
- trasformazione e commercializzazione dei prodotti.

I dati raccolti sono stati quindi inseriti in un foglio elettronico per il successivo trattamento ed elaborazione con output per singola azienda e di gruppo.

Si è pertanto giunti alla redazione del bilancio economico delle aziende e alla formazione degli indici più significativi sulla gestione aziendale. I risultati ci forniscono uno spaccato dell'agrobiologia locale che presenta delle peculiarità rispetto ad altre aree del Paese.

La recente espansione della produzione biologica sta portando fuori dalla posizione di nicchia il comparto con ricadute sulle prospettive future delle aziende ed anche del territorio, rivitalizzando alcune aree che erano prossime all'abbandono.

Le produzioni biologiche sono infatti un'occasione di richiamo dei consumatori, contribuendo all'allargamento della domanda interna, che costituisce il vero motore dello sviluppo.

## 5.2. Caratteristiche socio-strutturali delle aziende

La conversione al metodo biologico di produzione è stata fortemente motivata da scelte culturali e solo in secondo ordine si sono poste quelle economiche più vantaggiose, grazie al prezzo più alto che i consumatori sono disposti a pagare per i prodotti biologici e ai contributi pubblici.

Non è estraneo a queste scelte il titolo di studio abbastanza elevato che caratterizza gli imprenditori. Infatti, oltre la metà degli intervistati ha acquisito un titolo di scuola media superiore, o scuola professionale agricola, oppure un titolo universitario.

La limitata dimensione aziendale e il diffuso autoconsumo sono funzionali ad un'azienda di tipo part-time. Un terzo dei titolari svolge infatti anche un'altra attività in contemporanea a quella agricola, senza contare la diffusa presenza di familiari che lavorano in altri settori produttivi e che collaborano in forma saltuaria ai lavori aziendali.

In pratica le aziende indagate hanno fatto la scelta del metodo biologico principalmente per soddisfare le esigenze maturate in famiglia e in un secondo tempo come scelta funzionale all'integrazione del reddito, grazie alla vendita diretta di prodotti biologici con un elevato riconoscimento di prezzo e ai contributi pubblici.

Ciò ha contribuito ad elevare il budget di queste piccole aziende che non potendosi allargare in termini di superficie, hanno trovato una soluzione nel realizzare valori aggiunti più elevati con la trasformazione dei prodotti e la vendita diretta, che ha consentito di ampliare il volume d'affari. In pratica alla carenza di dimensione fisica si è ovviato con un allargamento della dimensione economica.

La ridotta dimensione delle aziende tende a valorizzare l'autoconsumo dei prodotti aziendali e la vendita diretta; infatti ben 8 aziende pongono alla base della scelta biologica la qualità, la salubrità e la genuinità dei prodotti nonché le condizioni migliori di vita e di alimentazione per la famiglia che può così conoscere l'origine dei prodotti. E' implicita la preoccupazione per la salute dei consumatori ma anche per il benessere degli animali allevati.

Risulta carente invece il ricorso all'assistenza tecnica esterna, che è legata principalmente alle Associazioni biologiche. Quando esiste, riguarda le produzioni vegetali e non quelle zootecniche.

Le aziende non sono sempre in grado di assicurare lavoro a tutta la famiglia anche se in certi periodi dell'anno i familiari collaborano nei lavori stagionali. E' questa elasticità della famiglia che consente di fare fronte alle impennate stagionali del fabbisogno di lavoro, che rimane pressochè costante per l'intero anno nelle produzioni zootecniche, mentre richiede molto impegno in un breve periodo di tempo per la raccolta dei prodotti (fieno, frutta, uva, piccoli frutti ecc.). L'impiego del lavoro familiare tende ad escludere il ricorso alla manodopera avventizia.

La presenza di più attività, in particolare la trasformazione in azienda dei prodotti, l'agriturismo, le prestazioni di macchine aziendali verso l'esterno ecc. sono funzionali a soddisfare l'occupazione aziendale quando al lavoro dell'imprenditore si aggiunge quello di altri familiari. Rimane comunque un'area di sottooccupazione della famiglia che viene coperta con il part-time.

Le aziende del campione hanno tutte dei terreni in montagna finalizzati alla produzione di foraggi e al pascolo. I rimanenti terreni del fondovalle sono investiti a colture intensive (frutteti e vigneti). Mediamente le aziende biologiche sono collocate sui 1.000 metri di quota, condizione diffusa in Alto Adige anche per le aziende convenzionali.

L'intera superficie delle aziende è condotta con metodo biologico di produzione, un'azienda dichiara di adottare il più impegnativo metodo biodinamico.

L'interesse per le produzioni ecocompatibili è assai radicato in Alto Adige. Lo testimoniano anche le aziende oggetto dell'indagine la cui prima conversione al metodo biologico risale al 1977, altre aziende hanno aderito nel 1983 (3), le rimanenti adesioni (7) sono successive all'emanazione del regolamento comunitario sul biologico e al relativo recepimento da parte della Provincia Autonoma di Bolzano.

Gli organismi di controllo del metodo biologico di produzione delle aziende sono il BIOZERT (6) e l'AIAB (5); tutte le aziende indagate hanno presentato la domanda per i contributi previsti per le produzioni biologiche.

Tab. 3 - Alcuni dati strutturali

Descrizione	Unità di misura	Media per azienda
- Colture vendibili	ha	1,9
	%	21,4
- Colture foraggere	ha	7,0
	%	78,6
SAU	ha	9,0
	%	100,0
- Bosco	ha	3,8
- ULU fam.	n	1,4
- Capo bovini	n	14,2
- Di cui vacche	n	4,7
- UGB	n	9,8

Per quanto riguarda le caratteristiche strutturali delle aziende, emerge la ristrettezza della dimensione aziendale che è di soli 9 ettari SAU. Destinata al foraggio è il 78,6% della superficie, e ciò evidenzia l'orientamento funzionale alla trasformazione zootecnica, l'unica in grado di valorizzare la povertà delle risorse foraggere. In pratica lo spazio riservato alle coltivazioni biologiche vendibili è limitato (21,4%). D'altra parte oltre certe altitudini la foraggicoltura e l'allevamento del bestiame rimangono le uniche alternative. Solo nel fondovalle, per la presenza di condizioni ambientali più favorevoli, le possibilità di coltivazione si allargano all'ortofrutta, alla viticoltura e ai piccoli frutti fino a costituire le principali fonti di reddito. Anche la presenza del bosco contribuisce ad integrare l'occupazione in certi periodi dell'anno e a dare origine a produzioni complementari.

Nonostante le ridotte dimensioni (9 ettari SAU) la presenza di addetti per azienda raggiunge le 1,4 ULU con un rapporto di 6,3 ettari SAU per unità lavoratrice a tempo pieno. Il ricorso ai salariati avventizi è limitato ad una sola azienda per la raccolta della frutta in carenza di manodopera familiare.

Meraviglia come in aree difficili possa esistere una intensità di occupazione in agricoltura così elevata. Questa è comunque la condizione migliore per assicurare la presenza umana sul territorio e la salvaguardia dell'ambiente. Il metodo biologico di produzione, con la presenza della zootecnia, fornisce un ulteriore contributo al raggiungimento di questi obiettivi.

La maggior parte delle aziende alleva bovine da latte, in realtà a queste si accompagnano sempre anche dei bovini da carne che, aggiunti alle aziende con soli bovini da ingrasso, porta in posizione minoritaria il numero delle lattifere. Infatti ogni azienda ha in media 14 capi bovini, di cui 5 vacche da latte. Tradotti in capi grossi si tratta di 9,8 UGB

in media per azienda, con un carico di 6,9 UGB per addetto e di 1,4 UGB per ettaro a foraggiare.

Nel calcolo non abbiamo incluse le altre specie allevate. Si tratta principalmente di suini, ovicaprini e avicoli. Questi animali vengono allevati principalmente per la famiglia e la vendita diretta al consumatore.

### 5.3 Le produzioni

Le aziende riescono a realizzare in media oltre 71 milioni di lire di produzione, costituita in prevalenza da prodotti non trasformati: carne, latte, frutta, ortaggi, uova ecc. Le produzioni animali sono quelle prevalenti con il 42,9% della Plv, seguite da quelle vegetali (30,9). In alcune aziende la produzione vegetale supera largamente quella animale, trattasi in particolare di frutta biologica coltivata nel fondovalle.

La differenziazione dell'attività produttiva dipende molto dall'altitudine a cui si trova l'azienda e dalla possibilità di trovare nelle vicinanze un mercato dei prodotti biologici, in grado di assicurare una continuità di vendita dei prodotti ad un prezzo remunerativo.

Tab. 4 - Produzione lorda vendibile

Tipo di produzione	Media per azienda	
	Valore (000 lire)	%
- Vegetale	22.109	30,9
- Animale	30.640	42,9
- Vegetale trasformata	4.027	5,6
- Animale trasformata	5.209	7,3
- Servizi prestati	3.182	4,5
- Contributi pubblici	6.299	8,8
TOTALE	71.466	100,0

E' limitato al 12,9% l'apporto dei prodotti trasformati, sia vegetali (conserve, succhi ecc.) che animali (formaggi, burro, insaccati, speck ecc.). Nella prospettiva di un loro ampliamento si dovranno fare i conti con le nuove disposizioni igienico-sanitarie, con la messa a norma dei locali e delle attrezzature.

Si presume che queste norme saranno un vincolo all'auspicata espansione delle trasformazioni in azienda; è più probabile infatti che portino ad una futura contrazione.

Le prestazioni di servizi contribuiscono a rimpinguare del 4,5% la produzione, a queste si aggiungono i contributi pubblici (8,8%) che si riferiscono ai vari interventi previsti con il recepimento del regolamento Ce 2078/92.

Le misure attivate dalla Provincia Autonoma di Bolzano sono 9; la numero 6 riguarda le produzioni biologiche. In realtà le aziende possono concorrere a più misure, cumulando i relativi contributi.

Tenuto conto della ristrettezza delle aziende la riscossione di oltre 6 milioni di lire di contributi pubblici porta ad una incidenza media di 700.000 lire per ettaro SAU. Ciò nonostante le aziende non si adagiano sui proventi dei contributi perchè riescono a realizzare, si ripete, oltre 71 milioni di lire di entrate.

I risultati produttivi confermano che le motivazioni della scelta biologica sono principalmente di tipo culturale e salutistica, mentre la motivazione del contributo pubblico viene in secondo piano. Ciò non toglie che i risultati economici delle aziende biologiche non siano consistenti, trattasi di quasi 8 milioni di lire di ricavi per ettaro SAU e 50 per addetto,

anche se ci troviamo di fronte a delle piccole aziende collocate in zone di montagna.

Nelle aziende biologiche si torna alla riscoperta della complessità dell'indirizzo produttivo, della trasformazione e della valorizzazione dei prodotti all'interno dell'azienda. Non stupisce quindi la pluralità delle colture praticate (nonostante l'ambiente difficile), delle specie allevate, delle trasformazioni di prodotti e della presenza dei servizi forniti dalle aziende.

Molte produzioni sono funzionali alla vendita diretta al consumatore e all'autoconsumo familiare, per soddisfare un'ampia gamma di bisogni. Le trasformazioni portano ad elevare il valore aggiunto dei prodotti e ad ampliare il volume d'affari per ovviare alla ristrettezza della dimensione aziendale, a cui vanno aggiunte le prestazioni di servizi.

Se alle colture praticate, agli allevamenti presenti, alle trasformazioni dei prodotti e alla prestazione dei servizi aggiungiamo una serie di contributi pubblici si creano le condizioni propizie affinché delle piccole aziende, anche in zone svantaggiate, possano raggiungere un budget sufficiente che dia loro motivo di esistere e consentire la permanenza delle attività agricole e di addetti sul territorio.

In caso di particolari difficoltà esiste sempre la possibilità del part-time che è presente in diverse aziende.

Tab. 5 - Le attività aziendali

ATTIVITA'	Aziende n	ATTIVITA'	Aziende n
COLTURE VENDIBILI		ALLEVAMENTI	
- Castagno	1	- Avicoli	8
- Erbe aromatiche	1	- Bovini da carne	5
- Farro	1	- Bovini da latte	6
- Frumento tenero	2	- Caprini	1
- Frutteto (mele)	2	- Ovini	2
- Ortaggi	5	- Equini	2
- Patate	5	- Suini	8
- Piccoli frutti	3	PRODOTTI TRASFOR.	
- Vigneto	3	- Burro	3
COLTURE FORAGGERE		- Carne	1
- Pascolo	10	- Conserve vegetali	2
- Prato permanente	11	- Formaggio bovino	3
- Prato avvicendato	2	- Salumi	2
ATTIVITA' FORESTALE		- Uova	5
- Bosco	2	- Vino	2
		SERVIZI	
		- Agriturismo	2
		- Contoterzismo	1

La presenza dell'allevamento bovino è comune a tutte le aziende indagate, ad esso si accompagnano spesso quello suino e avicolo. Gli equini sono funzionali all'agriturismo ed alle attività equestri della famiglia.

La valorizzazione di una parte del latte avviene tramite la trasformazione in formaggio e burro ed in parte con la vendita diretta al consumo, il rimanente viene conferito al caseificio senza la differenziazione di prodotto biologico.

E' interessante notare la frequente presenza dei suini e degli avicoli che danno luogo alla vendita diretta di carne, di salumi (speck) e di uova, per ottenere una crescita del volume d'affari con un aumento dell'occupazione, senza la necessità di un ampliamento della superficie aziendale.

#### 5.4. Costi e reddito aziendale

I costi espliciti sostenuti dalle aziende corrispondono sostanzialmente alle spese di reintegrazione che incidono solamente per il 23% sulla Plv. I compensi aziendali infatti (affitti, salari, interessi) sono quasi inesistenti, a conferma del fatto che ci troviamo di fronte ad aziende familiari in proprietà.

In pratica il reddito netto corrisponde al prodotto netto e tutti i compensi ai fattori vanno all'imprenditore proprietario-coltivatore.

L'analisi dei costi mette in evidenza la ridotta dipendenza delle aziende dai mezzi produttivi del mercato e la valorizzazione delle risorse interne.

Le spese variabili sono quelle che rivestono maggiore peso e rappresentano il 40% di tutti i costi. Si riferiscono in particolare ai materiali di consumo (sementi, concimi, mangimi, foraggi, spese energetiche e varie). Le aziende tendono a risparmiare sugli acquisti facendo leva sul reimpiego dei prodotti aziendali.

La spesa principale riguarda l'acquisto di alimenti per il bestiame, segue quella per i carburanti, veramente modeste sono le spese per sementi e concimi.

Tab. 6 - Ripartizione dei costi aziendali

Descrizione	Media per azienda	
	Valore (000 lire)	%
- Spese varie	6.857	40,0
- Quote	5.964	34,9
- Servizi extra-aziendali	3.941	23,0
- Compensi aziendali	364	2,1
TOTALE	17.126	100,0

L'alimentazione del bestiame è strettamente legata ai foraggi prodotti in azienda e ottenuti con metodo biologico di produzione, nonchè dai pascoli di alta quota.

L'impiego dei MCI non è generalizzato, infatti in alcuni allevamenti non ne viene fatto uso, una parte dei mangimi deriva dalla preparazione aziendale e una parte viene acquistata sul mercato da mangimifici certificati, presenti uno a Merano e l'altro a Vandoies in Val Pusteria. I mangimi biologici vengono usati principalmente per le bovine in lattazione e per i suini.

E' in ogni caso diffuso per i bovini il pascolo estivo in malga, che assicura le migliori condizioni di salubrità per gli animali. Nei restanti periodi dell'anno gli animali vengono stabulati, per le condizioni climatiche avverse tipiche delle zone montane.

Tra le razze allevate prevale la Grigia Alpina e la Bruna Alpina, accompagnate da altre razze quali la Simmenthal, la Pinzgauer, la Frisona e la Aberdeen Angus per la linea vacca-vitello e relativi incroci per la produzione di carne.

La stabulazione fissa interessa 7 aziende, mentre 4 sono passate a quella libera, soprattutto per gli animali da carne.

Le modalità di allevamento e il tipo di alimentazione degli animali consentono di contenere le spese sanitarie al minimo indispensabile. Solo in tre casi si ricorre a farmaci allopatrici mentre è generalizzata la pratica omeopatica, a testimonianza della forte propensione del produttore ad ottenere alimenti salubri, che rappresentano anche una quota importante dei consumi della famiglia.

Gli allevatori sono convinti che il cambiamento dall'agricoltura convenzionale a quella biologica abbia influito positivamente sulla salute degli animali, che raramente necessitano di terapie veterinarie.

In ogni caso la medicina alternativa, con l'uso dell'omeopatia e della fitoterapia, è abbastanza conosciuta dagli allevatori e praticata dai veterinari in Alto Adige. La diffusione della medicina alternativa nelle vicine Austria e Germania può avere avuto un influsso importante.

Seguono per importanza le spese fisse rappresentate dalle quote (ammortamento, manutenzione e assicurazione) che incidono per il 34,9%. In realtà gli investimenti fissi delle aziende sono limitati e buona parte sono già stati ammortizzati. Sono comunque indispensabili per migliorare le condizioni di lavoro degli agricoltori, anche se il lavoro manuale riveste ancora notevole importanza in aziende di piccola dimensione e in aree montane.

Il peso dei servizi extra-aziendali (23,0%) è riconducibile principalmente ai contributi INPS per gli oneri sociali degli addetti familiari (ex CAU). Sono rapportati alle unità lavorative iscritte, tenuto conto che nelle aree montane vigono per altro delle contribuzioni agevolate.

In complesso i costi aziendali ammontano mediamente a 17 milioni di lire per azienda, a fronte di una produzione di 71. Pertanto il reddito netto che ne risulta è di 54 milioni di lire, il che non è poco per aziende di limitata estensione (9 ettari) e in zona montana.

Il reddito medio per ettaro SAU è abbastanza elevato con 6 milioni di lire; rapportato alle unità lavoratrici familiari si raggiungono i 38 milioni di lire. Se consideriamo che la remunerazione ai capitali agrario e fondiario è di limitata entità, per i bassi investimenti e i ridotti saggi di interesse, rimane una buona remunerazione del lavoro familiare.

A questo proposito basti ricordare che in una ricerca del 1995 (Salghetti, 1997) su aziende biologiche dell'Italia Settentrionale era stato accertato un reddito netto di 3,6 milioni di lire per ettaro SAU e di 54,8 per unità lavoratrice familiare, ma con una dimensione tre volte superiore, comprendente imprese lavoratrici di pianura e di montagna.

Pertanto possiamo concludere dicendo che i risultati economici delle aziende biologiche con bovini dell'Alto Adige sono molto soddisfacenti, tenuto conto della ridotta dimensione fisica delle aziende, della presenza di mandrie piuttosto piccole, in condizioni ambientali difficili, tipiche delle zone montane.

Concorrono alla realizzazione di questi risultati positivi tutta una serie di condizioni che riescono a contrastare gli handicaps lamentati:

- forti motivazioni ideali e culturali;
- attaccamento alla terra e all'ambiente rurale;
- coesione e collaborazione del nucleo familiare;
- diversificazione delle produzioni per cogliere tutte le opportunità;
- ridotta dipendenza dal mercato dei mezzi produttivi;
- valorizzazione delle risorse aziendali;
- commercializzazione diretta della produzione;

- integrazione di reddito extraagricolo;

- ruolo sociale riconosciuto all'agricoltore dalla popolazione locale.

La zootecnia biologica in Alto Adige può quindi fornire un importante contributo all'economia del territorio, alla salvaguardia dell'ambiente, alla protezione del suolo e al mantenimento in loco di popolazioni in grado di trovare risposte adeguate alle loro aspettative.

### 5.5 Organizzazione produttiva e commerciale

La vendita dei prodotti biologici avviene principalmente in azienda, a cui fa seguito la vendita tramite i dettaglianti. Solo in un caso si passa tramite i grossisti e all'Associazione biologica, mentre è marginale la quota esportata (si tratta di mele destinate alla Germania e alla Gran Bretagna).

Sta prendendo piede anche la vendita diretta sui mercatini zonali, come già avviene in altri luoghi. Un mercatino esclusivamente biologico è presente a Bressanone con cadenza quindicinale. Le mele invece vengono vendute direttamente all'Associazione di appartenenza che le distribuisce alle cooperative.

In tutte le aziende è presente l'autoconsumo dei prodotti con quote che raggiungono il 10% della produzione in diversi casi, in coerenza con la motivazione principale nella scelta del metodo biologico di produzione che è quella della qualità e salubrità dei prodotti agricoli destinati alla famiglia.

L'incidenza degli autoconsumi familiari è in gran parte legata alle ridotte dimensioni aziendali ed in parte ai prelievi di parenti più o meno lontani ai quali viene corrisposto in natura il compenso per la collaborazione prestata nei periodi della raccolta dei prodotti. Ed ecco allora che il nucleo familiare d'origine riesce ad approvvigionare di frutta, verdura, salumi, vino, carne ecc. più nuclei familiari senza un corrispettivo in denaro.

E' molto bello e di elevato significato sociale e di valore morale e culturale vedere come le piccole aziende, in particolare quelle biologiche che assicurano prodotti sani e genuini, siano ancora un punto di riferimento per tante persone costrette ad abbandonare la terra per esigenze di lavoro ma che ambiscono a mantenere un legame continuativo con il luogo d'origine.

E' in questa ricerca dell'ambiente naturale e delle proprie origini la chiave di lettura della continuità delle piccole aziende che non sono lasciate a se stesse, grazie proprio al valore sociale che viene riconosciuto all'azienda-famiglia.

La vendita dei prodotti in azienda consente di realizzare un prezzo a volte più che doppio rispetto a quello corrente sul mercato. Si sono infatti riscontrati in alcuni casi dei prezzi molto interessanti, come la vendita di latte alimentare a 1.700 lire il litro, le uova a 500 lire l'una, il frumento a 2.000 il chilogrammo, le patate a 1.500 lire il chilogrammo ecc. Questa non è certamente la regola, ma nelle piccole nicchie di mercato è un'opportunità che i produttori biologici possono cogliere.

E' interessante notare come la famiglia contadina colga l'occasione nella vendita diretta dei prodotti biologici per instaurare anche nuovi rapporti sociali e di amicizia con i clienti abituali, che condividono la scelta dell'agrobiologia, dando soddisfazioni economiche e morali all'imprenditore e come i prodotti biologici siano di stimolo a proseguire l'attività.

La clientela affezionata rappresenta un capitale di avviamento per l'azienda e consente di ottenere un canale commerciale di "passaparola" a costo zero. Per tale motivo il produttore biologico cerca di adattare i prezzi alla disponibilità di acquisto dei clienti abituali (prezzo opportunità) rifuggendo da proposte allettanti ma episodiche di vendita dei prodotti biologici ai commercianti.

Le modalità di vendita dei prodotti e il volume limitato della produzione rendono poco frequenti le forme programmate di commercializzazione. Si sta comunque avviando un proficuo rapporto di collaborazione con le macellerie locali per l'approvvigionamento di carne biologica, a Terzano infatti è stata avviata la commercializzazione di carne con marchio biologico.

Pertanto i marchi di vendita e l'attività pubblicitaria per i prodotti biologici da parte dei produttori sono poco diffusi (cartelli stradali, depliant), a parte quelli delle Associazioni di appartenenza (BIOLAND, AIAB, UCA).

Nella vendita diretta i rapporti con il consumatore sono improntati sulla reciproca fiducia e l'informazione del consumatore avviene con il "passaparola", con risparmio sui costi di

marketing e quindi con un contenimento del prezzo dei prodotti offerti al consumatore. E' la strategia vincente per i piccoli produttori che riescono a richiamare in loco un numero di consumatori consistente per collocare i prodotti biologici. Oltre certe dimensioni questa strategia deve lasciare il passo a forme di integrazione mercantili che assicurino la collocazione dell'intera produzione per non perdere i vantaggi della differenziazione tra prodotto biologico e convenzionale. In realtà parte della produzione biologica segue ancora il canale commerciale dei prodotti convenzionali, soprattutto per quanto riguarda il latte e la carne.

## 6. Alcune conclusioni

L'agrobiologia in Italia è di recente introduzione in base alle normative del regolamento Ce 2092/91 ed ha avuto un rapido sviluppo grazie agli incentivi finanziari previsti dal regolamento Ce 2078/92.

In un primo tempo hanno trovato diffusione le produzioni biologiche di origine vegetale, successivamente hanno assunto importanza anche quelle di origine animale. Il ritardo è imputabile in parte alla maggiore complessità della conversione degli allevamenti e in parte alla tardiva introduzione del regolamento specifico per le produzioni animali. Infatti il regolamento Ce 1804/99 relativo al metodo biologico per le produzioni animali porta la data del 19 luglio 1999 ed è stato pubblicato sulla G.U. della Ce il 24 agosto 1999.

In Alto Adige l'agrobiologia ha interessato 166 aziende nel corso del 1998, di cui 32 con produzioni zootecniche (19%). I ritmi di espansione sono assai elevati, visto che nel 1999 hanno già fatto domanda di adesione altre 40 aziende.

In realtà le produzioni biologiche di origine animale sono inferiori a quelle desumibili dal numero degli allevamenti, perchè buona parte del latte e della carne non viene ancora commercializzata con marchio biologico. Infatti prevale la commercializzazione dei prodotti biologici di fondovalle (frutta, ortaggi, uva), mentre la zootecnia è pressochè esclusiva della montagna e si integra con l'agricoltura di fondovalle, dove l'allevamento è di supporto alle produzioni vegetali biologiche assicurando la fertilizzazione organica del terreno.

In alcune aziende è sviluppata la trasformazione dei prodotti vegetali (conservas, succhi ecc.) e animali (formaggio, burro, salumi ecc.) che permette di elevare sensibilmente il valore aggiunto dei prodotti e il reddito netto, pur disponendo di limitate superfici aziendali.

La vendita dei prodotti biologici consente all'imprenditore di realizzare riconoscimenti di prezzo interessanti (10-20%) e a volte doppi rispetto ai prodotti convenzionali. Il canale di commercializzazione preferito è la vendita diretta e quella ai dettaglianti.

L'indagine condotta su 11 aziende biologiche con allevamento bovino ha messo in evidenza la vitalità dell'imprenditore biologico in Alto Adige: a fronte di limitate risorse ed in un ambiente difficile esso è in grado di dare occupazione e reddito soddisfacente agli addetti familiari.

Grazie alla valorizzazione biologica dei prodotti, alla loro trasformazione, alle prestazioni di servizi e ai contributi pubblici l'imprenditore riesce a realizzare una produttività media di quasi 8 milioni di lire per ettaro SAU e di ottenere un reddito netto per unità lavoratrice familiare di 38 milioni di lire, il che non è poco. Se a questo aggiungiamo gli apporti di reddito del lavoro part-time, abbastanza diffuso in loco, si creano le condizioni favorevoli per la permanenza in azienda degli addetti e la continuazione dell'attività agricola.

La scelta dell'agricoltura ecocompatibile in Alto Adige è fortemente motivata da scelte culturali e dalla prospettiva di ottenere alimenti di qualità, sani e genuini ai quali si approvvigiona anche il nucleo familiare.

La valorizzazione dei prodotti biologici è prevalentemente legata a nicchie di mercato, mentre risulta carente l'organizzazione mercantile, anche se alcune Associazioni biologiche cercano di supplire con l'aggregazione dell'offerta dei propri aderenti.

In conclusione nelle aree di montagna, come in Alto Adige, la scelta dell'agricoltura ecocompatibile può rappresentare una delle soluzioni più interessanti, non necessariamente l'unica, per permettere agli addetti rimasti di ottenere un reddito soddisfacente e assicurare la presenza umana sul territorio quale presidio alla salvaguardia degli equilibri ambientali a favore di tutta la comunità.

Parole chiave: Alto Adige, zootecnia biologica, economia.

Key words: : Alto Adige, organic zootechnology, economics

Schlüsselworte: Südtirol, biologische Viehzucht, Wirtschaft.

RIASSUNTO - L'agricoltura biologica è in rapida diffusione grazie alla maggiore sensibilità del consumatore verso i prodotti alimentari più salubri e di qualità per i quali è disposto a corrispondere prezzi più elevati. L'Unione Europea ha riconosciuto la validità ambientale di questo nuovo modo di produrre predisponendo una regolamentazione specifica di sostegno con finanziamenti pubblici per un'agricoltura ecocompatibile.

In Alto Adige si è sempre avuto un occhio di riguardo per un'agricoltura rispettosa dell'ambiente. Con l'attuazione dei regolamenti comunitari sull'agricoltura ecocompatibile si è voluto accentuare l'intervento preferibilmente nelle zone di montagna, quelle più a rischio di degrado ambientale e di abbandono del territorio. La produzione di foraggi e l'allevamento del bestiame sono le sole attività praticabili in aree di montagna. Una possibilità di valorizzare i prodotti zootecnici viene offerta dal metodo biologico di produzione. L'indagine su un gruppo di allevamenti bovini con produzione biologica in Alto Adige ha messo in evidenza la possibilità di elevare il reddito delle aziende, nonostante la ristrettezza della maglia aziendale. Ciò è possibile grazie al maggior riconoscimento di prezzo sui prodotti e agli incentivi finanziari pubblici di sostegno all'agricoltura ecocompatibile.

Ne viene avvantaggiata l'agricoltura di montagna con la permanenza di addetti sul territorio e la salvaguardia dell'ambiente, con vantaggi per tutta la collettività.

SUMMARY - *Some economic aspects of organic zootechnology in Alto Adige.*

Organic agriculture is spreading rapidly because consumers are better informed about food products that are more wholesome and of better quality, but which also cost more. The European Union has recognized the environmental value of this new kind of production and has set out specific regulations with public financial aid in support of environmentally friendly agriculture.

The people of Alto Adige have always had an interest in farming methods which respect the environment. With the activating of European Community regulations concerning environmentally friendly agriculture, emphasis has been placed on the best type of intervention to be applied in mountain regions, where there is the greatest risk of environmental degradation and abandoning of the land.

The production of fodder and the breeding of livestock are the only activities that can be practised in the mountains. The possibility of exploiting zootechnological products is offered by organic production methods.

The study of a group of organic production cattle farms in Alto Adige has highlighted the possibility of increasing the profits of farms, despite their small size. This is possible because of the high price of the product and the public financial support given to environmentally friendly farming.

Policies have been designed to favour mountain farming with workers remaining in the area and respect being shown for the environment, with advantages for all involved.

ZUSAMMENFASSUNG - *Einige ökonomischen Aspekte der biologischen Viehzucht in Südtirol.*

Die biologische Landwirtschaft erfährt dank der steigenden Nachfrage des Verbrauchers nach gesünderen Qualitätslebensmitteln einen großen Aufschwung. Der Verbraucher ist auch bereit, für diese Produkte einen höheren Preis zu zahlen. Die Europäische Union hat den Nutzen dieser neuen Landwirtschaft für die Umwelt anerkannt und hat spezielle Richtlinien und Gesetze zur Förderung und Unterstützung mit öffentlichen Mitteln für eine umweltfreundliche Landwirtschaft verabschiedet.

In Südtirol wurde der umweltverträglichen Landwirtschaft schon immer große Bedeutung beigemessen. Mit der Umsetzung der EU-Richtlinien bezüglich der umweltverträglichen Landwirtschaft sollten insbesondere die bergigen Gebiete gefördert werden, da die Landwirte sich immer mehr aus diesen Gebieten zurückziehen und diese Gebiete somit besonders stark umweltbedingten geologischen Folgeschäden ausgesetzt sind.

Die Futtermittelproduktion und die Viehzucht sind die einzigen Tätigkeiten, die im bergigen Gebiet Südtirols ausgeübt werden können. Die biologischen Produktionsverfahren stellen eine Möglichkeit dar, den Absatz der Landwirtschaftsprodukte zu fördern.

Bei einer Untersuchung von biologischen Rinderzuchtbetrieben in Südtirol wurde festgestellt, daß das Einkommen dieser Betriebe durch die Anwendung biologischer Zuchtverfahren erhöht werden konnte, obwohl es sich um kleine Betriebe handelt. Dies ist dem höheren Verkaufspreis und der Förderung der umweltverträglichen Landwirtschaft mit öffentlichen Mitteln zuzuschreiben. Durch der Förderung der umweltverträglichen Landwirtschaft werden die Landwirte in die Lage versetzt, ihre Tätigkeit weiter ausüben zu können und sind nicht mehr gezwungen, ihren Boden aufzugeben, was im Endeffekt den Umweltschutz gewährleistet und somit der gesamten Gemeinschaft zu Gute kommt.

## Bibliografia

- 1) AA. VV. (1999). Tutto Bio '99 - Guida completa al biologico. Distilleria EcoEdi-toria, Forlì.
- 2) ACCADEMIA DEI GEORGOFILI (1989). Agricoltura biologica: il senso, la realtà, i problemi. Firenze.
- 3) ANSALONI F., SALGHETTI A. (1996). Latte biologico e derivati: l'organizzazione della filiera. Rivista di Economia Agro-alimentare, n.1, 147-169, SIEA.
- 4) BARTOLA A., POLLASTRI F., ZANOLI R. (1990). L'agricoltura biologica: produzione di qualità nel rispetto dell'ambiente. Il caso dell'Emilia-Romagna. Rivista di Economia Agraria, n. 3, INEA- Il Mulino.
- 5) BERNI P., FABBRIS (1996). L'agricoltura biologica nel Veneto: aspetti economico-sociali e comportamenti d'impresa. (a cura di), Istituto di Economia e Politica Agraria, Università di Verona. Pubblicazione RAISA-CNR, n. 2423, Arcadia Ed., Modena.
- 6) CESARO L., ROSSETTO L. (1999). Applicazione del Regolamento 2078/92 nella Provincia di Bolzano. Valutazione Socioeconomica e strutturale (a cura di). INEA, Osservatorio di Economia Agraria per il Veneto e Trentino Alto Adige, Padova.
- 7) CHIRONI G. (1995). Filiere atte allo sviluppo di aree collinari e montane: il caso dell'agricoltura biologica. (a cura di), Dip. di Economia, Ingegneria e Tecnologie Agrarie, Settore Economia, Università degli Studi di Palermo. Pubblicazione RAISA-CNR, n. 2218.
- 8) DEL FABRO A. (1990). L'agricoltura biologica in Italia: le strutture produttive. In "Agricoltura e Innovazione", n. 12-13.
- 9) FOTI S., STURIALE C. (1993). Aspetti e problemi economici e normativi dell'agricoltura biologica: quali prospettive? Rivista di Economia Agraria, n. 4, INEA-II Mulino.
- 10) GREGORI M., PRESTAMBURGO M. (1996). Produzioni biologiche ed adattamenti d'impresa. F. Angeli, Milano.
- 11) KAISERMANN F. (1994). Zootecnica biologica in ambienti montani. In "Bio-agricoltura", n. 31.
- 12) LAMPKIN N.H. (1994). Organic farming: Sustainable Agriculture in Practice. In "The Economics of Organic Farming". (Edited by Lampkin N. H. - Padel S.), CAB International, Wallingford, UK.
- 13) LONGIARDI A. (1993). Disciplina del metodo di produzione biologico e tutela del consumatore. In "L'Informatore Agrario", n. 38.

- 14) MONTANARI E. (1995). Il cammino dell'agricoltura biologica in Italia. In Atti del Convegno "Stato attuale e prospettive delle produzioni alimentari biologiche in Italia". In "Parma Economica", n. 4. C.C.I.A.A., Parma.
- 15) PROVINCIA AUTONOMA DI BOLZANO (1998). Relazione agraria e forestale.
- 16) ROMANO M. (1989). Agricoltura biologica e convenzionale a confronto. In "Demetra", n. 11.
- 17) SALGHETTI A. (1995). Le produzioni biologiche di origine animale. In "Parma Economica", n. 4. C.C.I.A.A., Parma. Pubblicazione RAISA-CNR, n. 2420.
- 18) SALGHETTI A. (1997). Produzioni biologiche e convenzionali negli allevamenti bovini. Università degli Studi di Parma, Istituto di Economia rurale e zoeconomia. Pubblicazione RAISA-CNR, n. 3010.
- 19) SALGHETTI A. (1998). Agricoltura biologica e territorio. In Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Vol.XVII, Parma, 145-163.
- 20) SANSAVINI S., WOLLESEN J. (1992). Le potenzialità ed i limiti dell'agricoltura biologica. In "Terra e Vita", n. 9.
- 21) SANTUCCI F.M. (1994). Confronto tra aziende biologiche e convenzionali in Umbria. In "Bioagricoltura", n. 31.

# INDAGINE SUI RAPPORTI TRA CARATTERISTICHE DELLA RAZIONE, TENORE DI UREA NEL LATTE ED EFFICIENZA RIPRODUTTIVA NELLE BOVINE DA LATTE

Superchi P., Sabbioni A., Bonomi A., Barone S. <sup>1</sup>

*(<sup>1</sup>) Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma. Direttore : Prof. Alberto Bonomi.*

Le ricerche sono state condotte con il contributo finanziario del MURST (fondi locali per la ricerca).

## Introduzione

E' ormai ampiamente riconosciuto che i problemi riproduttivi nella specie bovina sono da imputare, almeno nel 50% dei casi, ad errori alimentari riconducibili ad eccessi o difetti a carico dei vari principi nutritivi apportati, nonché ad una irrazionale somministrazione degli alimenti o all'impiego di prodotti igienicamente non idonei (Cappa, 1979; Bonomi,1990).

Gli effetti si evidenziano soprattutto nei primi due tre mesi dopo il parto, allorquando la richiesta di nutrienti continua ad aumentare in relazione alla elevata produzione di latte, mentre la capacità di ingestione non è tale da consentire la copertura dei fabbisogni (Sali, 1996; Bonomi,1990).

In tale situazione la bovina è costretta a mobilitare le proprie riserve organiche, le quali vengono primariamente utilizzate per le funzioni che garantiscono la sopravvivenza, secondariamente per la produzione di latte e infine per quelle funzioni, tra cui quella riproduttiva, cui vengono destinate quote residuali di nutrienti spesso sotto dimensionate rispetto alle effettive necessità (Formigoni, 1996; Bonomi,1990).

Dato che la ripresa dei cicli estrali e l'ingravidamento, come precedentemente affermato, non sono prioritari si spiega l'antitesi che insorge fra produzione di latte e fertilità (Bauman e Currie,1980).

La ragione di ciò non è stata ancora completamente chiarita, ma si ritiene che dopo la nascita del vitello l'elevata richiesta di principi glucogenetici ed aminogenetici per la produzione del latte esiti in un insufficiente apporto degli stessi per il normale sviluppo dei follicoli primari (Tamminga,1998); a complicare la situazione concorrono poi le profonde modificazioni del quadro endocrino e metabolico che caratterizzano le bovine nel peripartum (Chiesa et al,1991).

In linea generale, si può affermare che gli errori di natura alimentare in grado di influire sulla riproduzione possono riguardare l'apporto di energia, di proteine, di minerali, di vitamine, nonché la quantità ed il tipo di fibra (Bonomi,1994).

In particolare, alla riduzione della fertilità viene spesso associato l'eccessivo apporto proteico nelle prime fasi della lattazione, sulla base del presupposto che le elevate quantità di ammoniaca, che devono venire detossificate dal fegato, causerebbero un danno epatico che, a sua volta, interferirebbe con altre funzioni associate alla fertilità (Tamminga,1998).

Secondo alcuni autori (Fergusson e Chalupa,1989; Roseler et al.,1993; DePeters et al.,1992), non tutti gli eccessi proteici sarebbero però causa di tali problemi, ma solo quelli legati ad una presenza elevata nella razione di proteine degradabili che, data la loro fermentescibilità, comporterebbero un innalzamento repentino nel rumine e nel sangue di  $\text{NH}_3$  e, conseguentemente, di urea. Howie (1988), citato da Bertoni (1995b), ritiene che il normale trofismo dell'utero e la regolare liberazione pulsatile dell'LH, sarebbero negativamente influenzati dalla concentrazione di tali composti azotati in circolo.

A livello uterino si determinerebbe inoltre una riduzione del pH ed una alterazione delle caratteristiche del fluido (Jordan et al, 1983; Eroid e Butler, 1993; Eroid et al.,1993) mentre a livello plasmatico, una caduta della concentrazione di progesterone (Jordan e Swanson,1979; Sondermann e Larson, 1989) .

Parimenti importante nei riflessi dell'efficienza riproduttiva deve essere visto anche il difetto di proteine nella razione accompagnato da bassi valori di urea nel latte. A tal proposito, le ricerche condotte da Gustafsson e Carlsson (1993), confermate da Calamari et al. (1996), hanno rilevato che già a valori di urea inferiori a 21-23 mg/100 ml si avrebbe un aumento dell'intervallo parto-concepimento.

Sulla scorta di tali considerazioni e dato il rilievo che il problema della scarsa efficienza riproduttiva riveste anche nella provincia di Bolzano, abbiamo voluto mettere in relazione alcuni parametri della dieta con il tenore di urea del latte e verificarne gli effetti sull'efficienza riproduttiva di bovine allevate in questo comprensorio.

## *Materiale e metodi*

Allo scopo sono state prese in considerazione 197 bovine da latte, allevate presso 11 aziende diverse per condizioni manageriali e situate nel comune di Verano (BZ).

Per poter caratterizzare ciascun allevamento da un punto di vista tecnico-manageriale, è stata stilata per ciascuno di essi, una scheda informativa, che ha fornito le risultanze riportate nelle tabelle 1 e 2.

Tab. 1 - Principali caratteristiche delle aziende sottoposte a controllo.

Azienda n.	Bovine in lattazione				
	razza	n. capi	ordine di parto	giorni medi di lattazione	distribuzione alimenti
1	F	7	2.4	159	tradizionale
2	B	19	2.5	174	“
3	B+F	20+6	3.1	154	“
4	B	12	2.7	169	“
5	P	12	3.4	168	“
6	B	21	3.0	169	trad.+autoalim.
7	F	16	3.0	177	tradizionale
8	B	20	2.6	173	“
9	F+G	8+11	2.2	130	“
10	F	31	2.6	176	trad.+autoalim.
11	F	14	2.7	177	tradizionale
Media ± d.s.		18 ± 7	2.8 ± 0.4	166±14	

LEGENDA F= Frisone italiana; B= Bruna; P= Pezzata rossa italiana; G= Grigio alpina.

Tab. 2 Caratteristiche chimico-nutritive delle razioni.

Azienda n.	Razioni			
	UFL Kg/s.s.	PG Kg/s.s.	s.s. capo/d	F/C
1	0.70	12.19	16.01	64.77
2	0.68	15.00	20.00	71.00
3	0.71	15.48	19.62	62.64
4	0.64	12.25	17.35	70.53
5	0.69	13.94	16.60	64.47
6	0.64	14.10	16.83	71.35
7	0.63	13.60	22.87	69.08
8	0.63	13.04	18.85	67.38
9	0.64	13.47	15.77	67.26
10	0.66	15.60	20.01	67.02
11	0.70	12.57	18.50	62.20
media ± d.s.	0.67±0.03	13.81±1.14	18.40±2.15	67.06±3.25

Dall'esame della tabella 1, è possibile osservare che il campione di bovine considerato è risultato piuttosto eterogeneo dal punto di vista della componente genetica, essendo esso rappresentato prevalentemente dalle razze Bruna (46%) e Frisone italiana (42%) e solo in minima parte da Pezzata rossa italiana (6%) e Grigio alpina (6%).

Gli animali, allevati in stabulazione fissa, sono stati alimentati in modo tradizionale e solo in due aziende è stata prevista la presenza degli autoalimentatori a programmazione individuale. Le razioni somministrate, le cui caratteristiche chimico-nutritive sono riportate in tabella 2, sono state formulate ricorrendo all'impiego di insilati d'erba, di fieni di prati polifiti e di mangimi complementari del commercio, addizionati, in taluni casi, con farina di mais.

Il calcolo delle caratteristiche chimico-nutritive (apporto in sostanza secca, protidi grezzi e UFL) delle razioni è stato stimato sulla scorta della quantità di alimenti distribuita e delle caratteristiche degli alimenti impiegati, avvalendosi delle analisi di ordine chimico effettuate sui diversi alimenti.

I controlli produttivi e riproduttivi negli allevamenti hanno avuto inizio nel mese di gennaio del 1996 e sono terminati nel mese di aprile del 1998.

Eventuali variazioni effettuate nel corso del periodo sottoposto ad indagine, soprattutto per quanto riguarda il regime alimentare adottato, sono state annotate.

Per la raccolta dei dati, effettuata con cadenza mensile, e, solo in alcuni periodi dell'anno, bimestrale, ci si è avvalsi della collaborazione dei tecnici dell'APA di Bolzano.

Per ogni bovina, presente in azienda, si sono valutati: l'ordine di parto, la produzione giornaliera di latte (ottenuta dal controllo della mungitura della sera e di quella del mattino successivo), la distanza in giorni dal parto, gli intervalli parto/1a fecondazione e parto/concepimento, nonché il n. di interventi occorsi per ottenere la gravidanza.

Sui campioni di latte individuale, prelevati in corrispondenza dei vari controlli funzionali, sono stati determinati il tenore di urea (tecnica della pHmetria differenziale), di grassi, di proteine e di lattosio, mediante letture nel medio infrarosso (IR) con Milko-Scan (Biggs,1978), nonché il contenuto di cellule somatiche con apparecchio Fossomatic (Schmidt Madsen,1975).

Per poter valutare gli effetti del contenuto di urea nel latte sull'efficienza riproduttiva, si è tenuto in considerazione il tasso di urea rilevato in occasione dell'ultimo prelievo effettuato prima della data corrispondente al 1° intervento fecondativo oppure di quello effettuato entro il 90° giorno dal parto.

I dati raccolti sono stati sottoposti ad ANOVA e, fra le singole variabili, sono stati stimati i coefficienti di correlazione semplice, nonché le regressioni multiple, utilizzando come variabile dipendente l'urea e come variabili indipendenti alcune caratteristiche chimico-nutritive delle razioni.

## Risultati e discussione

Il latte prodotto, risultato mediamente pari a 23,57 kg/capo/d (tabella 3), ha denunciato un tenore di urea (24,90 mg/100 ml) che, se confrontato con gli intervalli ottimali di riferimento riportati da Bertoni (1995a) (25-33 mg/100 ml), si pone al limite inferiore della zona di tolleranza. Tale valore sarebbe da interpretare, sempre secondo l'Autore, come la conseguenza di un eccesso di energia associato ad una carenza proteica nella razione. Nel nostro caso, risultando difficile ipotizzare perlomeno un eccesso energetico, dal momento che il rapporto foraggi/concentrati si pone intorno a valori di 70, sembra logico pensare che esso sia piuttosto il frutto di una risposta da parte dell'animale all'impiego, in larga misura, di una base foraggera con caratteristiche tipiche delle zone di montagna oppure alla presenza nella dieta di proteine a ridotta fermentescibilità ruminale.

Tab. 3 - Caratteristiche quanti-qualitative del latte prodotto.

Azienda n.	Razza	Produzione latte		Caratteristiche del latte				
		al giorno kg/capo	a 305 d q/capo	urea mg/100 ml	grasso %	proteine %	lattosio %	cellule X 1000
1	F	22.7	66.59	21.3	3.8	3.0	4.9	62
2	B	24.0	75.02	26.0	4.0	3.7	5.0	126
3	B+F	30.3	86.39	27.6	4.1	3.6	5.1	129
4	B	17.9	56.98	25.6	4.3	3.8	5.1	152
5	P	21.6	75.98	26.5	4.4	3.5	4.9	212
6	B	23.2	69.48	23.3	4.2	3.7	5.1	101
7	F	24.3	73.15	24.0	3.8	3.2	4.9	126
8	B	25.2	77.40	25.8	4.3	3.5	4.9	244
9	F+G	17.4	47.82	20.6	3.9	3.3	5.1	42
10	F	26.2	81.50	27.4	4.3	3.4	4.8	364
11	F	26.5	88.69	25.8	4.5	3.2	4.9	382
media ± d.s.		23.6±3.7	69.85±9.13	24.9±2.3	4.2±0.2	3.4±0.3	4.9±0.1	176±113

LEGENDA F= Frisone italiana, B= Bruna, P= Pezzata rossa italiana, G= Grigio alpina.

Purtroppo la mancanza di analisi certe sulla qualità delle proteine apportate non ci ha permesso di approfondire tale aspetto e di confermare o meno l'importanza che la degradabilità e la solubilità delle stesse possono avere nel condizionare i valori di urea (Roseler et al., 1993).

Contrariamente a quanto riportato in bibliografia (Mariani,1974; Carlsson et al.,1995), sono emerse, tra le razze, variazioni significative ( $P<0,01$ ) nel contenuto di urea (tabella 4); in particolare, i valori più elevati sono stati registrati nel latte della Bruna (27,09 mg/100 ml) e i più bassi in quello della Grigio alpina (21,16 mg/100 ml).

Tab. 4 Influenza della razza sulla produzione di latte e sul tenore di urea nel latte.

		Bruna	Frisona italiana	Grigio alpina	Pezzata rossa it.	DSR
Produzione di latte	kg/d	24,43 ab	25,73b	15,14a	21,56ab	7,71
Tenore di urea	mg/100 ml	27,09B	25,64AB	21,16A	26,53B	5,73

- a,b diversi per P<0,01.  
- A,B diversi per P<0,05.

Come si evince dall'esame della tabella 5, esiste un rapporto diretto e di segno positivo (P<0,01) tra la quantità di latte prodotto ed il tenore di urea. Tali risultanze, che sono apparentemente in disaccordo con quanto riportato da Piccoli Cappelli (1995), possono trovare giustificazione nella diversa potenzialità produttiva degli animali considerati. I più bassi tenori di urea, riscontrati dall'Autore, in soggetti ad elevata produzione lattea rispetto a quelli a media o bassa capacità produttiva, sono verosimilmente la conseguenza di uno stato metabolico ben preciso (più bassa insulinemia e cortisololemia) che consente ai primi di ricorrere maggiormente ai lipidi di riserva piuttosto che alle proteine per sopperire alle carenze energetiche.

Tab. 6 Influenza delle caratteristiche della razione sul tenore di urea nel latte (mg/100 ml).

	Consumo s.s. Kg/d		UFL/kg s.s.		PG % s.s.		Rapporto Foraggi/Concentrati		DSR
	< a18,4	≥ a18,4	< a 0,67	≥ a 0,67	< a 13,8	≥ a 13,8	< a 67	≥ a 67	
Urea	26,36	25,96	26,41	26,07	25,48a	27,01b	26,20	26,16	5,59

- a,b diversi per P<0,05.

Tra i fattori estrinseci all'animale, il piano alimentare adottato si conferma una delle fonti maggiormente in grado di influenzare il valore di urea nel latte (tabella 5) che, così come emerso da indagini precedentemente svolte (Dirkens,1992; Carlsson e Peherson,1994; Savoini et al.,1996; Tedesco et al.,1998), è risultato positivamente correlato al consumo volontario di sostanza secca (P<0,01) e all'apporto di proteina grezza espresso in % sulla s.s. (P<0,05).

Non altrettanto chiare sono risultate invece le correlazioni con l'apporto energetico della razione; infatti, mentre il coefficiente relativo al rapporto foraggi/concentrati, risultato negativo (P<0,1), starebbe ad indicare che all'aumentare dell'energia apportata aumenterebbe il risparmio gluconeogenetico degli aminoacidi, nessuna correlazione significativa si è avuta tra le UFL/kg s.s. e l'urea nel latte.

Nonostante ciò, non si può escludere che la densità energetica della razione assuma un certo peso nel determinismo del fenomeno, tanto è vero che, sottoponendo i dati all'analisi della regressione multipla, secondo la procedura stepwise, essa viene introdotta nella equazione di stima del valore di urea nel latte in base alle caratteristiche della razione:

$$\text{UREA (mg/100ml)} = 30,78032 + 1,88313 \cdot \text{SS} - 74,7087 \cdot \text{UFL} + 0,33471 \cdot \text{PG} - 1,4 \times 10^{-3} \text{SS}^3 + 53,268681 \cdot \text{UFL}^3 \quad (R^2 = 0,52)$$

dove: SS in kg/d, UFL in n./kg s.s., PG in % s.s..

Le apparenti incongruenze circa l'influenza esercitata dalle caratteristiche della razione sul tenore di urea nel latte, appena riportate, si osservano anche sottoponendo i dati all'analisi della varianza, suddividendo i parametri considerati in due classi (minore o maggiore rispetto alla media generale). Dall'esame della tabella 6, si evince, infatti, che solo il tenore di PG (% s.s.) si configurerebbe come elemento capace di modificare tale valore, in modo statisticamente significativo (P<0,05).

Tab. 6 Influenza delle caratteristiche della razione sul tenore di urea nel latte (mg/100 ml).

	Consumo s.s. Kg/d		UFL/kg s.s.		PG % s.s.		Rapporto Foraggi/Concentrati		DSR
	< a18,4	≥ a18,4	< a 0,67	≥ a 0,67	< a 13,8	≥ a 13,8	< a 67	≥ a 67	
	Urea	26,36	25,96	26,41	26,07	25,48a	27,01b	26,20	

- a,b diversi per P<0,05.

Tuttavia, come riportato in tabella 7, in cui l'analisi statistica è stata effettuata suddividendo il campione in quattro classi in base all'apporto energetico e proteico, la risposta da parte dell'animale è comunque vincolata all'interazione fra contenuto energetico e proteico della razione. In particolare, si conferma quanto riportato in bibliografia (Peyraud,1989; Dirksen,1992), cioè che in presenza di più elevati livelli di proteina, solo un adeguato apporto energetico riesce ad evitare l'eccessivo catabolismo proteico che si verifica invece in presenza di razioni a basso contenuto energetico (P<0,05).

Tab. 7 Influenza della densità energetica (UFL/kg s.s.) e della PG (% s.s.) sul tenore di urea nel latte (mg/100 ml).

	BE-BP	BE-AP	AE-BP	AE-AP	DSR
Urea	24,76a	28,60b	25,84a	26,33ab	5,59

- a,b diversi per P<0,05.

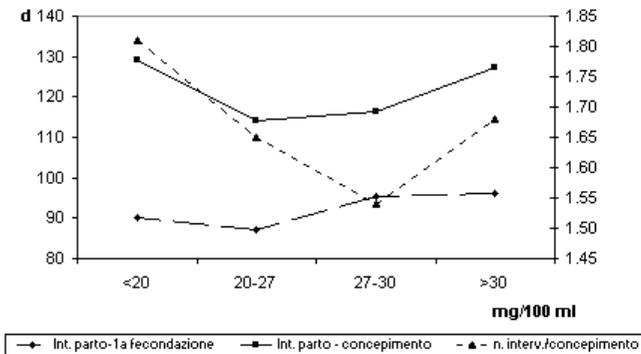
LEGENDA: BE – Bassa energia; AE – Alta energia; BP – Bassa proteina; AP – Alta proteina.

Circa le possibili relazioni, da più parti invocate, tra l'aumento o la riduzione dell'urea nel latte e la comparsa di una scarsa fertilità nelle vacche, non è stato possibile mettere in evidenza alcuna differenza statisticamente significativa (P>0,05) anche se come emerge dall'esame della tabella 8, in cui i parametri riproduttivi vengono analizzati in rapporto a diverse classi di urea nel latte, si osserva un tendenziale peggioramento dei parametri riproduttivi al di sopra di 30 mg/100 ml e al di sotto di 20 mg/100 ml (grafico 1).

Tab.8 Influenza del tenore di urea (mg/100 ml) nel latte sui parametri riproduttivi.

	Urea <20	Urea da 20,1 a 27	Urea da 27,1 a 30	Urea > 30	DSR
Intervallo parto/1*fecond. d	90,03	87,31	95,45	96,29	34,11
Intervallo parto/concepimento d	129,29	114,28	116,54	127,09	59,55
n.interventi/concepimento	1,81	1,65	1,54	1,68	1,17

**Grafico 1 - Influenza del tenore di urea (mg/100 ml) nel latte sui parametri riproduttivi**



## Conclusioni

Le risultanze ottenute, che confermano in linea di massima quelle scaturite da analoghe indagini condotte da Calamari et al. (1995), non ci permettono di trarre conclusioni definitive circa il significato che in questi ultimi anni si è voluto dare al tenore di urea nel latte quale strumento indicativo di turbe metaboliche e/o riproduttive nella specie bovina.

Resta comunque il fatto che la sua determinazione, oltre a rappresentare uno dei mezzi che si hanno a disposizione per verificare l'adeguatezza della razione alle esigenze degli animali allevati, può acquistare un particolare significato se tale parametro viene valutato in rapporto alla specificità delle singole aziende, determinate non solo dalle prerogative genetiche degli animali allevati ma anche e, soprattutto, dalle modalità di gestione.

Ciò vale, in modo particolare, nella realtà della zona in cui abbiamo operato, dove per esigenze pedologiche ed ambientali e, bene spesso, per scarsa managerialità degli allevatori, il tenore di urea, sia esso in eccesso o in difetto, può essere l'espressione di errori anche grossolani.

Gli interventi alimentari da adottare, per mantenere a livelli ottimali tale parametro, dovranno prevedere, come punto di partenza, una maggior conoscenza della composizione chimica della razione, con particolare riferimento ai foraggi utilizzati (nel nostro caso frequentemente di scarsa qualità) e alla frazione proteica ed essere tali da favorire i processi ruminali di degradazione-sintesi proteica, al fine di garantire sia una corretta disponibilità di energia, in modo che i tessuti e l'intero organismo non siano costretti ad accentuare i fenomeni catabolici, sia una adeguata quota aminoacidica intestinale, proveniente dalle forme proteiche degradabili e non, che sia tale da non creare uno squilibrio tra possibilità teorica di sintesi proteica e disponibilità di aminoacidi limitanti.

**RIASSUNTO** - Per verificare i rapporti esistenti tra tenore di urea nel latte, alcuni parametri della dieta (apporto di S.S., PG, UFL) ed efficienza riproduttiva (intervallo parto/1a fecondazione, parto/concepimento, n. interventi/concepimento), è stata condotta un'indagine (gennaio 1996-aprile 1998) su 197 bovine appartenenti alle razze: Bruna (46%), Frisona italiana (42%), Pezzata rossa italiana (6%) e Grigio alpina (6%), allevate presso 11 aziende situate nel Comune di Verano (BZ).

Il piano alimentare adottato si conferma una delle fonti in grado di influenzare il tenore di urea nel latte che è risultato positivamente correlato al consumo volontario di sostanza secca e alla PG (% s.s.) ( $P < 0,05$ ); nessuna correlazione significativa si è invece avuta con le UFL/kg s.s. ( $P > 0,05$ ). Nonostante ciò, non si può escludere il ruolo che la densità energetica della razione svolge nel determinismo del fenomeno, anche perché essa viene introdotta nella equazione di stima del valore di urea nel latte in base alle caratteristiche della dieta:

$$\text{UREA (mg/100ml)} = 30,78032 + 1,88313 \cdot \text{SS} - 74,7087 \cdot \text{UFL} + 0,33471 \cdot \text{PG} - 1,4 \times 10^{-3} \text{SS}^3 + 53,268681 \cdot \text{UFL}^3 \quad (R^2 = 0,52)$$

dove: SS in kg/d; UFL in n./kg s.s.; PG in % s.s.

Per quanto riguarda i parametri riproduttivi, è stato possibile osservare un peggioramento degli stessi, anche se non significativo ( $P > 0,05$ ), quando i valori di urea sono risultati superiori a 30 mg/100 ml ed inferiori a 20 mg/100 ml.

Alla luce delle risultanze ottenute, è possibile ammettere che la determinazione del tenore di urea nel latte non sembra uno strumento indicativo di turbe metaboliche e/o riproduttive, soprattutto se utilizzato in modo assolutistico e generalizzato; esso, oltre a rappresentare uno dei mezzi che consentono di verificare l'adeguatezza della razione alle esigenze degli animali, può acquistare un particolare significato se viene valutato in rapporto alla specificità delle singole aziende, determinate non solo dalle prerogative genetiche degli animali allevati ma anche e, soprattutto, dalle modalità di gestione.

SUMMARY - A SURVEY ON THE RELATIONSHIPS BETWEEN RATION CHARACTERISTICS, UREA CONTENT IN THE MILK AND REPRODUCTIVE EFFICIENCY IN DAIRY COWS. In order to verify the existing relationships between urea content in the milk, some parameters of the diet (d.m., CP, energy intakes) and reproductive efficiency (calving - 1st service and calving - conception interval, number of services per conception), a survey has been lead (from January 1996 to April 1998) on 197 Italian Brown (46%), Italian Friesian (42%), Italian Red Pied (6%) and Alpine Gray (6%) dairy cows reared in 11 farms in the Common of Verano (BZ). The feeding schedule is able to influence the urea content in the milk, that is positively correlated to the voluntary intake of dry matter and to the CP content (% d.m.) ( $P < 0.05$ ); no significative correlation has been shown with the Milk F.U. content (per kg of d.m.) ( $P > 0.05$ ). However, it can't be excluded the role of the energy density of the ration on the determinism of the phenomenon, also because energy has been introduced in the prediction equation of the urea value in the milk from the diet characteristics:

$$\text{UREA (mg/100ml)} = 30,78032 + 1,88313 \cdot \text{SS} - 74,7087 \cdot \text{UFL} + 0,33471 \cdot \text{PG} - 1,4 \times 10^{-3} \text{SS}^3 + 53,268681 \cdot \text{UFL}^3 \quad (R^2 = 0,52)$$

where: d.m. in kg/d; Milk F.U. in n/kg d.m.; PG in % d.m..

It has been possible to observe a worsening of the reproductive parameters, even if not significative ( $P > 0.05$ ), when urea values were above 30 mg/100 ml and below 20 mg/100 ml.

In conclusion it is possible to admit that the determination of the urea content in the milk does not seem a sign of metabolic and/or reproductive disorders, if it is used in absolutist and generalized way; besides representing a means of verifying the adequacy of the ration to the requirements of the animals, it can acquire a particular meaning if it is estimated in relation to the farm characteristics (genetic level of the animals, management).

Nota - Il piano, l'esecuzione delle indagini e le conclusioni spettano in parti uguali agli AA. (Il Direttore: Prof. Alberto Bonomi).

## Bibliografia

- BAUMAN D.E., CURRIE W.B. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of the mechanisms involving homeostasis and homeoresis. *J. Dairy Sci.*, **63**, 1514.
- BERTONI G. (1995a). "Valori di riferimento ed interpretazione dei livelli di urea nel sangue e nel latte. Atti Conv. "L'urea nel latte: cause di variazione, conseguenze per l'animale e mezzi correttivi. M.R.A.A.F. , Tipografia Ceccarelli, Grotte di Castro (VT), 103.
- BERTONI G. (1995b). "Principali conseguenze negative degli inadeguati apporti proteici e relazione con l'urea". Atti Conv. "L'urea nel latte: cause di variazione, conseguenze per l'animale e mezzi correttivi. M.R.A.A.F. , Tipografia Ceccarelli, Grotte di Castro (VT), 113.
- BIGGS D.A. (1978). Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 1015.
- BONOMI A. (1990). I rapporti fra alimentazione ed efficienza produttiva e riproduttiva nelle bovine da latte. *Riv. Sci. Alim.*, **19**, 4, 67.
- BONOMI A. (1994). Alimentazione delle bovine e caratteristiche qualitative del latte. *Riv. Sci. Alim.*, **23**, 1, 87.
- CALAMARI L. (1995). "Le principali cause di variazione del tenore di urea nel sangue e nel latte". Atti Conv. "L'urea nel latte: cause di variazione, conseguenze per l'animale e mezzi correttivi. M.R.A.A.F. , Tipografia Ceccarelli, Grotte di Castro (VT), 81.
- CALAMARI L., BANI P., BERTONI G. (1995). "Risultati di un'indagine di campo sui rapporti fra alimentazione ed urea nel latte". Atti Conv. "L'urea nel latte: cause di variazione, conseguenze per l'animale e mezzi correttivi. M.R.A.A.F., Tipografia Ceccarelli, Grotte di Castro (VT), 125.
- CALAMARI L., MAIANTI M.G., BERTONI G. (1996). Relazione fra fertilità e andamento dell'urea e di altri parametri ematici in lattifere. *Atti Soc. It. di Buiatria*, **28**, 209.
- CAPP A. V. (1979). Alimentazione ed ipofertilità nelle vacche. Atti n° 6- Simposi veterinari Pfizer, 19 maggio - 9 giugno 1979.
- CARLSSON J., BERGSTROEM J., PEHERSON B. (1995). Variation with breed, age, season, yield, stage of lactation and herd in the concentration of urea in bulk milk and individual cow's milk. *Acta Vet. Scand.*, (suppl.1), **36**, 245.
- CARLSSON J., PEHERSON B. (1994). The influence of the dietary balance between energy and protein on milk urea concentration. Experimental trials assessed by two different protein evaluation system. *Acta Vet. Scand.*, **35**, 193.
- CHIESA F., GAIANI R., FORMIGONI A., ACCORSI P.A. (1991). Modificazioni del quadro endocrino e metabolico in bovine da latte ad elevata potenzialità produttiva durante l'asciutta e la lattazione. *Arch. Vet., It.*, **42**, 4, 157.
- DEPETERS E. J., FERGUSON J. D., BAKER L. D. (1992). Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J. Dairy Sci.*, **75**, 3192.
- DIRKSEN G (1992). Control of production disease in dairy cows in a changing agricultural environment . *Proc. VIII Int. Conf. "Production Diseases in Farm Animals"* 24-27 agosto, Berna, 271.
- EROLD C.C., BUTLER W.R. (1993). Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excessruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.*, **71**, 694.
- EROLD C.C., VAN AMBURGH M., BUTLER W.R. (1993). Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J. Anim. Sci.*, **71**, 702.
- FERGUSON J. D., CHALUPA W. (1989). Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **72**, 746.
- FORMIGONI A. (1996). Alimentazione e fertilità nella bovina da latte. *Praxis vet.*, **1**, 9.
- GUSTAFSSON A. H., CARLSSON J. (1993). Effects of silage quality, protein evaluation systems and milk urea content on milk yield and reproduction in dairy cows. *Livestock Prod. Sci.*, **37**, 91.
- JORDAN E.R., CHAPMAN E.T., HOLTAN D.W., SWANSON L.V. (1983). Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **66**, 1854.
- JORDAN E.R., SWANSON L.V. (1979). Serum progesterone and luteinizing hormone in dairy cattle fed varying levels of crude protein. *J. Anim. Sci.*, **48**, 1154.
- MARIANI P. (1974). Osservazioni sul contenuto di urea e di azoto non proteico nel latte di vacca. *Atti SISVET*, **28**, 642.
- PEYRAUD J.C. (1989). Mais fourrage: la dégradabilité au banc des accusés. *Cultivar 2000 Elevages*. n° 242 (suppl. 9), 40.
- PICCIOLI CAPPELLI F. (1995). "Il metabolismo aminoacidico, suo controllo endocrino e la presenza di urea nel sangue". Atti Conv. "L'urea nel latte: cause di variazione, conseguenze per l'animale e mezzi correttivi. M.R.A.A.F. , Tipografia Ceccarelli, Grotte di Castro (VT), 67.
- ROESELER D.K., FERGUSON J.D., SNIFFEN C.J., HERREMA J. (1993). Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk non protein in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **76**, 525.
- SALI G. (1996). Manuale di teriogenologia bovina. Essegivi, Edagricole
- SAVOINI G, BALDI A., CHELI F., SENATORE E., FANTUZ F., BERTOCCHI L., DELL'ORTO V. (1996). Effetti di diverse razioni foraggiere sulla produzione e sulla qualità del latte bovino. *L'Inf. Agrario*, **52**, 35, 75.
- SCHMIDT MADSEN P. (1975). Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk. *J. Dairy Res.*, **42**, 227.
- SONDERMAN J.P., LARSON L.L. (1989). Effect of dietary protein and exogenous gonadotropin-releasing hormone on circulating progesterone concentrations and performance of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **72**, 2179.
- TAMMINGA S. (1998). Fattori nutrizionali che influiscono sulla salute e la fertilità delle bovine da latte. *Large Anim. Rev.*, **4**, 4, 35.
- TEDESCO D., DELL'ORTO V., BALDI A., CHELI F., FERRARI C., PINOTTI L. (1998). Variazione del tenore in urea del latte nei primi 150 giorni di lattazione in bovine Frisone. *Atti SISVET*, **52**, 463.

# MILK PROTEIN POLYMORPHISM: DETECTION AND DIFFUSION OF THE GENETIC VARIANTS IN *BOS* GENUS<sup>1</sup>

P. Formaggioni, A. Summer, M. Malacarne, P. Mariani<sup>2</sup>

(1) The work was supported by the experimental program of the Emilia-Romagna region, with the technical-organising coordination of the Centro Ricerche Produzioni Animali of Reggio Emilia.

(2) *Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione, Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma.*

## Introduction

Studies on the milk protein system have been in progress for more than 100 years, and constituted a rather difficult matter, because of the intrinsic complexity of the subject and because of experimental methods not ever adequate to verify preliminary hypothesis. The improving of the experimental procedures and the introduction of new analytical methods (e.g. new electrophoretic or chromatographic techniques), together with the contributions of sciences in progress like molecular biology, genetics and biochemistry, have lead great benefits to milk protein knowledge.

Milk proteins are usually divided into two great "historical" groups, depending on their behaviour by acidification at pH 4.6. The soluble fraction, named "whey protein", is constituted by several different proteins, the most important ones are  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg). The fraction insoluble, named "whole casein", is constituted of four different native caseins (Cn):  $\alpha$ s1-Cn,  $\alpha$ s2-Cn,  $\beta$ -Cn and k-Cn; these proteins are associated with a variable number of phosphate groups and, in the case of k-casein, with a carbohydrate moiety.

$\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2- and  $\beta$ -caseins, richer of phosphate groups, are distinguishing from k-casein for their more or less marked tendency to "precipitate" in presence of calcium ions. k-casein is constituted of two different moieties with regard to their solubility: one of these (1-105 aa.) is characterised by the presence of hydrophobic residues, the other (106-169 aa.), to which are attached also the carbohydrate groups, manifests a marked hydrophilic nature.

Because of these ampholytic properties, k-casein plays a role of colloid-protector towards the other caseins, and constitutes with them a dispersion in the milk by the formation of micelles; each of these is composed by several thousand molecules of all the four caseins. The micelles maintain the hydrophobic portions protected inside, and expose outside the hydrophilic moieties of the k-casein.

## Genetic polymorphism

The term "genetic polymorphism" defines the fact that each milk protein presents two or more forms genetically determined by autosomal and codominant alleles. The absence of dominance is very useful, because homozygous individuals present in the electropherogram only one variant for each protein, while heterozygous ones both variants, so that the count of the gene frequencies for a population results very easy.

Studies on milk protein polymorphism have been developed with various different finalities; to point out milk protein chemical evolution and find some eventual similarity with other proteins; to verify relationships between different species or breeds; to monitor variations that happen in the time or in the space for a particular animal population; to understand, and this is the most important aim, the biological significance of genetic variants.

Genetic polymorphism, however, has great significance also in applied fields, like zootechnical sciences or dairy industry: in particular the study is focused to clarify eventual associations between genetic variants and production traits, reproduction efficiency and adaptation capacity of the cattle, as well as detection of eventual influences on milk nutritional and technological properties [1]. The relationships between protein genetic types and milk composition and properties have been elucidated by several Authors [2-5]; in particular has been evidenced that milks characterised by B variants of  $\beta$ -lactoglobulin, k-casein and  $\beta$ -casein present a nitrogen composition and/or rennet-coagulation properties that are better with respect to those characterised by A types and, therefore, are more favourable for the cheesemaking.

## Some furthermore remarks

The convention for the nomenclature of the variants for each protein is a progressive alphabetical order corresponding to the chronological order of the discoveries (at the beginning it was also referred to the electrophoretic mobility of the bands). The nomenclature is unified for the four species of *Bos* genus, i.e. *B. taurus* ("common" bovine), *B. indicus* (zebu), *B. grunniens* (yak), *B. javanicus* (banteng of Bali).

Some exceptions are made for the progressive alphabetical nomenclature: sometimes it's difficult to reconstruct the history of some variants, because different variants are named with the same letter or, on the contrary, the same variant had received two different "letters"; there are several variants not well or not still characterised, for which is not known the aminoacid substitution or its position in the molecule.

The term "genetic variant", traditionally used for the coded mature protein, actually is referred indifferently to the mature protein and to the coding gene; how must be considered those cases where the mutation is in a not-coding moiety of the gene (e.g. not-coding exons, introns, 5' and 3' flanking regions)? The coded protein is equal to the common one, but often is synthesised in a quantitatively different way, because the mutation causes a change in a regulatory sequence of the gene. Some of them have been accepted in the official nomenclature (like  $\alpha$ s1-casein G), some other of these are not considered variants in a true sense.

### ***$\alpha$ s1-casein system***

" $\alpha$ s1-casein" consists of one major and one minor component, both with the same aminoacid sequence; the minor component ( $\alpha$ s0-casein) contains one additional phosphate group linked to the serine at position 41. The sequence of  $\alpha$ s1-casein was first established by Mercier *et al.* [6] and Grosclaude *et al.* [7]: the primary structure of the most common variant B consists of 199 aminoacid residues, with a molecular weight of 23,614. The number of acid (7 Asp, 25 Glu, 8 P) residues is higher than that of basic (14 Lys, 6 Arg, 5 His) ones: so the isoelectric point is rather low (4.1-4.5). The high amount of non-polar residues makes the protein rather

hydrophobic, but less than  $\beta$ -casein. The most hydrophilic region is between 45th and 89th residues; here are concentrated most of acid residues and 6 phosphate groups: in  $\beta$ -casein there is a similar disposition [8]. Probably because of its hydrophobic nature, attempts to crystallise  $\alpha$ s1-casein (as been as for the other caseins) have been not successful: therefore, until now, secondary and tertiary structures of this protein are not known. Proline (17 residues) is very diffused and uniformly distributed: this makes less probable the presence of eventual regular secondary structures [9, 10].

**Polymorphism** – In 1962, by starch gel electrophoresis at alkaline pH, Thompson *et al.* [11] demonstrate for the first time a polymorphism for  $\alpha$ s1-casein. The two electrophoretic bands were named A and B, in order of their decreasing mobility: B variant is diffused in all the species; A, instead, is a not common variant, found in Holstein breed; it is characterised by a deletion of 13 aminoacids, from 14 to 26, with respect to the B variant [12]. The deletion of the mature protein arises from a corresponding absence of 39 bp (the entire exon 4) in the mRNA, but not in the gene, as was suggested by McKnight *et al.* [13] and proved by Mohr *et al.* [14]. In fact, the deletion occurs at level of mRNA splicing after transcription, and is correlated with a base substitution at position +6 of the intron 4, in the splice donor sequence distal of exon 4; this mutation gives rise to the exon skipping during the splicing of the A allele mRNA [14]. McKnight *et al.* [13] found also 5 silent mutations in the coding sequence of A variant with respect to Bvariant: all of them consist of C $\rightarrow$ T conversions at level of the third base of the codon, silent mutations that don't change the coded aminoacid. Only three of these mutations regard the mature protein: Pro(2), Ala(163) and Pro(185); the other two are in the region cut away in the post-translational events.

Recently Wilkins and Xie [15] found a mutation in  $\alpha$ s1-Cn A gene, still in intron 4 but in a different position, at +4 instead that +6. This mutation gives rise to the same  $\alpha$ s1-Cn A variant with the deletion of exon 6.

The phenomenon of deletion in protein variants is rare; until now three example are known in *Bos* genus: besides the "historical" ones  $\alpha$ s1-Cn A and  $\alpha$ s2-Cn D, recently Mahé *et al.* [16] found in African Kuri (*B. taurus*) another  $\alpha$ s1-Cn variant with a deletion of 8 aminoacids (51-58: the entire exon 8), named  $\alpha$ s1-Cn H. Further work is necessary to establish the causes, at mRNA and genomic level, that give rise to this deletion.

The principal variants of  $\alpha$ s1-Cn (from A to H), are reviewed in Table 1; the identity of Eyak variant found in *B. grunniens* by Grosclaude *et al.* [19, 20] and EBali found in *B. javanicus* (banteng of Bali) by Bell *et al.* [21] is not well established: the aminoacid substitution of the latter is still unknown.

Table 1 – Discovery and diffusion of the genetic variants of  $\alpha$ <sub>s1</sub>-casein.

Variant	Year	Species (country)	Breeds (frequency)	Methods	Diffusion	Variations with respect to B	References
A	1962	<i>B. taurus</i> (USA)	Holstein Friesian	SGE pH 8.6	Not common Other breeds <sup>(1)</sup>	Deletion 14-26 aa.	Thompson <i>et al.</i> , 1962 [11]
<sup>(2)</sup> B	1962	<i>B. taurus</i> (USA)	Holstein Friesian		All breeds N.f. <i>B. javanicus</i>		Thompson <i>et al.</i> , 1962 [11]
C	1962 1963	<i>B. taurus</i> (USA)	Brown Swiss, Guemsey	SGE pH 8.6	Several breeds All species; very common <i>B. indicus</i>	Glu(192) $\rightarrow$ Gly	Thompson <i>et al.</i> , 1962 [11]; Kiddy <i>et al.</i> , 1963 [17]
D	1966	<i>B. taurus</i> (France)	Flamande (0.04)	SGE pH 8.6 PAGE pH 8.6	Not very common Other breeds <sup>(3)</sup>	Ala (53) $\rightarrow$ Thr P	Grosclaude <i>et al.</i> , 1966 [18]
E <sub>pak</sub>	1974	<i>B. grunniens</i> (Nepal)	(0.35)	SGE pH 8.6	Not common	Glu(192) $\rightarrow$ Gly Gln(59) $\rightarrow$ Lys	Grosclaude <i>et al.</i> , 1974 [19], 1976 [20]
* E <sub>bali</sub>	1981	<i>B. javanicus</i> (Australia)		SGE pH 8.6	Not common		Bell <i>et al.</i> , 1981 [21]
F	1992	<i>B. taurus</i> (Germany)	German Black and White (0.009)	PAGE alkal. pH, IEF	Rare	Ser (66) $\rightarrow$ Leu	Erhardt <i>et al.</i> , 1992 [22]; Erhardt, 1993 [23]
G	1992	<i>B. taurus</i> (Italy)	Italian Brown, Podolian	Endonucleases	Not very common Other breeds <sup>(4)</sup>	None	Rando <i>et al.</i> , 1992 [24], 1993 [25]; Ramunno <i>et al.</i> , 1994 [26]
H	1999	<i>B. taurus</i> (Chad)	Kuri (0.04)	Triptic hydrolysis, IEF, RP-HPLC, MS	Rare	Deletion 51-58 aa.	Mahé <i>et al.</i> , 1999 [16]

\* Still not characterised variant.

<sup>(1)</sup> Observed also in Red Danish [27], Kostroma [28], other Friesian populations [28-32] and recently in German Friesian [33].

<sup>(2)</sup> Reference (most common) variant.

<sup>(3)</sup> Observed also in Red Danish and Red Polish cattle [34], Jersey [35], Italian Brown [36, 37], Reggiana [38], Podolian [39] and other Italian breeds.

<sup>(4)</sup> Observed also in Agerola and Modicana [25, 40, 41] and in Reggiana, Italian Red Pied, Sarda and Bruna-Sarda [42].

SGE: Starch-gel electrophoresis; PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis; IEF: Isoelectric focusing; RP-HPLC: Reversed phase HPLC; MS: Mass spectrometry.

N.f.: Not found.

In 1992, Kawamoto *et al.* [43] found in Nepalese *B. taurus* and *B. taurus* x *B. grunniens* crosses two further alleles of  $\alpha$ s1-casein that they named tentatively X and Y, respectively. In isoelectric focusing X variant migrates between B and C; Y faster than B. No more works were made to furthermore characterise these eventual variants.

A particular emphasis must be reserved to  $\alpha$ s1-Cn G. This "variant", found in Italian Brown and Podolian breeds by Rando *et al.* [24-26], represents an *unicum* in cow milk polymorphism; in fact the mature protein is not different from the common B variant, but is synthesised with a lower amount than  $\alpha$ s1-Cn B. This quantitative major effect is caused by an insertion of 371 bp at level of the 19th (not-coding) exon, exactly between 17281

and 17282 bp of  $\alpha$ s1-Cn B gene [44]. This inserted segment has the typical structure of relicts of long interspersed elements (LINES) of retropositional origin [45]. The bovine  $\alpha$ s1-Cn G allele is the second example of insertion of a genetic mobile element that has a marked effect on the expression of a casein gene; in fact in goat milk was found [46, 47] an analogous allele, named  $\alpha$ s1-Cn E, with an insertion at level of 19th exon, but in another position; the inserted segment, however, has a great homology with that of the cow, and the effects on protein synthesis are the same.

**Diffusion** – The most diffused  $\alpha$ s1-casein variant is B, present in all breeds with a frequency of 90-95% and sometimes of 100%; only in some breeds like Jersey, Guernsey, Normande, Italian Brown, Reggiana and Modenese the frequency is a little lower (75-85%), favouring C variant. In zebu and yak, conversely, allele C is predominant with respect to B, with about 90% of frequency in the first and about 63% in the latter [20]. Surprisingly C variant has an high frequency in Swedish Holstein [48].

$\alpha$ s1-Cn D variant is not very common, but, after Flamande [18], was observed also in Red Danish and Red Polish [34], Jersey [35], Italian Brown [36, 37], Reggiana [38], Podolian [39] and other Italian breeds.

Also for the A allele, after the discovery in Holstein Friesian, other detections were made in Red Danish [27], Kostroma [28], other Friesian strains [28-32] and more recently in German Friesian [33].

$\alpha$ s1-Cn G allele was observed also in other Italian breeds, like Agerolese and Modicana [25, 40, 41] and recently in Reggiana, Italian Red Pied, Sarda and Bruna-Sarda [42].

### **$\alpha$ s2-casein complex**

" $\alpha$ s2-casein" is a family of protein, including  $\alpha$ s2,  $\alpha$ s3,  $\alpha$ s4,  $\alpha$ s6, with the same aminoacid sequence but a different content (13, 12, 11 and 10, respectively) of phosphate groups. The sequence of  $\alpha$ s2-Cn A, the most diffused variant, was first established by Brignon *et al.* [49]. It consists of 207 aminoacid residues, with a molecular weight from 25,150 to 25,390, depending on the relative number of phosphate groups. The presence of 2 cysteins, the scarce amount of proline and a lower hydrophobic nature characterise  $\alpha$ s2 with respect to the other caseins. Its susceptibility to calcium ions in relation to its high phosphorylation degree is higher than that of the other caseins. Two segments (50-123 and 132-207) in the  $\alpha$ s2-Cn peptide chain present a marked homology; this suggests that  $\alpha$ s2 arises from the duplication of a primitive gene [50].

**Polymorphism and diffusion** – Only four variants are known for  $\alpha$ s2-Cn: the first example of polymorphism was evidenced in 1976 by Grosclaude *et al.* [51] in Nepalese *B. taurus* and *B. indicus* populations; in these species both A and B variants were found. In the same paper Grosclaude *et al.* [51] noticed the discovery of a third variant (C) in Mongolian yak.  $\alpha$ s2-Cn C is peculiar of *B. grunniens*, while B variant has never been detected in this species (Table 2).

Table 2 – Discovery and diffusion of the genetic variants of  $\alpha$ s2-casein.

Variant	Year	Species (country)	Breeds (frequency)	Methods	Diffusion <sup>(1)</sup>	Variations with respect to A	References
<sup>(2)</sup> A	1976	<i>B. taurus</i> <i>B. indicus</i> (Nepal)			All species All breeds		Grosclaude <i>et al.</i> , 1976 [51]
* B	1976	<i>B. indicus</i> <i>B. taurus</i> (Nepal)	<i>B. indicus</i> (0.34)	SGE pH 8.6	Less common <i>B. taurus</i> <sup>(2)</sup> <i>B. indicus</i> <sup>(4)</sup> <i>B. grunniens</i>		Grosclaude <i>et al.</i> , 1976 [51]
C	1976	<i>B. grunniens</i> (Mongolia)	(0.23)	SGE pH 8.6	Not common	Glu (33) → Gly Ala (47) → Thr Thr(130) → Ile	Grosclaude <i>et al.</i> , 1976 [51]
D	1976 1978	<i>B. taurus</i> (France)	Montbéliarde (0.011), Vosgienne (0.088)	SGE pH 8.6	Less common Other breeds <sup>(3)</sup>	Deletion 51-59 aa.	Grosclaude <i>et al.</i> , 1976 [51], 1978 [52]

\* Still not characterised variant.

<sup>(1)</sup> Analysis not extended to *B. javanicus*.

<sup>(2)</sup> Reference (most common) variant.

<sup>(3)</sup> In Podolian with frequency 0.004 [39].

<sup>(4)</sup> In South African zebu [52, 53].

<sup>(5)</sup> In German breeds: Gelbovieh, Vorder Wälder, Hinter Wälder, Fleckvieh, Braunvieh [33]; in Finnish Ayrshire [54].

The first evidence of the presence of B variant in Western *B. taurus* breeds was proved by Chianese *et al.* [39] that found this allele in Podolian cattle. No furthermore works were made to individuate the aminoacid substitutions that differentiate B variant from A:  $\alpha$ s2-Cn B is still now a not characterised variant.

The last discovered variant,  $\alpha$ s2-Cn D, found in two French bovine breeds [51, 52], is characterised by a deletion of 9 aminoacids (51-59), corresponding to the entire exon 8. As well as for  $\alpha$ s1-Cn A, the deletion in mRNA is caused by a single point mutation that gives rise to the exon 8 skipping during mRNA splicing. Differently from  $\alpha$ s1-Cn A, the single point mutation (G $\rightarrow$ T) is not located in an intron, but in exon 8 last nucleotide, that represents the 5'-consensus splicing site: this place, by effect of mutation, cannot be recognised [55]. D allele was found also in some German breeds [33] and in Finnish Ayrshire [54].

There are other cases of probable polymorphism for  $\alpha$ s2-Cn, that have not been substantiated by further information. In 1967, for example, Michalak [56] found in Red Danish three individual samples characterised by the complete absence of "bands 1.00 and 1.04", that correspond to the actual  $\alpha$ s2-Cn. Is this possibly the first example of null-allele in cow? No further investigations were made.

In 1979, Merlin and Di Stasio [57] found in Pinzgauer cattle  $\alpha$ s2-Cn bands with a lower mobility in comparison to those of  $\alpha$ s2-Cn A. It is possible that such bands were those of B variant, that in those times seemed to be absent in Western *B. taurus*; also in this case no further investigations were made.

### $\beta$ -casein system

The primary sequence of  $\beta$ -casein has been elucidated by Ribadeau-Dumas *et al.* [58] and Grosclaude *et al.* [7]. This protein consists of 209 residues with a molecular weight of 23,983. Several are the analogies with  $\alpha$ s1-casein: there are not cystein residues, while proline residues are very common; the molecular weight is similar. It shows a marked hydrophobic character and, at room temperature, it is sensitive to calcium ions. There is also an high homology between the sequences of the two proteins; in particular two peptides of eight aminoacids (63-70 for  $\alpha$ s1-casein; 14-21 for  $\beta$ -casein) are very similar [8]. By action of plasmin,  $\beta$ -casein can be cleaved in three different positions, to give rise to the  $\gamma$ -caseins and to their complementary fragments, named proteose-peptones.

**Polymorphism** – Polymorphism of  $\beta$ -casein is quite complex, due to its high genetic variability and to the presence of a large number of cases of not characterised or not well clarified variants. The alphabetical order itself is often not respected. The first evidence of polymorphism in  $\beta$ -casein dates to 1961, when Aschaffenburg discovered, by paper electrophoresis at alkaline pH, three different  $\beta$ -casein bands, named A, B and C, in order of their decreasing mobility [59].

Some years later, Peterson and Kopfler [60] and Kiddy *et al.* [61] demonstrate, by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH, that "A" band was not a unique casein but three different variants, named A1, A2 and A3.

The most important variants of  $\beta$ -casein are reviewed in Table 3; in the table also some not characterised variants are shown, like A', A3Mongolie, B2, and A4 of Bell, because they are now accepted from many Authors [21, 81, 82].

Table 3 – Discovery and diffusion of the genetic variants of  $\beta$ -casein.

Variant	Year	Species (country)	Breeds (frequency)	Methods of discovery	Diffusion	Variations with respect to A <sup>2</sup>	References
<sup>(1)</sup> (A)	1961 1963	<i>E. taurus</i> (UK)	Jersey, Guernsey, Ayrshire, Shortorn, Friesian	PE pH 7.15			Aschaffenburg, 1961 [59], 1963 [62]
<sup>(2)</sup> A <sup>1</sup>	1966	<i>E. taurus</i> (UK)	Jersey, Guernsey, Ayrshire, Holstein, Brown Swiss	PAGE pH 3	Most breeds <i>E. indicus</i>	Pro (67) → His	Peterson & Kopfler, 1966 [60]; Kiddy <i>et al.</i> , 1966 [61]
<sup>(2)</sup> A <sup>2</sup>		<i>E. taurus</i> (UK)	Jersey, Guernsey, Ayrshire, Holstein, Brown Swiss	PAGE pH 3	All species All breeds		Peterson & Kopfler, 1966 [60]; Kiddy <i>et al.</i> , 1966 [61]
A <sup>3</sup>		<i>E. taurus</i> (UK)	Holstein	PAGE pH 3	Not common Other breeds <sup>(2)</sup> <i>E. indicus</i> <sup>(4)</sup>	His (106) → Gln	Kiddy <i>et al.</i> , 1966 [61]
B	1961 1963	<i>E. taurus</i> (UK)	Jersey, Guernsey	PE pH 7.15	Most breeds <i>E. indicus</i> <sup>(1)</sup>	Pro (67) → His Ser (122) → Arg	Aschaffenburg, 1961 [59], 1963 [62]
C	1961 1963	<i>E. taurus</i> (UK)	Guernsey	PE pH 7.15	Less common	Pro (67) → His Glu (37) → Lys Ser P(35) → Ser	Aschaffenburg, 1961 [59], 1963 [62]
D	1968	<i>E. indicus</i> (India & East Africa)	Indian Deshi, East African Boran	SGE alkal. pH	Rare	Ser P(18) → Lys	Aschaffenburg <i>et al.</i> , 1968 [63]
E	1972	<i>E. taurus</i> (Italy)	Piemontese	SGE alkal. pH	Rare	Glu (36) → Lys	Vogliano, 1972 [64]
<sup>(6)</sup> *A'	1975	<i>E. taurus</i> (Japan)	Japanese Brown (0.011)	SGE pH 1.7	Rare		Abe <i>et al.</i> , 1975 [65]
<sup>(7)</sup> *A <sup>3m</sup>	1975	<i>E. taurus</i> (Mongolia)	Mongolian cattle (0.04)	<sup>(8)</sup>	Rare		Grosclaude, 1975 [66]
*B <sup>2</sup>	1975	<i>E. taurus</i> (N. Zealand)		SGE pH 3.5	Rare		Creamer & Richardson, 1975 [67]
*A <sup>4</sup>	1981	<i>E. javanicus</i> (Australia)		SGE pH 3	Rare		Bell <i>et al.</i> , 1981 [21]
(A <sup>4</sup> ) H	1983 1996	<i>E. taurus</i> (Korea)	Korean cattle (0.008)	SGE acid pH	Rare	[Pro (67) → His] <sup>(9)</sup> Arg (25) → Cys	Han <i>et al.</i> , 1983 [68]; Chung <i>et al.</i> , 1995 [69]; Han & Shin, 1996 [70]
F	1991	<i>E. taurus</i> (Netherlands)	Meuse-Rhine-Yssel	RP-HPLC	Not common Other breeds <sup>(10)</sup>	Pro (67) → His Pro (152) → Leu	Visser <i>et al.</i> , 1991 [71], 1995 [72]
A <sup>5</sup>	1993	<i>E. taurus</i> (Norway)	Norwegian cattle	Sequencing of PCR products	Rare	None	Lien & Rogne, 1993 [73]
G	1997	<i>E. taurus</i> (Canada)	Holstein	RP-HPLC, MS	Rare	Pro (67) → His Pro (137) → Leu	Chin & Ng-Kway-Hang, 1997 [74]; Dong & Ng-Kway-Hang, 1998 [75]

\* Still not characterised variant.

<sup>(1)</sup> At alkaline pH, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> and A<sup>3</sup> variants have the same mobility, so, in a first time, appeared as a unique variant, named A.

<sup>(2)</sup> Reference (most common) variants.

<sup>(3)</sup> Found with very low frequency mainly in the Jersey, Friesian, F32 and Guernsey Friesian, Jersey and other Guernsey breeds [33], in Simmental [33] and in

G	1997	(Norway) <i>B. taurus</i> (Canada)	Holstein	PCR products RP-HPLC, MS	Rare	Pro (67) → His Pro (137) → Leu	Chin & Ng-Kway-Hang, 1997 [74]; Dong & Ng- Kway-Hang, 1998 [75]
---	------	--	----------	-----------------------------	------	-----------------------------------	---

\* Still not characterised variant.

(1) At alkaline pH, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> and A<sup>3</sup> variants have the same mobility, so, in a first time, appeared as a unique variant, named A.

(2) Reference (most common) variants

(3) Found with very low frequency in Italian Friesian [76] and German Friesian, Jersey and other German breeds [33], in Simmental [77] and in Grey Alpine [78].

(4) In Sahival [79].

(5) In Hariana [63] and Choa [19]. It was named Bz, but it is identical to B variant.

(6) β-Cn A<sup>1</sup> and β-Cn H(A<sup>1</sup>) are probably the same variant.

(7) A<sup>3m</sup> = A<sup>3</sup><sub>Mongolie</sub>.

(8) Chromatography and triptic hydrolysis: the presence of His-Lys peptide indicates that A<sup>3</sup><sub>Mongolie</sub> is not equal to A<sup>3</sup>.

(9) It is not specified if β-Cn H variant arise from A<sup>1</sup> or A<sup>2</sup>.

(10) Italian Friesian [80].

PE: Paper electrophoresis; PCR: Polymerase chain reaction.

The variant named A<sup>1</sup> was found in 1975 by Abe *et al.* [65] in Japanese Brown cattle; in SGE at pH 1.7 it had a very low mobility. In 1983, Han *et al.* [68] found in Korean cattle (*B. taurus*) a variant, named A4, that seems to be the same as β-Cn A<sup>1</sup>, according to comparisons of measured distances of the electrophoretic migration. On the base of this identity the Authors concluded a "phylogenesis" of Japanese Brown cattle from Korean cattle. They repropose another time this discovery in 1995 [69], in which is precised that β-Cn A4 shows in SGE at acid pH a much slower electrophoretical mobility than β-Cn A3.

In 1996, Han and Shin [70] announced the discovery of β-Cn H variant and its aminoacid substitution. Most likely, also if it is not clearly declared, this is still the same variant that the Authors previously called β-Cn A4: in fact, in starch gel electrophoresis at acid pH, it migrates much slower than the other variants. It is not specified if H variant arises, phylogenetically, from A1 or A2.

The β-Cn A4 variant, that Bell *et al.* [21] found in 1981 in the Australian Banteng (*B. javanicus*), is not probably the same variant as Han's one. In fact, its electrophoretical mobility at acid pH is only slightly lower than that of the A3 variant. Also this variant, until now, has not been characterised.

In 1975, Grosclaude [66] found in Mongolian cattle (*B. taurus*) a variant whose electrophoretical properties were equal to A3 ones; the results of the triptic hydrolysis, however, evidenced a His-Lys dipeptide, that is not present in the β-Cn A3 sequence; it is, therefore, a new genetic variant, named A3Mongolie, whose characteristics are not yet known.

In the same year, Creamer and Richardson [67] discovered in New Zealand the variant B2, with an higher mobility than β-Cn B at pH 5.5, but a lower one at pH 3.5; the Authors suggested that the difference between B and B2 variants could involve a charged group, with a pKa between 5.5 and 8.5; it is more probable that this group is histidine and not a phosphate group [67]. Furthermore works are necessary to characterise it.

Is well established, instead, that Bz variant, that Aschaffenburg *et al.* [63] and Grosclaude *et al.* [19], independently from each other, found in zebu, is not different from the *B. taurus* B variant.

In 1986, Carles [83] evidenced by RP-HPLC a variant with the same electrophoretical mobility of A1, but a different chromatographic behaviour, due to a Pro↯Leu substitution in region 114-169. Some years later Visser *et al.* [71, 72] found with the same analytical method an analogous variant in Meuse-Rhine-Yssel breed, that named β-Cn F. The characterisation showed a Pro↯Leu substitution in position 152, therefore inside the region indicated by Carles. The identity of the experimental methods and substitution and the congruence of the position allowed the Authors to conclude that β-Cn F and β-Cn A1Carles were the same variant.

This fact seemed to be assumed until 1997, when Chin and Ng-Kway-Hang [74] discovered in Holstein another A1-similar variant, named G, by RP-HPLC and MS, still characterised by a Pro↯Leu substitution in position 137, therefore another time inside the Carles' region. Now the question is: A1Carles variant corresponds to β-Cn F or to β-Cn G or, maybe, to neither of them? Since β-Cn region from 114 to 169 includes 9 proline residues, then the conclusion is not easy. The comparison between RP-HPLC spectra for the three cases shows rather similar behaviour, as is expected being the substitution in all the cases the same.

Another particular β-Cn "variant" is A5, found by Lien and Rogne in 1993 [73]; direct sequencing of PCR products showed a silent C↯T mutation in the third position of the codon coding for Pro(110). The mature protein is not different from β-Cn A2; nevertheless this fact it is possible to catalogue A5 in the list of β-Cn variants: it is a "genetic variant" in a literal sense, i.e. at level of the gene.

At least, Merlin and Di Stasio [84], found in Grey Alpine a β-Cn A3 linked to αs1-Cn B and supposed that it could be a new β-casein variant, on the base that in Western cattle the A3 allele is always linked to αs1-Cn C [85]. No further works were made to confirm this hypothesis.

*Diffusion* – A1 and A2 are the most diffused β-casein variants, with a slight prevalence of the latter in most breeds. B variant also is very diffused, but generally with a lower frequency with respect to A1 and A2.

Normande and Jersey breeds have the highest β-casein B frequency values (30-45%), followed by Montbéliarde, Italian Brown, Reggiana, Modenese and Italian Red Pied (10-25%); in most breeds the frequency is near 10%. Also β-casein C is rather diffused, but less than B variant and with low frequency; in yak and zebu, C variant has never been detected.

β-casein A3 is a not common variant, but with very low frequency was found in several breeds: Italian Friesian [76] and German Friesian, Jersey and other German breeds [33], Simmental [77] and Grey Alpine [78]. The other β-Cn variants are rare and detected only in one breed, except β-Cn F that was found also in Italian Friesian [80].

### **k-casein system**

k-casein family consists of a major carbohydrate-free component and several "minor" glycosylated ones, with the same aminoacid sequence but different for the nature and the number of the carbohydrate groups [86]. The primary sequence of the B variant was first determined by Mercier *et al.* [87]; it has 169 aminoacids with a molecular weight of 19,007. There are two cystein residues that can form intra- or inter-molecular S-S

bonds, giving rise to several polymeric forms. These cystein residues, by effect of heating, can form disulphide bonds with free SH of  $\beta$ -lactoglobulin. k-casein is completely soluble in presence of calcium ions. It's the only casein that can be associated with a carbohydrate co-factor; the most common glucides that take part to this complex are galactose, galactosamine and N-acetylneuraminic acid. All k-casein fractions are cleaved by chymosin: the specific attack site of this enzyme is the peptide bond between Phe (105) and Met (106); this cleavage is the first step of the rennet-coagulation process. In a phylogenetic point of view, k-casein represents an exception; in fact, while the other caseins seem to be derived from a common ancestor (they have an high sequence homology), k-casein is quite different from them and is similar to fibrinogen  $\gamma$  of blood serum [88], as can suggest also the affinity of their biological functions.

**Polymorphism** – k-casein was the last of the principal milk proteins for which polymorphism has been detected. In fact only the employment of appropriate substances, such as mercaptoethanol and cystein, able to break S-S bonds and reduce polymers to monomers, allowed to separate two genetic variants, named A and B [89-93] (Table 4).

Table 4 – Discovery and diffusion of the genetic variants of k-casein.

Variant	Year	Species (country)	Breeds (frequency)	Methods	Diffusion	Variations with respect to A or B	References
A, B	1964	<i>E. taurus</i> (Canada)	Holstein	SGE alkal. pH	All species All breeds	A B Thr(136) → Ile Asp(148) → Ala	Neelin, 1964 [90]
		<i>E. taurus</i> (Netherlands)				Schmidt, 1964 [91]	
		<i>E. taurus</i> (Australia)				MacKinlay & Wake, 1964 [89]	
		<i>E. taurus</i> (USA)				Woychuk, 1964 [92] & 1965 [93]	
C	1978 1979 1983	<i>E. taurus</i> (Italy)	Grey Alpine (0.007)	SGE pH 8.6	Less common Other breeds <sup>(1)</sup>	B C Arg(97) → His	Di Stasio & Merlin, 1978 [94], 1979 [78]
			Italian Brown				Mariani, 1983 [95]
B <sup>2</sup>	1987	<i>E. taurus</i> (Russia)		cDNA sequencing	Rare	B B <sup>2</sup> Ile(153) → Thr	Gorodetskij & Kaledin, 1987 [96]
E	1989	<i>E. taurus</i> (Germany)	Angler (0.029), German Red and White (0.023), German Friesian (0.06)	IEF	Not very common Other breeds <sup>(2)</sup>	A E Ser(155) → Gly	Erhardt & Senft, 1989 [97]; Erhardt, 1989 [98]
F	1992	<i>E. taurus</i> (Russia)	Yakut	PCR	Rare	A F Asp(148) → Val	Sulimova <i>et al.</i> , 1992 [99]
F	1996	<i>E. taurus</i> (Finland)	Finnish Ayrshire (<0.001)	IEF	Rare	A F Arg(10) → His	Ikonen <i>et al.</i> , 1996 [54]
G	1995	<i>E. grunniens</i> (Russia)		PCR	Rare	A G Asp(148) → Ala	Sulimova <i>et al.</i> , 1996 [100]
G	1996	<i>E. taurus</i> (Austria, Germany)	Pinzgauer (0.003)	IEF PAGE pH 8.9	Rare	A G Arg(97) → Cys	Erhardt, 1996 [101]
H	Az <sup>(4)</sup> H	1974 1998	<i>E. indicus</i> (Madagascar) <i>E. taurus</i> (Austria, Germany) <i>E. taurus</i> x <i>E. indicus</i> (Namibia)	Triptic hydrolysis SSCP	Not common	A H Thr(135) → Ile	Grosclaude <i>et al.</i> , 1974 [19]
							Prinzenberg & Erhardt, 1998 [102]; Prinzenberg <i>et al.</i> , 1999 [103]
I	1998	<i>E. taurus</i> x <i>E. indicus</i> (Namibia)		SSCP	Rare	A I Ser(104) → Ala	Prinzenberg & Erhardt, 1998 [102]; Prinzenberg <i>et al.</i> , 1999 [103]
A(1)	1999	<i>E. indicus</i> <i>E. taurus</i> x <i>E. indicus</i>	Boran, Boran x N'Dama, Friesian x Sahival	SSCP	Rare	None	Prinzenberg & Erhardt, 1999 [104]; Prinzenberg <i>et al.</i> , 1999 [103]
J	1999	<i>E. taurus</i> (Ivory Coast, Burkina Faso)	Baculé (0.02)	Triptic hydrolysis, IEF, RP-HPLC, MS	Rare	B J Ser(155) → Arg	Mahé <i>et al.</i> , 1999 [16]

<sup>(1)</sup> Reference (most common) variants.

<sup>(2)</sup> German Simmental [77] and German Fleckvieh [98]; this variant was named k-Cn D, but it is identical to C. k-Cn C variant was found also in Mumau-Werdenfölsler [105] and Red Holstein [106].

<sup>(3)</sup> Finnish Ayrshire (frequency 0.307) [54] and Italian Brown and Italian Friesian [107].

<sup>(4)</sup> The exact name of k-Cn Az variant was "k-Cn A of zebu".

SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism.

For a long time these two variants seemed to be the only ones for k-casein, until 1978, when Di Stasio and Merlin [78, 94] found in Grey Alpine, by SGE at alkaline pH, another k-casein, named C. This variant was characterised by a faster migration with respect to A variant; at acid conditions A, B and C variants, instead, don't show any difference in their electrophoretic mobility. No characterisation was made for Di Stasio and Merlin C variant. Some years later also Mariani [95] found a third k-casein in Italian Brown cattle. The Author, on the base of its electrophoretic mobility considered it as the same variant as Di Stasio and Merlin one. Only this latter C variant was characterised; the identity at level of aminoacid substitution between the two k-Cn C was never proved. k-Cn C, conversely with respect to A and B variants, presents an Arg $\rightarrow$ His substitution in position 97, i.e. in the para-k-casein portion [108]. This fact has negative repercussions on rennet-clotting time, that results longer, probably due to a change of conformation of the molecule that makes more difficult the interaction between substrate and chymosin [109, 110]. This substitution seems to have not a negative effect on curd firmness, that, conversely, appears to be good [111], probably because of a better interaction between the micelles of para-k-casein.

The k-Cn D variant found by Seibert *et al.* [77] in 1987 was proved [105] to be identical to k-casein C. The following k-casein allele discovered [97, 98] was called E.

Another allele, often forgotten, is k-Cn B2, found by Gorodetskij and Kaledin in 1987 [96]. This variant has been characterised in the same work, and shows an Ile $\rightarrow$ Thr substitution at position 153 with respect to k-Cn B. The Authors discovered this substitution sequencing for the new allele both mature protein both cDNA.

In 1989, Damiani *et al.* [112] found, by PCR, two k-casein A amplified fragments with a different behaviour towards the nucleases *MboI* and *TaqI* in a site located in a not-coding region of the gene. These eventual "variants" were named tentatively A1 and A2; no more works were made to furthermore characterise them.

One of the most complex knot in milk protein polymorphism is the case of k-casein F. In 1992, Sulimova *et al.* [99], found in Yakut (Russian *B. taurus*) by PCR a new k-casein allele, named F; the primary structure of the protein was reconstructed from the DNA sequence data, and revealed an Asp(148) $\rightarrow$ Val substitution with respect to A variant [113]. In 1995, Woollard and Dentine [114] announced the discovery, by PAGE and PCR, of a new k-casein allele, named F. Further investigations, however, have not confirmed this hypothesis: the new pattern observed was most likely a PCR artefact that was not evident at the time of the discovery [115]. In 1996, Ikonen *et al.* [54], by IEF, found in Finnish Ayrshire another k-casein allele, named F. This variant has been characterised by Prinzenberg *et al.* [116] in the same year and showed a Arg(10) $\rightarrow$ His substitution.

k-Cn G represents another case of homonymy: in fact two different k-Cn variants, both named G, were discovered. One was found by Erhardt [101] in Pinzgauer and is characterised by a Arg(97) $\rightarrow$ Cys substitution. The other was been previously found by Sulimova *et al.* [100] in yak and is characterised by an Asp(148) $\rightarrow$ Ala substitution; the Authors cannot exclude the possibility (on the base of the IEF migration) that this variant could correspond to the k-casein X variant found by Kawamoto *et al.* [43] in Nepalese yak and never characterised. The k-Cn G of Sulimova *et al.* [100] is similar to the *Bison bonasus* k-Cn G allele previously found by Udina *et al.* [117] except for at least a single nucleotide substitution in the stop codon (TGA $\rightarrow$

TAA).

Another point is that concerning k-Cn "A of zebu" and k-Cn H variants. In 1974, Grosclaude *et al.* [19] announced the discovery in Madagascan zebu of a Ile(135) $\rightarrow$ Thr substitution that differentiates zebu A variant from the common *B. taurus* k-Cn A; this variant was indicated as "A of zebu" or simply k-Cn Az. The same substitution, Ile(135) $\rightarrow$ Thr, has been detected also in *B. taurus* (Pinzgauer) by Prinzenberg and Erhardt [102]; this latter was considered as a new variant and named k-Cn H.

Recently, Prinzenberg and Erhardt [104] evidenced by SSCP in *B. taurus*  $\times$  *B. indicus* crosses the presence of a silent A $\rightarrow$ G transition in the third codon position for aminoacid Pro(150) (CCA $\rightarrow$ CCG), that creates an *MspI* restriction site. This mutation has not effect on the aminoacid sequence of the mature protein. This variant has been denoted A(1) in order to distinguish it from the A allele.

The last detected k-casein variant is k-Cn J that Mahé *et al.* [16] found in African Baoulé cattle (*B. taurus*), characterised by a Ser(155) $\rightarrow$ Arg substitution with respect to the B variant.

**Diffusion** – The most diffused k-casein alleles are A and B, present in all breeds with variable frequency. A variant prevails in Friesian, Ayrshire, Red Danish and Indian zebu; in Irish Kerry its frequency is near 93% [118]. B variant, instead, is prevalent in Jersey, Normande and African zebu. Beef cattle breeds have a marked prevalence of B variant [1].

k-casein C is less common, but was found in many breeds. Besides Grey Alpine and Italian Brown, it was detected in German Simmental [77], German Fleckvieh [98], Murnau-Werdenfelser [105] and Red Holstein [106].

k-casein E, nevertheless is considered a not very common variant, in Finnish Ayrshire was found also with high frequency (~30%) [54]; recently this variant has been detected also in Italian Brown and Italian Friesian breeds [107, 119].

### ***$\alpha$ -lactalbumin***

$\alpha$ -lactalbumin is a constituent of lactose-synthetase, the enzyme responsible of the synthesis of lactose, in the final step where glucose is linked to galactose. The primary sequence of  $\alpha$ -La was first determined by Brew *et al.* [120]. The most common B variant consists of 123 aminoacids with a molecular weight of 14,175. There are eight cysteines, variously connected with both inter- both intra-molecular bonds. There is a great percentage of homology with lysozyme; furthermore, they have a similar molecular weight, the same number of S-S links, identical N and C terminal residues; all this similarity suggests that both proteins arise from a common ancestor. Also some glycosylated forms were found [121-124]. They can not be considered as genetic variants in true sense, since they have not any aminoacid substitution and any mutation was evidenced at level of the gene.

**Polymorphism and diffusion** – Nevertheless its less accentuated genetic variability (until now only a few variants are known, see Table 5),  $\alpha$ -lactalbumin was the second milk protein in which polymorphism was noticed: in 1958 Blumberg and Tombs [125] found in South African White Fulani (*B. indicus*), by paper electrophoresis, two genetic variants, named A and B, in order of their decreasing electrophoretic mobility. B variant was the common  $\alpha$ -La present in all Western breeds;  $\alpha$ -La A, instead, was found only in *B. indicus* populations and seemed to be peculiar of this species. After the work of Blumberg and Tombs, other detections were made of this allele by Aschaffenburg [127] and Bhattacharya [126], but always in *B. indicus* species.

Table 5 – Discovery and diffusion of the genetic variants of  $\alpha$ -lactalbumin.

Variant	Year	Species (country)	Breeds (frequency)	Methods	Diffusion	Variations with respect to B	References
A	1958	<i>E. indicus</i> (Nigeria)	White Fulani (0.15)	PE pH 8.6	Common <i>E. indicus</i> but not <i>E. taurus</i> ; Other detections: ( <sup>1</sup> ) <i>E. indicus</i> ( <sup>2</sup> ) <i>E. taurus</i>	Arg (10) → Gln	Blumberg & Tombs, 1958 [125]
( <sup>2</sup> ) B	1958	<i>E. indicus</i> (Nigeria)	White Fulani (0.85)		All breeds N.f. <i>E. javanicus</i>		Blumberg & Tombs, 1958 [125]
C	1981	<i>E. javanicus</i> (Australia)		SGE pH 8.5 ( <sup>4</sup> ) PE pH 8.6	Only <i>E. javanicus</i>	Asp (?) → Asn ( <sup>3</sup> )	Bell <i>et al.</i> , 1981 [21]

(<sup>1</sup>) Found also in Indian zebu (0.24), Jersey x Hariara crosses (0.20) [126] and Boran (0.13) [127].

(<sup>2</sup>) Found for the first time in *E. taurus* in European breeds imported in South Africa (Brown Swiss 0.083, Friesian 0.122, Jersey 0.050), and Afrikander (0.026) and Nguni (0.042) [128]. Evidenced also in Europe by several Authors [129-132].

(<sup>3</sup>) Reference (most common) variant.

(<sup>4</sup>) Without presence of urea.

(<sup>5</sup>) Aminoacid substitution is known, but not its position.

N.f. : Not found.

The first evidence of the presence of  $\alpha$ -La A in *B. taurus* was proved by Osterhoff and Pretorius [128], that found this allele in European breeds imported in South Africa. Some Authors, however, objected that maybe A allele present in such breeds could arise from crosses with South African *B. indicus*. This controversy was resolved when  $\alpha$ -La A was found by several Authors also in bovine breeds reared in Europe [129-132]. However, a study to verify and confirm the identity between *B. taurus* A variant and *B. indicus* one has never been made.

Bettini and Masina [131], on the base of the occurrence of the  $\alpha$ -La A allele in breeds reared in the South of Italy (like Podolian cattle), and on the base also of some anatomical resemblances between these breeds and zebu, suggested a phylogenetic origin of such breeds from *B. indicus*.

Bell *et al.* [21] in Bali (banteng) cattle (*B. javanicus*) found a third  $\alpha$ -La variant, named C. Until now, there is no evidence of this third allele neither in *B. taurus* nor in *B. indicus*. For this latter variant the aminoacid substitution is known [21], but not its position (Table 5).

Another  $\alpha$ -lactalbumin polymorphism, named  $\alpha$ -La(+15) [133], was found in a not-coding sequence of the gene; this case will be examined later.

### **$\beta$ -lactoglobulin**

$\beta$ -lactoglobulin is the major whey protein in cow milk, and after crystallisation by Palmer in 1934 [134] it was used for many years as a protein model for structural and enzymatic studies concerning denaturation and linkage between ions and proteins.  $\beta$ -lactoglobulin is not present in all mammals: in human milk, for example, is not found. The biological functions of this protein are not still well-known; it could have a role on the metabolism of phosphate in the mammary gland and on the transport of retinol and fatty acids within the gut [135, 136]. The most common B variant consists of 162 aminoacids with a molecular weight of 18,277. The primary sequence was first established by Braunitzer *et al.* [137]. Some corrections are made to the original sequence [20, 138]: residues 155 and 156 have been changed from Leu-Gln to Gln-Leu, and residues 84 and 87 from Leu-Ile to Ile-Leu. The proposal [20] to change Asp 11 in Asn has not been substantiated [139, 140].

*Polymorphism* –  $\beta$ -lactoglobulin was the first protein in which polymorphism was evidenced. In 1955, Aschaffenburg and Drewry [141] observed, by paper electrophoresis, two distinct bands of  $\beta$ -Lg, that were named  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. On the base of the fact that milk arising from one-egg twin heifers always presented the same type of  $\beta$ -Lg, the Authors suggested the genetic nature of the variation. In 1957 [142], when Aschaffenburg and Drewry confirmed the discovery, the name of the bands was changed in A and B, in order of their decreasing electrophoretical mobility. Until now, at least 12 variants are known for  $\beta$ -lactoglobulin, from A to J plus  $\beta$ -Lg W and  $\beta$ -Lg Dr (Table 6). The variant named  $\beta$ -Lg D was found by Grosclaude *et al.* [18] in Monbéliarde and by Meyer [145] in German breeds, independently from each other.

Table 6 – Discovery and diffusion of the genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin.

Variant	Year	Species (country)	Breeds (frequency)	Methods	Diffusion	Variations with respect to B	References
A	1955 1957	<i>B. taurus</i> (UK)	Shorthorn (0.11), Guernsey (0.22), Friesian (0.40), Ayrshire (0.31)	PE pH 8.6	All breeds <i>E. indicus</i> <i>E. grunniens</i> <sup>(1)</sup>	Gly(64) → Asp Ala(118) → Val	Aschaffenburg & Drewry, 1955 [141], 1957 [142]
<sup>(2)</sup> B	1955 1957	<i>B. taurus</i> (UK)	Shorthorn (0.89), Guernsey (0.78), Friesian (0.60), Ayrshire (0.69)	PE pH 8.6	All breeds <i>E. indicus</i> <i>E. grunniens</i> <sup>(1)</sup>		Aschaffenburg & Drewry, 1955 [141], 1957 [142]
C	1962	<i>B. taurus</i> (Australia)	Jersey	SGE pH 8.6 <sup>(3)</sup> PE pH 8.6	Not common Other breeds <sup>(4)</sup> <i>E. indicus</i> <sup>(5)</sup> <i>E. grunniens</i> <sup>(6)</sup>	Gln(59) → His	Bell, 1962 [143]; Bell & McKenzie, 1964 [144]
D	1966	<i>B. taurus</i> (France)	Montbéliarde (0.02)	SGE pH 8.6	Less common Other breeds <sup>(7)</sup>	Glu(45) → Gln	Grosclaude <i>et al.</i> , 1966 [18] Meyer, 1966 [145]
		<i>B. taurus</i> (Germany)	German Red & White, German Brown, German Highland	SGE pH 8.6 <sup>(3)</sup>			
<sup>(8)</sup> Dr	1966 1976	<i>E. indicus</i> x <i>B. taurus</i> (Australia)	Droughtmaster	SGE pH 8.5	Rare	Gly(64) → Asp Ala(118) → Val Asp(28) → Asn-CHO	Bell <i>et al.</i> , 1966 [146], 1970 [147], 1981 [139]
E	D <sub>var</sub> 1976	<i>E. grunniens</i> (Nepal)		Tryptic hydrolysis	Only <i>E. grunniens</i> and <i>E. javanicus</i>	Glu(158) → Gly	Grosclaude <i>et al.</i> , 1976 [20] Bell <i>et al.</i> , 1981 [139]
	E 1981	<i>E. javanicus</i> (Australia)		SGE pH 8.5 <sup>(3)</sup>			
F	1981	<i>B. javanicus</i> (Australia)		SGE pH 8.5 <sup>(3)</sup>	Only <i>B. javanicus</i>	Glu(158) → Gly Pro(50) → Ser Asp(130) → Tyr	Bell <i>et al.</i> , 1981 [139]
G	1981	<i>B. javanicus</i> (Australia)		SGE pH 8.5 <sup>(3)</sup>	Only <i>B. javanicus</i>	Glu(158) → Gly Ile(78) → Met	Bell <i>et al.</i> , 1981 [139]
W	1980	<i>B. taurus</i> (Germany)	Murnau-Werdenfe lser (0.006), Jersey, Red Holstein x Simmental	EL.AC.CE pH 8.9 IPG-IEF	Rare	Ile(56) → Leu	Weiß <i>et al.</i> , 1980 [148]; Buchberger <i>et al.</i> , 1980 [149]; Weiß <i>et al.</i> , 1982 [150]; Krause <i>et al.</i> , 1988 [105]
* H	1987	<i>B. taurus</i> (Italy)	Italian Friesian	SGE pH 8.6	Rare		Davoli <i>et al.</i> , 1987 [151], 1988 [152]
I	1998	<i>B. taurus</i> (Poland)	Polish Red (0.014)	IEF	Rare	Glu(108) → Gly	Erhardt <i>et al.</i> , 1998 [153]
<sup>(9)</sup> J (X)	1993 1996	<i>B. taurus</i> (Hungaria)	Hungarian Grey (0.05)	IEF	Rare	Pro(126) → Leu	Baranyi <i>et al.</i> , 1993 [154]; Godovac-Zimmermann <i>et al.</i> , 1996 [155]

\* Still not characterised variant.

<sup>(1)</sup> Evidence for  $\beta$ -Lg A and B alleles in *E. grunniens* are noticed by Grosclaude *et al.* [156] with a very low frequency. The Authors suggested that this presence can be interpreted as a trace of crossbreedings with *B. taurus*. These two alleles, however, have been detected also in Pamir yak by Lozovaya [157].

<sup>(2)</sup> Reference (most common) variant.

<sup>(3)</sup> Without presence of urea.

<sup>(4)</sup> German Jersey [33].

<sup>(5)</sup> Cuban zebu [158].

<sup>(6)</sup> Pamir yak [157].

<sup>(7)</sup> Danish Jersey [27], Polish Simmental [56], Italian Brown [36,37], Reggiana [38], Modenese [159], Modicana [131], Rendena [160], German Simmental [77].

<sup>(8)</sup> In 1966 was discovered the variant and in 1970 was evidenced the presence of a carbohydrate moiety with respect to A variant; in 1976 was identified also an aminoacid substitution [161, 162].

<sup>(9)</sup> In 1993 was called  $\beta$ -Lg X. Only in 1996 is named  $\beta$ -Lg J.

EL.AC.CE: Cellulose acetate electrophoresis; IPG-IEF: Isoelectric focusing in immobilised pH gradients.

$\beta$ -Lg Dr, discovered by Bell *et al.* [146] in 1966 is very singular. Analysing by starch gel electrophoresis some milks from Droughtmaster cows (*B. taurus* x *B. indicus*), the Authors found a new  $\beta$ -Lg that migrates more slowly than A, B and C variants. In 1970, it was characterised and resulted identical to the A variant, except for the presence of a covalently-attached carbohydrate, constituted prevalently by N-acetylneuraminic acid,

hexosamine, mannose and galactose [147]. As noticed by Eigel *et al.* [140], this glycosylated form could not be considered a genetic variant, because the variation was not at level of the gene or the mRNA, but rather by post-translational modifications. Some years later, however, was announced [139, 161, 162] for the same  $\beta$ -Lg Dr also the presence of an aminoacid substitution in position 28, in which is involved just the residue linked to the carbohydrate. This variation makes the protein a genetic variant in true sense.

The variant named DYak was found by Grosclaude *et al.* [20] in this species in 1976. The name D is due to the fact that the new variant migrated, by PAGE and SGE, both at alkaline both at acid pH, exactly like  $\beta$ -Lg D found in *B. taurus*. By hydrolysis with triptic enzymes, instead, it presented some fragments different from the ones of  $\beta$ -Lg D. The coincidence of the electrophoretic mobilities can be explained on the base of the aminoacid substitution Glu(158) $\rightarrow$ Gly, that leads to a charge variation analogous to that of  $\beta$ -Lg D.

Some years later, Bell *et al.* [139], found in Bali (banteng) cattle (*B. javanicus*) three new  $\beta$ -Lg variants. One of these, named E, presented the same aminoacid substitution as DYak variant. Eigel *et al.* [140] suggested to identify these two variants with a unique name ( $\beta$ -Lg E) because to avoid subscripts and superscripts.

The other two variants found by Bell *et al.* [139] in banteng cattle arise from E variant, and were named F and G; they are characterised by an electrophoretic mobility respectively slower and faster with respect to  $\beta$ -Lg Dr; the mobility of G is equal to that of E variant, because the substitution does not lead to a change in the charge.

In 1980, Weiß [148] and Buchberger *et al.* [149] announced the discovery of another  $\beta$ -lactoglobulin variant in the Murnau-Werdenfeller breed, called  $\beta$ -Lg W; the discovery was confirmed in 1982 [150]. This variant was characterised and showed an aminoacid substitution Ile(56) $\rightarrow$ Leu with respect to the B variant and an electrophoretic mobility at pH 8.9 between B and D variants.

The discovery of  $\beta$ -Lg H was announced in 1987 by Davoli *et al.* [151, 152]. This variant at pH 8.6 results faster than  $\beta$ -Lg A; unfortunately, until now, only some preliminary characterisations were made, like determination of molecular weight, pI and aminoacid composition [163].

The last discovered variant is  $\beta$ -Lg J, found in 1993 in Hungarian Grey cattle by Baranyi *et al.* [154] and indicated provisionally as  $\beta$ -Lg X; by isoelectric focusing it migrates between A and B variants. In 1996, when it was characterised [155], its name was definitively changed in  $\beta$ -Lg J.

In 1998, Zappacosta *et al.* [164], by isoelectric focusing, identified C-terminally truncated A and B  $\beta$ -lactoglobulin variants with missing N-terminal peptides, beyond residues in the range 100-103 and 136-147 respectively. Two of the minor components were related to  $\beta$ -Lg A and two to  $\beta$ -Lg B. The Authors suggested two hypotheses: they may be non-allelic forms or enzyme-mediated products of the mature protein (in this case they have not a genetic origin) or, maybe, they can arise from the occurrence of a stop-codon, which would result in the synthesis of a protein 33 aa. shorter. Since this phenomenon involves both A and B alleles, the first hypothesis seems to be most probable.

*Diffusion* –  $\beta$ -lactoglobulin A and B variants are diffused in all breeds; B prevails in some European breeds, like Ayrshire, Shortorn, Red Danish, and in Asian and African zebu (85-95%), as well as in Italian beef cattle breeds (70-80%). In Friesian and in several other breeds the two alleles have the same frequency. Evidence for  $\beta$ -Lg A and B alleles in *B. grunniens*, with a very low frequency, are noticed by Grosclaude *et al.* [156]. The Authors suggested that this presence can be interpreted as a trace of crossbreedings with *B. taurus*. These two alleles have been detected by Lozovaya also in Pamir yak [157].

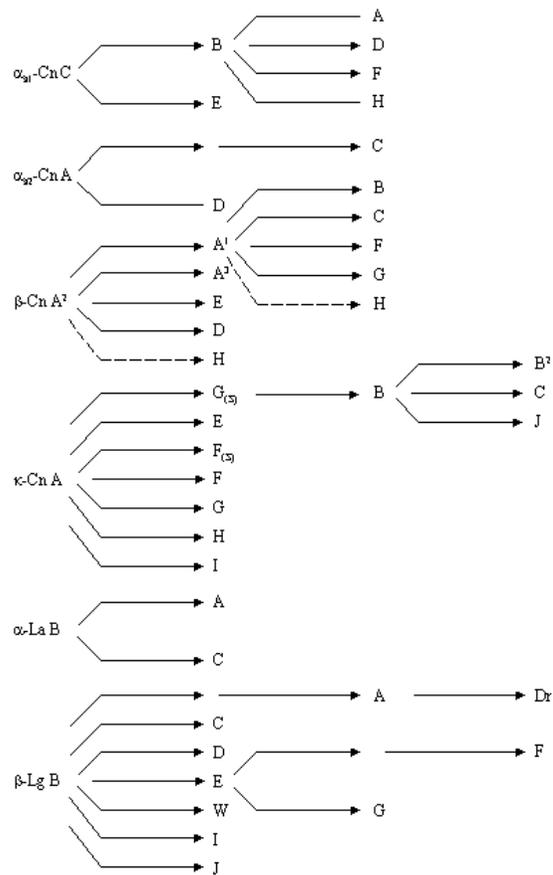
$\beta$ -Lg C is a not common allele, found only in Australian Jersey [143] and in German Jersey [33]. Occurrences of this allele in Cuban zebu [158] and Pamir yak [157] have been evidenced.

$\beta$ -Lg D, instead, was observed in several other breeds: Danish Jersey [27], Polish Simmental [56], Italian Brown [36, 37], Reggiana [38], Modenese [159], Modicana [131], Rendena [160], German Simmental [77].

$\beta$ -Lg E, F and G variants, until now, were observed only in Bali (banteng) cattle (*B. javanicus*). The other  $\beta$ -lactoglobulin alleles are rare and were found only in one breed.

### **Variant phylogenesis**

For a further explanation of the exposed concepts, in Figure 1 is illustrated the phylogenesis of the genetic variants for the six milk proteins here considered.



In addition, in Table 7 are reported the references of the first complete sequencing for the mature protein and the gene.

Table 7 – First complete sequencing for milk mature protein and corresponding gene (Groenen & van der Poel, 1994) [165].

	Complete sequencing of the protein	Complete sequencing of the gene
$\alpha_1$ -Cn 199aa.	Mercier <i>et al.</i> , 1971 [6]	Koczan <i>et al.</i> , 1991 [44]
$\alpha_1$ -Cn 207aa.	Brignon <i>et al.</i> , 1977 [49]	Groenen <i>et al.</i> , 1993 [166]
$\beta$ -Cn 209aa.	Ribadeau-Dumas <i>et al.</i> , 1972 [58]	Bonsing <i>et al.</i> , 1988 [167]
$\kappa$ -Cn 169aa.	Mercier <i>et al.</i> , 1973 [87]	Alexander <i>et al.</i> , 1988 [168]
$\alpha$ -La 123aa.	Brew <i>et al.</i> , 1970 [120]	Vilotte <i>et al.</i> , 1987 [169]
$\beta$ -Lg 162aa.	Braunitzer <i>et al.</i> , 1972 [137]	Alexander <i>et al.</i> , 1992 [170]

The introduction of modern biomolecular methods, like RFLP, PCR and SSCP, opened up new opportunities to the study of milk protein polymorphism. They allowed the knowledge of the variations at the DNA level for the known protein variants, and, at the same time, the detection of new alleles. Several studies have been applied to the not-coding zones, in particular 5' and 3' flanking regions. 5' flanking region, compared to coding sequences, is a zone with a high genetic variability, and mutations in this part often have important repercussions on the expression of the gene and, in general, on milk production traits and composition. The case concerning the origin of  $\alpha$ s1-Cn G has been already treated.

For  $\alpha$ -lactalbumin, Bleck and Bremel [133] identified in Holstein-Friesian three single bp polymorphisms within the 5' flanking region, at position +15, +21 and +54 relatively to the mRNA transcription start point. The +15 and +21 variations were in the zone encoding the 5'-untranslated region (5' UTR) of the mRNA sequence, while the +54 polymorphism was a silent mutation in the coding region of the gene. The  $\alpha$ -La(+15)A and  $\alpha$ -La(+15)B alleles are characterised respectively by an adenine and a guanine in position +15. These two forms were examined to investigate the effects of such a mutation on milk production and milk composition:  $\alpha$ -La(+15)A variant is associated with greater milk, protein and fat yields, while  $\alpha$ -La(+15)B allele is related to higher protein and fat percentages [171]. The (+15) polymorphism was detected also in Taiwan Holstein [172], Italian Friesian and Italian Red Pied [173], Swedish Red and White [174] and Italian Brown [175].

In 1997, Voelker *et al.* [176] found in Holstein, Simmental and Brown Swiss another single bp difference located in position -1689 from the transcription start point, also a variation adenine (form A) / guanine (form B). The Authors noticed a relationship between this polymorphism and the (+15) one:  $\alpha$ -La(+15)A was always linked to  $\alpha$ -La(-1689)A variant. The (-1689) polymorphism was found also in Korean Holstein population [177].

In 1994, Schild *et al.* [178], analysing milk from several bovine breeds (Holstein Friesian, Brown Swiss, German Simmental, Jersey, Galloway, Scottish Highland) and Ceylon Dwarf zebu, found 15 DNA "variants" in the 5' flanking region of the k-casein gene, some of which located within potential regulatory sites and possibly involved in the expression of the gene. It is possible that the different expression of A and B k-casein alleles is related to some of these mutations in the 5' flanking region of the gene [178, 179].

Recently at level of the 2nd intron of the k-casein gene, Damiani *et al.* [180] evidenced a furthermore polymorphism, regarding the short interspersed elements (SINEs) [181], precisely in the Bov-A2 sequence, an homodimer of Bov-A.

Also for  $\beta$ -casein was evidenced a 5' flanking region polymorphism by Bleck *et al.* [182]. The Authors detected in Brown Swiss and Jersey a deletion of a thymine at position -516 from the transcription start point.

$\beta$ -lactoglobulin is the most studied milk protein in relation to the 5' flanking polymorphism. Several studies are focused to understand the causes of the different expression of  $\beta$ -Lg A and B variants: in fact, on average, 1.2 times more A than B protein was found in the milk [183]. Measurements of mRNA levels indicated that approximately 60% more A than B mRNA was present. Differences either at the level of transcription or in mRNA stability are probably responsible for the different rates of synthesis of the corresponding proteins [183]. To investigate possible differences in transcription, the 5' flanking region of the two variants was sequenced (from position -795 to +59 with respect to the transcription start point). Wagner *et al.* [184] identify 14 single bp allele substitutions within the 5' flanking region, and 2 in the untranslated region (5' UTR) of exon 1, that could influence the transcription level of the two alleles. Further research (sequencing from position -733 to +95 with respect to the transcription start point of the  $\beta$ -Lg gene) [185] confirmed the results obtained from Wagner *et al.* [184]. In particular the studies of Lum *et al.* [185] were focused to the binding site (from -436 to -429) for the activator protein 2 (AP-2), a transcription factor present in the mammary gland during lactation, where an allele specific single base substitution (G in the A allele, and C in the B allele) at position -430 is present. Lum *et al.* [185] demonstrated that AP-2 has a different binding affinity for the two variants, which could be affected by the -430 mutation, and proposed a modulating role of AP-2 in the different allele expression.

Kaminski and Zaboiewicz [186], by means of SSCP, found six variants in the  $\beta$ -Lg 5' flanking region, between position -501 and -293, that were no further characterised.

PCR was also used to amplify and clone a region from  $\beta$ -Lg *locus*, that spanned exon 4 and 5 (849 bp). Sequence analysis of the cloned region revealed two new single base substitutions that further differentiated A and B forms. The mutation were localised in the intron sequence between the two exons, at position 276 (T in the A allele, and C in the B allele) and 562 (T in the A allele, and G in the B allele) of the cloned fragment. These nucleotide substitutions resulted in an allele specific restriction profile, that could be used as a genetic marker [187].

### **Haplotypes**

The analysis of Mendelian segregation of three casein *locus* ( $\alpha$ s1-Cn,  $\beta$ -Cn, and k-Cn) showed that they were tightly linked together [27, 188, 189]. Further studies demonstrated that also the  $\alpha$ s2-Cn *locus* was genetically linked to the other three casein *loci* [52].

These observations led to the conclusion that the four casein *loci* behave themselves as a one Genetic Unit, in which allele combinations at the casein *locus* (haplotypes) are tightly linked together. These genetic combinations, therefore, could be peculiar of a particular breed, and could be used as a tool for genetic marker [73].

Further experiments enabled to establish the physical association (and therefore genetic association) of casein *loci*, which are situated on the same chromosome (6th) [190], on a range of 185-250 kb [191, 192], in this order:  $\alpha$ s1-Cn,  $\beta$ -Cn,  $\alpha$ s2-Cn, and k-Cn. The genes coding for  $\beta$ -Lg and  $\alpha$ -La, are located, in *Bos*, on 11th [193] and 5th [194, 195] chromosome respectively, justifying their independent segregation respect to the caseins *loci*.

### **Conclusions**

The research on milk protein polymorphism is in full growth, with several aims: to discover further new variants, characterise them and, particularly, to understand the role that each variant can have on milk nutritional and technological properties. With the recent progress in biochemistry and molecular biology it is possible to inquire into the causes that determine these effects on the composition and on the coagulation parameters, to understand why a simple mutation can have such a relevance for the properties of milk and, after all, if these effects arise only from the variation in the protein or rather are due to the action of promoters present in the regulatory not coding sequences of DNA. Often, an effect can arise from a complex connection and succession of several causes, all involved in the same singular phenomenon; actually this is the most accredited

interpretation.

The knowledge of the biochemical and biomolecular processes can lead new contributions to important biotechnological applications, like genetic improvement and molecular engineering, with the aim to obtain breeds more and more suitable for the modern requirements.

**Key words:** Milk proteins, genetic polymorphism, *Bos* genus, variant discovery, variant diffusion.

**Parole chiave:** Proteine latte, polimorfismo genetico, genere *Bos*, scoperta varianti, diffusione varianti.

Summary – The Authors review the discovery and the diffusion of genetic variants of the six principal milk proteins (9 for  $\alpha$ s1-Cn, 4 for  $\alpha$ s2-Cn, 15 for  $\beta$ -Cn, 13 for k-Cn, 3 for  $\alpha$ -La, 12 for  $\beta$ -Lg) in the species of *Bos* genus (*B. taurus*, *B. indicus*, *B. grunniens*, *B. javanicus*): the year and the discoverers, the species and the breeds, the analytical method and the aminoacid substitution. A particular attention is devoted to the "problematic" situations: the changes of name, the omitted letters, the cases of homonymy, the variants not well or not still characterised and the "possible" genetic variants never confirmed. In particular two k-casein F (one by Sulimova *et al.*, 1992 [99] and the other by Ikonen *et al.*, 1996 [54]) and two k-casein G (one by Sulimova *et al.*, 1996 [100] and the other by Erhardt, 1996 [101]) are noticed. In the paragraphs relative to the diffusion, the distribution of the genetic variants for each protein and the following discoveries in other *Bos* species or breeds are described.

Résumé – *Le polymorphisme des protéines du lait: découverte et diffusion des variants génétiques dans le genre Bos.* Les Auteurs ont décrit la découverte et la diffusion des variants génétiques des six principales protéines du lait (9 pour  $\alpha$ s1-Cn, 4 pour  $\alpha$ s2-Cn, 15 pour  $\beta$ -Cn, 13 pour k-Cn, 3 pour  $\alpha$ -La, 12 pour  $\beta$ -Lg) dans les espèces du genre *Bos* (*B. taurus*, *B. indicus*, *B. grunniens*, *B. javanicus*): l'année et les découvreurs, l'espèce et la race, la méthode et la substitution d'acide aminé. Une considération particulière est donnée à des cas problématiques: les changements de dénomination, les lettres sautées, les questions d'homonymie, les variants pas bien ou pas encore caractérisés et les "possibles" variants génétiques jamais confirmés. Dans les paragraphes relatifs à la diffusion est décrite la distribution des variants génétiques pour chaque protéine et les suivantes découvertes dans autres espèces ou races du genre *Bos*.

Riassunto – *Il polimorfismo delle proteine del latte: scoperta e diffusione delle varianti genetiche nel genere Bos.* Gli Autori hanno descritto la scoperta e la diffusione delle varianti genetiche delle sei principali proteine del latte (9 per  $\alpha$ s1-Cn, 4 per  $\alpha$ s2-Cn, 15 per  $\beta$ -Cn, 13 per k-Cn, 3 per  $\alpha$ -La, 12 per  $\beta$ -Lg) nelle specie del genere *Bos* (*B. taurus*, *B. indicus*, *B. grunniens*, *B. javanicus*): l'anno e gli scopritori, la specie e la razza, la metodica e la sostituzione aminoacidica. Una particolare attenzione è stata riservata alle questioni problematiche: i cambiamenti di denominazione, le lettere omesse, i casi di omonimia, le varianti non ben caratterizzate o non ancora caratterizzate e le "possibili" varianti genetiche mai confermate. In particolare sono state messe in luce due k-Cn F (una scoperta da Sulimova *et al.*, 1992 [99]; l'altra da Ikonen *et al.*, 1996 [54]) e due k-Cn G (una scoperta da Sulimova *et al.*, 1996 [100]; l'altra da Erhardt, 1996 [101]). Nei paragrafi relativi alla diffusione viene descritta la distribuzione delle varianti genetiche di ogni proteina e le successive scoperte in altre specie o razze del genere *Bos*.

## References

- 1) Russo V., Mariani P. (1978) Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico, tecnologico e caseario. "Rivista di Zootecnia e Veterinaria", 6(5, 6), 289-304, 365-379.
- 2) Puhani z., Jakob E. (1994) Genetic variants of milk proteins and cheese yield. "IDF, International Dairy Federation", Brussels, Belgium, Special Issue no.9402, 111-122.
- 3) Ng-Kwai-Hang K.F. (1998) Genetic polymorphism of milk proteins: relationships with production traits, milk composition and technological properties. "Canadian Journal of Animal Science", 78(Suppl.1), 131-147.
- 4) Mariani P., Sumner A. (1999) – Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte. "Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia", 50, 197-230.
- 5) Di Stasio L., Mariani P. (2000) – The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. "Zootecnica e Nutrizione Animale", in preparation.
- 6) Mercier J.C., Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B. (1971) – Structure primaire de la caséine  $\alpha$ s1 bovine. Séquence complète. "European Journal of Biochemistry", 23, 41-51.
- 7) Grosclaude F., Mahé M.F., Ribadeau-Dumas B. (1973) – Structure primaire de la caséine  $\alpha$ s1, et de la caséine  $\beta$  bovine. "European Journal of Biochemistry", 40, 323-324.
- 8) Alais C. (1974) – "Science du lait - Principes des techniques laitières.", Editions SEP, Paris, France.
- 9) Herskovitz T.T. (1966) – On the conformation of caseins. Optical rotatory properties. "Biochemistry", 5, 1018-1026.
- 10) Alais C., Blanc B. (1975) – Milk proteins: biochemical and biological aspects. In "World Review of Nutrition and Dietetics, vol.20", 66pp. Ed. Separatum, Basel, Switzerland.
- 11) Thompson M.P., Kiddy C.A., Pepper L., Zittle C.A. (1962) – Variations in the  $\alpha$ s-casein fraction of individual cow's milk. "Nature", 195, 1001-1002.
- 12) Grosclaude F., Mahé M.F., Mercier J.C., Ribadeau-Dumas B. (1970) – Localisation dans la partie NH2-terminale de la caséine  $\alpha$ s1 bovine, d'une délétion de 13 acides aminés différenciant le variant A des variants B et C. "FEBS letters", 11, 109-112.
- 13) McKnight R.A., Jimenez-Flores R., Kang Y., Creamer L.K., Richardson T. (1989) – Cloning and sequencing of a complementary deoxyribonucleic acid coding for a bovine  $\alpha$ s1-casein A from mammary tissue of a homozygous B variant cow. "Journal of Dairy Science", 72, 2464-2473.
- 14) Mohr U., Kozcan D., Linder D., Hobom G., Erhardt G. (1994) – A single point mutation results in A allele-specific exon skipping in the bovine  $\alpha$ s1-casein mRNA. "Gene", 143, 187-192.
- 15) Wilkins R.J., Xie T. (1997) – Two distinct gene mutations - one milk protein polymorphism: the example of the  $\alpha$ s1-casein A variant. In "Milk Protein Polymorphism", IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, Special Issue no. 9702, 330-333.
- 16) Mahé M.F., Miranda G., Queval R., Bado A., Zafindrajaona P.S., Grosclaude F. (1999) – Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations. Characterization of variants  $\alpha$ s1-Cn H and k-Cn J. "Genetics Selection Evolution", 31, 239-253.
- 17) Kiddy C.A., Thompson M.P., Johnston J.O., Pepper L. (1963) – Genetic control of  $\alpha$ s and  $\beta$ -casein. "Journal of Dairy Science", 46, 626-627.
- 18) Grosclaude F., Pujolle J., Garnier J., Ribadeau-Dumas B. (1966) – Mise en évidence de deux variants supplémentaires des protéines du lait de vache:  $\alpha$ s1-CnD et LgD. "Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique", 6, 215-222.
- 19) Grosclaude F., Mahé M.F., Mercier J.C. (1974) – Comparaison du polymorphisme génétique des lactoprotéines du zébu et des bovins. "Annales de Génétique et de Sélection Animale", 6, 305-329.
- 20) Grosclaude F., Mahé M.F., Mercier J.C., Bonnemaire J., Teissier J.H. (1976) – Polymorphisme des lactoprotéines de Bovinés Népalais. I. Mise en évidence, chez le yak, et caractérisation biochimique de deux nouveaux variants:  $\beta$ -Lactoglobuline Dyak et caséine  $\alpha$ s1-E. "Annales de Génétique et de Sélection Animale", 8, 461-479.
- 21) Bell K., Hopper K.E., McKenzie H.A. (1981) – Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin C and  $\alpha$ s1-,  $\beta$ - and k-Caseins of Bali (Banteng) Cattle, *Bos (Bibos) javanicus*. "Australian Journal Biological Sciences", 34, 149-159.
- 22) Erhardt G., Döring C., Senft B., Grandke R. (1992) – A new  $\alpha$ s1-casein variant in cow's milk. "Intern. Soc. Anim. Gen. (I.S.A.G.) Conference", Interlaken (Switzerland), 3-7 August 1992.
- 23) Erhardt G. (1993) – A new  $\alpha$ s1-casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds. "Animal Genetics", 24, 65-66.
- 24) Rando A., Ramunno L., Di Gregorio P., Davoli R., Masina P. (1992) – A rare insertion in the bovine  $\alpha$ s1-casein gene. "Animal Genetics", 23(Suppl.1), 55 (abstr.).
- 25) Rando A., Ramunno L., Di Gregorio P., Fiorella A., Davoli R., Masina P. (1993) – Localizzazione di siti polimorfi nella regione di DNA che contiene il gene della caseina  $\alpha$ s1 di bovino. "Proceedings Associazione Scientifica di Produzione Animale", Bologna, Italy, 10, 617-620.
- 26) Ramunno L., Rando A., Pappalardo M., Fiorella A., Di Gregorio P., Capuano M., Masina P. (1994) – Molecular analyses on quantitative alleles at goat  $\beta$ -Cn and cow  $\alpha$ s1-Cn loci. "Proceedings Società Italiana per il Progresso della Zootecnica",

- Milano, Italy, 29, 233-240.
- 27) Larsen B., Thymann M. (1966) – Studies on milk protein polymorphism in Danish cattle and the interaction of the controlling genes. "Acta Veterinaria Scandinavica", 7, 189-205.
  - 28) Petrusenko S.A. (1970) – [Polymorphism of bovine  $\alpha$ s1-caseins and some aspects of its use in selection.] In "Voprosy Genetiki i Seleksii", 147-154.
  - 29) Arave C.W. (1967) – Evidence for  $\alpha$ s- and  $\beta$ -casein linkage in Holsteins. "Journal of Animal Science", 26, 883 (abstr.).
  - 30) Hoogendoorn M.P., Moxley J.E., Hawes R.O., MacRae H.F. (1969) – Separation and gene frequencies of blood serum transferrin, casein and beta-lactoglobulin *loci* of dairy cattle and their effects on certain production traits. "Canadian Journal of Animal Science", 49, 331-341.
  - 31) Corradini C. (1970) – Distribuzione delle varianti genetiche delle caseine  $\alpha$ s1,  $\beta$ , k nel latte di vacche di razza Frisone. "Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia", 21, 166-170.
  - 32) Bianchini F., Crimella C., Rognoni G., Carenzi C. (1973) – Distribuzione delle varianti genetiche di caseina del latte nella popolazione bovina Frisone delle provincie di Milano, Cremona e Mantova. "Proceedings Società Italiana delle Scienze Veterinarie", 27, 526-535.
  - 33) Erhardt G. (1993) – Allele frequencies of milk proteins in German cattle breeds and demonstration of  $\alpha$ s2-casein variants by isoelectric focusing. "Archiv für Tierzucht, Dummerstorf", 36, 145-152.
  - 34) Michalak W. (1969) – [Hereditary polymorphism of milk proteins in some breeds of cattle raised in Poland. II.] "Biuletyn Zakładu Hodowli Doswiadczalnej Zwierzat. pol. Akad. Nauk., Warsaw", 15, 89-111.
  - 35) Corradini C. (1969) – Distribution of the genetic variants of  $\alpha$ s1-,  $\beta$ - and k-casein in milk from Jersey cows in the Netherlands. "Netherlands Milk Dairy Journal", 23, 79-82.
  - 36) Russo V., Mariani P. (1971) – Polimorfismo genetico delle proteine del latte nelle vacche di razza Bruna Alpina. "Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia", 22, 167-183.
  - 37) Mariani P. (1987) – Il polimorfismo genetico delle caseine in vacche di razza Bruna: frequenza della variante C al *locus* k-Cn. "Annali Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma", 7, 317-332.
  - 38) Mariani P., Russo V. (1971) – Distribuzione delle varianti genetiche delle caseine e della beta-lattoglobulina nelle vacche di razza Reggiana. "Rivista di Zootecnia", 44, 310-321.
  - 39) Chianese L., Di Luccia A., Mauriello R., Ferrara L., Zehender G., Addeo F. (1988) – Polimorfismo biochimico delle proteine del latte in bovine di razza Podolica. "Zootecnica e Nutrizione Animale", 14, 189-197.
  - 40) Rando A., Mariani P., Fiorella A., Di Gregorio P., Ramunno L., Masina P. (1995) – Un allele quantitativo della caseina  $\alpha$ s1 di bovino. "Proceedings Associazione Scientifica di Produzione Animale", Grado, Italy, 11, 175-176.
  - 41) Marletta D., Rando A., Senese C., Mariani P., D'Urso G. (1996) – Identificazione dell'allele quantitativo  $\alpha$ s1-Cn G in bovini di razza Modicana. "Proceedings Società Italiana delle Scienze Veterinarie", Perugia, Italy, 50, 461-462.
  - 42) Davoli R., Dall'Olio S., Milc J., Russo V. (1998) – Diffusione dell'allele G di  $\alpha$ s1-caseina in razze bovine allevate in Italia. "Proceedings Società Italiana delle Scienze Veterinarie", Silvi Marina (TE), Italy, 52, 493-494.
  - 43) Kawamoto Y., Namikawa T., Adachi A., Amato T., Shotake T., Nishida T., Hayashi Y., Kattel B., Rajubhandary H.B. (1992) – A population genetic study on yaks, cattle and their hybrids in Nepal using milk protein variations. "Animal Science and Technology", 63, 563-575.
  - 44) Koczan D., Hobom G., Seyfert H.M. (1991) – Genomic organization of the bovine alpha-s1 casein gene. "Nucleic Acids Research.", 19, 5591-5596.
  - 45) Rando A., Di Gregorio P., Ramunno L., Mariani P., Fiorella A., Senese C., Marletta D., Masina P. (1998) – Characterization of the CSN1G allele of the bovine  $\alpha$ s1-casein *locus* by the insertion of a long interspersed element. "Journal of Dairy Science", 81, 1735-1742.
  - 46) Boulanger A., Grosclaude F., Mahé M.F. (1984) – Polymorphisme des caséines  $\alpha$ s1 et  $\alpha$ s2 de la chèvre (*Capra hircus*). "Génétiq. Sélection Evolution", 16, 157-176.
  - 47) Grosclaude F., Mahé M.F., Brignon G., Di Stasio L., Jeunet R. (1987) – A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha$ s1-casein. "Génétiq. Sélection Evolution", 19, 399-412.
  - 48) Lundén A., Nilsson M., Janson L. (1997) – Marked effect of  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. "Journal of Dairy Science", 80, 2996-3005.
  - 49) Brignon G., Ribadeau-Dumas B., Mercier J.C., Pélissier J.P., Das B.C. (1977) – Complete aminoacid sequence of bovine  $\alpha$ s2 casein. "FEBS Letters", 76, 274-279.
  - 50) Ribadeau-Dumas B. (1979) – Progrès récents dans la biochimie des protéines du lait. "Revue Laitière Française", 371, 45-59.
  - 51) Grosclaude F., Mahé M.F., Mercier J.C., Bonnemaire J., Teissier J.H. (1976) – Polymorphisme des lactoprotéines de Bovinés Népalais. II. Polymorphisme des caséines " $\alpha$ s-mineures"; le *locus*  $\alpha$ s2-Cn est-il lié aux *loci*  $\alpha$ s1-Cn,  $\beta$ -Cn et k-Cn? "Annales de Génétique et de Sélection Animale", 8, 481-491.
  - 52) Grosclaude F., Joudrier P., Mahé M.F. (1978) – Polymorphisme de la caséine  $\alpha$ s2 bovine: étroite liaison du *locus*  $\alpha$ s2-Cn avec les *loci*  $\alpha$ s1-Cn,  $\beta$ -Cn et k-Cn; mise en évidence d'une délétion dans le variant  $\alpha$ s2-CnD. "Annales de Génétique et de Sélection Animale", 10, 313-327.
  - 53) Guérin G. (1976) – *Personal communication*, quoted by Grosclaude *et al.*, 1978 [52].
  - 54) Ikonen T., Ruottinen O., Erhardt G., Ojala M. (1996) – Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new k-casein variant. "Animal Genetics", 27, 179-181.
  - 55) Bouniol C., Printz C., Mercier J.C. (1993) – Bovine  $\alpha$ s2-casein is generated by exon VIII skipping. "Gene", 128, 289-293.
  - 56) Michalak W. (1967) – Anomalous electrophoretic pattern of milk proteins. "Journal of Dairy Science", 50, 1319-1320.
  - 57) Merlin P., Di Stasio L. (1979) – Polimorfismo della  $\alpha$ s2-caseina nella razza bovina Pinzgau. Proceedings "Salvaguardia genetica e prospettive per il recupero zootecnico di razze, popolazioni autoctone italiane" 14-15 marzo, Foligno, Italy.
  - 58) Ribadeau-Dumas B., Brignon G., Grosclaude F., Mercier J.C., (1972) – Structure primaire de la caséine  $\beta$  bovine. Séquence complète. "European Journal of Biochemistry", 25, 505-514.
  - 59) Aschaffenburg R. (1961) – Inherited casein variants in cow's milk. "Nature", 192, 431-432.
  - 60) Peterson R.F., Kopfler F.C. (1966) – Detection of new types of  $\beta$ -casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH: a proposed nomenclature. "Biochemical and Biophysical Research Communications", 22, 388-392.
  - 61) Kiddy C.A., Peterson R.F., Kopfler F.C. (1966) – Genetic control of the variants of  $\beta$ -casein A. "Journal of Dairy Science", 49, 742 (abstr.).
  - 62) Aschaffenburg R. (1963) – Inherited casein variants in cow's milk. II. Breed differences in the occurrence of  $\beta$ -casein variants. "Journal of Dairy Research", 30, 251-258.
  - 63) Aschaffenburg R., Sen A., Thompson M.P. (1968) – Genetic variants of casein in Indian and African zebu cattle. "Comparative Biochemistry and Physiology", 25, 177-184.
  - 64) Voglino G.F. (1972) – A new  $\beta$ -casein variant in Piedmont cattle. "Animal Blood Groups and Biochemical Genetics", 3, 61-62.
  - 65) Abe T., Komatsu M., Oishi T., Kageyama A. (1975) – Genetic polymorphism of milk proteins in Japanese Cattle and European Cattle breeds in Japan. "Japanese Journal of Zootechnical Science", 46, 591-599.
  - 66) Grosclaude F. (1975) – Variants génétiques des protéines du lait de vaches mongoles. "Études Mongoles, Cahier du Centre d'études mongoles, Laboratoire d'Éthnologie, Université de Paris X – Nanterre", 6, 81-83.
  - 67) Creamer L.K., Richardson B.C. (1975) – A new genetic variant of  $\beta$ -casein. "New Zealand Journal of Dairy Science and Technology", 10, 170-171.
  - 68) Han S.K., Chung E.Y., Lee K.M. (1983) – Studies on the genetic polymorphism of milk proteins in Korean Cattle. "Proceedings 5th World Conference of Animal Production, Tokyo, Japan, August 14-19", 2, 51-52.
  - 69) Chung E.R., Han S.K., Rhim T.J. (1995) – Milk protein polymorphisms as genetic marker in Korean native cattle. "Asian-Australasian Journal Animal Sciences", 8, 187-194.
  - 70) Han S.K., Shin Y.C. (1996) – Biochemical characterization of the new  $\beta$ -casein variant in Korean Cattle. "Proceedings XXVth International Conference on Animal Genetics, Tours, France, 21-25 July", 144.
  - 71) Visser S., Slangen C.J., Rollema H.S. (1991) – Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. "Journal of Chromatography", 548, 361-370.
  - 72) Visser S., Slangen C.J., Lagerwerf F.M., van Dongen W.D., Haverkamp J. (1995) – Identification of a new genetic variant of bovine  $\beta$ -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. "Journal of Chromatography A", 711, 141-150.
  - 73) Lien S., Rogne S. (1993) – Bovine casein haplotypes: number, frequencies and applicability as genetic markers. "Animal Genetics", 24, 373-376.
  - 74) Chin D., Ng-Kwai-Hang K.F. (1997) – Application of mass spectrometry for the identification of genetic variants of milk proteins. In "Milk Protein Polymorphism", IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, Special Issue no. 9702, 334-339.
  - 75) Dong C., Ng-Kwai-Hang K.F. (1998) – Characterization of a non-electrophoretic genetic variant of  $\beta$ -casein by peptide mapping and mass spectrometric analysis. "International Dairy Journal", 8, 967-972.
  - 76) Di Stasio L. (1983) – Indagine genetica sulle razze bovine Modicana e Cinisara mediante l'analisi dei sistemi proteici del latte. "Rivista di Zootecnia e Veterinaria", 11(1), 70-74.
  - 77) Seibert B., Erhardt G., Senft B. (1987) – Detection of a new k-casein variant in cow's milk. "Animal Genetics", 18, 269-272.
  - 78) Di Stasio L., Merlin P. (1979) – Polimorfismi biochimici del latte nella razza bovina Grigio Alpina. "Rivista di Zootecnia e Veterinaria", 7(2), 64-67.
  - 79) Malik S., Kumar S., Rani R. (2000) – Kappa-casein and  $\beta$ -casein alleles in cross-breed and zebu cattle from India using polymerase chain reaction and sequence specific oligonucleotide probes. "Journal of Dairy Research", 67, in press.
  - 80) Sumner A., Visser S., Slangen C.J., Di Stasio L., Mariani P. (1996) – Occurrence of the  $\beta$ -casein F variant in the milk of Italian Friesian cows. "Annali Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma", 16, 96-102.
  - 81) Mercier J.C., Grosclaude F. (1993) – Génétique moléculaire des protéines du lait et de leurs gènes. In "Biologie de la lactation", INRA Éditions, Versailles, France, 319-347.
  - 82) Krause I., Buchberger J., Lodes A., Klostermeyer H. (1995) – Analysis of milk protein genetic variants and their technological relevance. Proceedings "La certificazione dei prodotti alimentari: il caso del latte", Soc. Editrice "Il mulino", Bologna, Italy,

- 83) Carles C. (1986) – Fractionation of bovine caseins by reverse phase high performance liquid chromatography: identification of a genetic variant. "Journal of Dairy Research", 53, 35-41.
- 84) Merlin P., Di Stasio L. (1982) – Study on milk proteins *loci* in some decreasing Italian cattle breeds. "Annales de Génétique et de Sélection Animale", 14, 17-28.
- 85) Grosclaude F. (1979) – Polymorphism of milk proteins: some biochemical and genetical aspects. "Proceedings XVth Intern. Conf. Animal Blood Grps and Biochem. Polimorph., Leningrad, USSR, 1978", I, 54-92.
- 86) MacKinlay A.G., Wake R.G. (1965) – Fractionation of S-Carboxymethyl-k-casein and characterization of the components. "Biochimica et Biophysica Acta", 104, 167-180.
- 87) Mercier J.C., Brignon G., Ribadeau-Dumas B. (1973) – Structure primaire de la caséine k bovine. Séquence Complète. "European Journal of Biochemistry", 35, 222-235.
- 88) Jollès P., Loucheux-Lefebvre M.H., Henschen A. (1978) – Structural relatedness of k-casein and fibrinogen  $\gamma$ -chain. "Journal of Molecular Evolution", 11, 271-277.
- 89) Mackinlay A.G., Wake R.G. (1964) – The heterogeneity of k-casein. "Biochimica et Biophysica Acta", 93, 378-386.
- 90) Neelin J.M. (1964) – Variants of k-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. "Journal of Dairy Science", 47, 506-509.
- 91) Schmidt D.G. (1964) – Starch-gel electrophoresis of k-casein. "Biochimica et Biophysica Acta", 90, 411-414.
- 92) Woychik J.H. (1964) – Polymorphism in k-casein of cow's milk. "Biochemical and Biophysical Research Communications", 16, 267-271.
- 93) Woychik J.H. (1965) – Phenotyping of k-casein. "Journal of Dairy Science", 48, 496-497.
- 94) Di Stasio L., Merlin P. (1978) – A new k-casein variant in cattle. "Proceedings XVth Intern. Conf. Animal Blood Grps and Biochem. Polimorph., Leningrad, USSR", 97.
- 95) Mariani P. (1983) – Sulla presenza di una terza k-caseina nel latte di vacche di razza Bruna. "Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia", 34, 174-181.
- 96) Gorodetskij S.I., Kaledin A.S. (1987) – Analysis of nucleotide sequence of bovine k-casein. "Genetika, USSR", 23(4), 596-604.
- 97) Erhardt G., Senft B. (1989) – Integration of milk protein variants in bovine breeding programmes using an economical screening method. "Animal Genetics", 20 (Suppl.1), 61.
- 98) Erhardt G. (1989) – k-Kaseine in Rindermilch – Nachweis eines weiteren Allels (k-CnE) in verschiedenen Rassen. "Journal of Animal Breeding and Genetics", 106, 225-231.
- 99) Sulimova G.E., Sokolova S.S., Semikozova O.P., Nguet L.M., Berberov E.M. (1992) – [Analysis of DNA polymorphism of clustered gene in cattle: casein genes and genes of the *BoLA* major histocompatibility complex.] "Tsitologija i Genetika", 26(5), 18-26.
- 100) Sulimova G.E., Badagueva Yu.N., Udina I.G. (1996) – Polymorphism of the k-casein gene in populations of the subfamily Bovinae. "Genetika (Moscow)", 32(11), 1576-1582.
- 101) Erhardt G. (1996) – Detection of a new k-casein variant in milk of Pinzgauer cattle. "Animal Genetics", 27, 105-107.
- 102) Prinzenberg E.M., Erhardt G. (1998) – High-resolution SSCP analysis reveals new alleles at the k-casein (*CSN3*) locus in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. "Proceedings XXVth International Conference Animal Genetics, 9-14 August, Auckland, New Zealand", 17.
- 103) Prinzenberg E.M., Krause I., Erhardt G. (1999) – SSCP analysis at the bovine *CSN3* locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A(1)). "Animal Biotechnology", 10 (1-2), 49-62.
- 104) Prinzenberg E.M., Erhardt G. (1999) – A new *CSN3* allele in *Bos indicus* cattle is characterised by *MspI* PCR-RFLP. "Animal Genetics", 30, 164 (abstr.).
- 105) Krause I., Buchberger J., Weiß G., Klostermeyer H. (1988) – Screening methods for genetic variants of milk proteins. In "Milk Proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects", Eds. C.A. Barth and E. Schlimme, Steinkopff Verlag Darmstadt, Germany, 171-173.
- 106) Bovenhuis H., van Harendonk J.A.M. (1991) – Estimation of milk protein gene frequencies in crossbred cattle by maximum likelihood. "Journal of Dairy Science", 74, 2728-2736.
- 107) Leone P., Scaltriti V., Sangalli S., Caroli A., Pagnacco G. (1998) – Polimorfismo della k-caseina nei bovini: identificazione dell'allele E in torrelli di razza Bruna e Frisona Italiana. "Proceedings IVth National Congress Biodiversity, Alghero, Italy, 8-11 September".
- 108) Miranda G., Anglade P., Mahé M.F., Erhardt G. (1993) – Biochemical characterization of the bovine genetic k-casein C and E variants. "Animal Genetics", 24, 27-31.
- 109) Plowman J.E., Creamer L.K., Smith M.H., Hill J.P. (1997) – Restrained molecular dynamics investigation of the differences in association of chymosin to k-caseins A and C. "Journal of Dairy Research", 64, 299-304.
- 110) Smith M.H., Hill J.P., Creamer L.K., Plowman J.E. (1997) – Towards understanding the variant effect on the rate of cleavage by chymosin on k-casein A and C. "Proceedings IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand, International Dairy Federation, Brussels, Belgium", 185-189.
- 111) Lodes A., Krause I., Buchberger J., Aumann J., Klostermeyer H. (1996) – The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 2. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. "Milchwissenschaft", 51, 543-548.
- 112) Damiani G., Ferretti L., Rognoni G., Sgaramea V. (1989) – RFLPs of bovine k-casein gene. "Animal Genetics", 20(Suppl. 1), 97 (abstr.).
- 113) Sulimova G.E. (1998) – On the nomenclature of k-casein alleles in representatives of subfamily Bovinae. "Russian Journal of Genetics", 34(4), 465-467.
- 114) Woollard J.R., Dentine M.R. (1995) – A novel k-casein allele and implications for genotyping. "Journal of Dairy Science", 78(Suppl. 1), 193.
- 115) Woollard J.R. (1999) – *Personal communication*.
- 116) Prinzenberg E.M., Hiendleder S., Ikonen T., Erhardt G. (1996) – Molecular genetic characterization of new bovine kappa-casein alleles *CSN3F* and *CSN3G* and genotyping by PCR-RFLP. "Animal Genetics", 27, 347-349.
- 117) Udina I.G., Badagueva Yu.N., Sulimova G.E., Zakharov I.A. (1995) – Allele distribution of the k-casein genes in populations of European Bison (*Bison bonasus*). "Genetika (Moscow)", 31(12), 1704-1706.
- 118) Murphy R.F., Downey W.K. (1969) – Milk protein polymorphism in the Kerry breed of cattle. "Journal of Dairy Science", 52, 1113-1115.
- 119) Caroli A., Bolla P., Budelli E., Barbieri G., Leone P. (2000) – Effect of k-casein E allele on clotting aptitude of Italian Friesian milk. "Zootecnica e Nutrizione Animale", *in preparation*.
- 120) Brew K., Castellino F.J., Vanaman T.C., Hill R.L. (1970) – The complete aminoacid sequence of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. "Journal of Biological Chemistry", 245, 4570-4582.
- 121) Barman T.E. (1970) – Purification and properties of bovine milk glyco- $\alpha$ -lactalbumin. "Biochimica et Biophysica Acta", 214(1), 242-244.
- 122) Hopper K.E. (1973) – Apparent heterogeneity of bovine  $\alpha$ -lactalbumin A and B in DEAE-Sephadex chromatography. "Biochimica et Biophysica Acta", 295, 364-370.
- 123) Hopper K.E., McKenzie H.A. (1973) – Minor components of bovine  $\alpha$ -lactalbumin A and B. "Biochimica et Biophysica Acta", 295, 352-363.
- 124) Proctor S.D., Wheelock J.V., Davies D.T. (1974) – Heterogeneity of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. "Biochemical Society Transactions", 2, 621-622.
- 125) Blumberg B.S., Tombs M.P. (1958) – Possible polymorphism of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. "Nature", 181, 683-684.
- 126) Bhattacharya S.D., Roychoudhury A.K., Sinha N.K., Sen A. (1963) – Inherited  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism in Indian zebu cattle. Comparison of zebu and buffalo  $\alpha$ -lactalbumins. "Nature", 197, 797-799.
- 127) Aschaffenburg R. (1963) – Milk Protein Polymorphism. In "Man and Cattle", Ed. A.E. Mourant and F.E. Zeuner, London, UK, 50-54.
- 128) Osterhoff D.R., Pretorius A.M.G. (1966) – Inherited biochemical polymorphism in milk proteins. "Proceedings South African Society of Animal Production", 5, 166-173.
- 129) Marinchuk G.E., Simes G.N. (1969) – Genetically controlled polymorphism of blood and milk proteins in cattle. In "Problemy Zootekhnicheskoy Genetiki", Moscow, 266-284 & 304.
- 130) Jurenkova G., Popovici D. (1970) – [Electrophoretic study of genetic variants of casein and whey proteins in Romanian Brown and Latvian Red cows]. "Lucrarile Stiintifice ale Institutului de Cercetari Zootehnice", 27, 261-268.
- 131) Bettini T.M., Masina P. (1972) – Proteine e polimorfismo proteico del latte vaccino. "Produzione Animale", 11, 107-126.
- 132) Mariani P., Russo V. (1977) – Polimorfismo genetico della  $\alpha$ -lactalbumina nelle razze bovine. "Rivista di Zootecnia e Veterinaria", 5(6), 603-613.
- 133) Bleck G.T., Bremel R.D. (1993) – Sequence and single-base polymorphisms of the bovine  $\alpha$ -lactalbumin 5'-flanking region. "Gene", 126(2), 213-218.
- 134) Palmer A.H. (1934) – The preparation of crystalline globulin from the albumin fraction of cow's milk. "Journal of Biological Chemistry", 104, 359-372.
- 135) Farrell H.M. Jr, Thompson M.P. (1971) – Biological significance of milk protein polymorphism. "Journal of Dairy Science", 54, 1219-1228.
- 136) Hill J.P., Thresher W.C., Boland M.J., Creamer L.K., Anema S.G., Manderson G., Otter D.E., Paterson G.R., Lowe R., Burr R.G., Motion R.L., Winkelman A., Wickham B. (1997) – The polymorphism of the milk protein  $\beta$ -lactoglobulin. A review. In "Milk Composition, Production and Biotechnology", Eds. Welch R.A.S. et al., CAB International, Wallingford, UK, 173-213.
- 137) Braunitzer G., Chen R., Schrank B., Stangl A. (1972) – Automatische sequenz analyse eines proteins ( $\beta$ -lactoglobulin AB). "Hoppe-Seyler's Zeitung für Physiologie und Chemie", 353, 832-834.
- 138) Préaux G., Braunitzer G., Schrank B., Stangl A. (1979) – The aminoacid sequence of goat  $\beta$ -lactoglobulin. "Hoppe-Seyler's Zeitung für Physiologie und Chemie", 360, 1595.
- 139) Bell K., McKenzie H.A., Shaw D.C. (1981) – Bovine  $\beta$ -lactoglobulin E, F and G of Bali (Banteng) Cattle, *Bos (Bibos) javanicus*. "Australian Journal Biological Sciences", 34, 133-147.
- 140) Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell H.M. Jr, Harwalkar V.R., Jenness R., Whitney R.McL. (1984) – Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. "Journal of Dairy Science", 67, 1599-1631.
- 141) Aschaffenburg R., Drewry J. (1955) – Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. "Nature", 176, 218-219.

- 142) Aschaffenburg R., Drewry J. (1957) – Genetics of the  $\beta$ -lactoglobulins of cow's milk. "Nature", 180, 376-378.
- 143) Bell K. (1962) – One-dimensional starch-gel electrophoresis of bovine skim-milk. "Nature", 195, 705-706.
- 144) Bell K., McKenzie H.A. (1964) –  $\beta$ -lactoglobulins. "Nature", 204, 1275-1279.
- 145) Meyer H. (1966) – Zum Polymorphismus der  $\beta$ -Laktoglobuline in deutschen rinderrassen. "Zuchthygiene", 1(2), 49-56.
- 146) Bell K., McKenzie H.A., Murphy W.H. (1966) – Isolation and properties of  $\beta$ -lactoglobulin Droughtmaster. "Australian Journal of Sciences", 29 (3), 87.
- 147) Bell K., McKenzie H.A., Murphy W.H., Shaw D.C. (1970) –  $\beta$ -lactoglobulin Droughtmaster: a unique protein variant. "Biochimica et Biophysica Acta", 214, 427-436.
- 148) Weiß G. (1980) – Ein neues  $\beta$ -Lactoglobulin des Rindes. "Annual Scientific Report, 1979 - 144pp. Inst. für Milchw., Süddeutsche Versuchs und Forschung für Milchw., Weihenstephan Technische Univ., Munchen, Germany", 84.
- 149) Buchberger J., Graml R., Kiermeier F., Kirschmeier O., Pirchner F. (1980) – Genfrequenzen der genetischen Varianten der Milchproteine von seltenen Rassen in Bayern. "Annual Scientific Report, 1979 - 144pp. Inst. für Milchw., Süddeutsche Versuchs und Forschung für Milchw., Weihenstephan Technische Univ., Munchen, Germany", 83.
- 150) Weiß G., Buchberger J., Klostermeyer H. (1982) – Ein neues  $\beta$ -Laktoglobulin des Rindes. "Proceedings XXIth Intern. Dairy Congress, Moscow, USSR", 1(1), 63.
- 151) Davoli R., Dall'Olio S., Bigi D. (1987) – Una nuova variante di  $\beta$ -lactoglobulina nel latte bovino. "Proceedings Società Italiana delle Scienze Veterinarie", Copanello (CZ), Italy, 41, 658-662.
- 152) Davoli R., Dall'Olio S., Bigi D. (1988) – A new  $\beta$ -lactoglobulin variant in bovine milk. "Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia", 39, 439-442.
- 153) Erhardt G., Juszcak J., Panicke L., Krick-Saleck H. (1998) – Genetic polymorphism of milk proteins in Polish Red Cattle: a new genetic variant of  $\beta$ -lactoglobulin. "Journal of Animal Breeding and Genetics", 115, 63-71.
- 154) Baranyi M., Bösze Z.S., Buchberger J., Krause I. (1993) – Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian Spotted and Hungarian Grey cattle: a possible new genetic variant of  $\beta$ -lactoglobulin. "Journal of Dairy Science", 76, 630-636.
- 155) Godovac-Zimmermann J., Krause I., Baranyi M., Fischer-Frühholz S., Juszcak J., Erhardt G., Buchberger J., Klostermeyer H. (1996) – Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine  $\beta$ -lactoglobulins I and J. "Journal of Protein Chemistry", 15, 743-750.
- 156) Grosclaude F., Mahé M.F., Accolas J.P. (1982) – Note sur le polymorphisme génétique des lactoprotéines de bovins et de yaks Mongols. "Annales de Génétique et de Sélection Animale", 14, 545-550.
- 157) Lozovaya G.S. (1973) – [Genetic variation in haemoglobin, transferrin and  $\beta$ -lactoglobulin types in yaks from the Pamirs.] "Tsitologiya i Genetika", 7(2), 158-160.
- 158) Pérez-Beato O. (1979) – Presencia de la variante C del locus  $\beta$ -Lg en el cebu de Cuba. "Revista de Salud Animal", 1(1), 101-103.
- 159) Russo V., Mariani P. (1972) – Polimorfismo genetico delle caseine e della  $\beta$ -lactoglobulina nella razza bovina Modenese. "Rivista di Zootecnia", 45, 43-51.
- 160) Mariani P., Russo V. (1975) – Varianti genetiche delle proteine del latte nella razza Rendena. "Rivista di Zootecnia e Veterinaria", 3(4), 345-348.
- 161) McKenzie H.A., Murphy W.H., Shaw D.C. (1976) – *Unpublished data*, quoted by Bell and McKenzie [162] and by Bell *et al.* [139].
- 162) Bell K., McKenzie H.A. (1976) – The physical and chemical properties of whey proteins. In "Milk Protein Workshop" Tanunda, South Australia. Northfield Research Laboratories South Australian Department of Agriculture, B14-B26.
- 163) Conti A., Napolitano L., Cantisani A.M., Davoli R., Dall'Olio S. (1988) – Bovine  $\beta$ -lactoglobulin H: isolation by preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients and preliminary characterization. "Journal of Biochemical and Biophysical Methods", 16, 205-214.
- 164) Zappacosta F., Di Luccia A., Ledda L., Addeo F. (1998) – Identification of C-terminally truncated forms of  $\beta$ -lactoglobulin in whey from Romagna cows' milk by two dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. "Journal of Dairy Research", 65, 243-252.
- 165) Groenen M.A.M., van der Poel J.J. (1994) – Regulation of expression of milk protein genes: a review. "Livestock Production Science", 38, 61-78.
- 166) Groenen M.A.M., Dijkhof R.J.M., Verstege A.J.M., van der Poel J.J. (1993) – The complete nucleotide sequence of the bovine  $\alpha$ s2-casein gene. "Gene", 123, 187-193.
- 167) Bonsing J., Ring J.M., Stewart A.F., MacKinlay A.G. (1988) – Complete nucleotide sequence of the bovine  $\beta$ -casein gene. "Australian Journal of Biological Sciences", 41, 527-537.
- 168) Alexander L.J., Stewart A.F., MacKinlay A.G., Kapelinskaya T.V., Tkach T.M., Gorodetsky S.I. (1988) – Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. "European Journal of Biochemistry", 178, 395-401.
- 169) Vilotte J.L., Soulier S., Mercier J.C., Gaye P., Hue-Delahaie D., Furet J.P. (1987) – Complete nucleotide sequence of bovine  $\alpha$ -lactalbumin gene. Comparison with its rat counterpart. "Biochimie", 69, 609-620.
- 170) Alexander L.J., Beattie C.W., Hayes G., Pearce M.J., Stewart A.F., MacKinlay A.G., (1992) – Isolation and characterization of the bovine beta-lactoglobulin gene. "Genbank submission number X14710".
- 171) Bleck G.T., Bremel R.D. (1993) – Correlation of the  $\alpha$ -lactalbumin (+15) polymorphism to milk production and milk composition of Holsteins. "Journal of Dairy Science", 76, 2292-2298.
- 172) Mao F.C. (1994) – A bovine  $\alpha$ -lactalbumin gene Mn/I restriction fragment length polymorphism. "Journal of Animal Science", 72, 529.
- 173) Vrech E., Falaki M., Prandi A., Corradini C., Pittotti A., Formigoni A., Massart S., Portetelle D., Burny A., Gengler N., Renaville R. (1997) – Relationships of k-casein,  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin polymorphisms with estimated breeding values for milk traits in Italian Friesian and Italian Simmental bulls. "Zootecnica e Nutrizione Animale", 23, 117-125.
- 174) Lúndén A., Lindersson M. (1998) –  $\alpha$ -lactalbumin polymorphism in relation to milk lactose. "Proceedings VIth World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, NSW, Australia, 11-16 January", 25, 47-50.
- 175) Dall'Olio S., Davoli R., Milc J., Russo V. (1999) – Studio del polimorfismo  $\alpha$ -lactalbumina (+15) in sette razze bovine italiane. "Proceedings Società Italiana delle Scienze Veterinarie", Montecatini Terme, Italy, 53, 393-394.
- 176) Voelker G.R., Bleck G.T., Wheeler M.B. (1997) – Single-base polymorphisms within the 5'-flanking region of the bovine  $\alpha$ -lactalbumin gene. "Journal of Dairy Science", 80, 194-197.
- 177) Chung E.R., Kim D.K. (1999) – DNA genotyping of  $\alpha$ -lactalbumin gene in Korean Holstein population using PCR-RFLP technique. "Korean Journal of Dairy Science", 21(2), 89-94.
- 178) Schild T.A., Wagner V., Geldermann H. (1994) – Variants within the 5'-flanking regions of bovine milk protein genes: I. k-casein-encoding gene. "Theoretical and Applied Genetics", 89(1), 116-120.
- 179) Kaminski S. (1996) – Dde I RFLP at the 5' region of bovine kappa-casein gene. "Journal of Applied Genetics", 37(2), 173-178.
- 180) Damiani G., Budelli E., Florio S., Caroli A., Pagnacco G. (2000) – Polymorphism of k-casein SINE Bov-A2 and CYP21-hydroxylase in some bovine breeds. "Zootecnica e Nutrizione Animale", *in preparation*.
- 181) Weiner A.M., Deninger P.L., Efstradiatis A. (1986) – Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. "Annual Review of Biochemistry", 55, 631-661.
- 182) Bleck G.T., Conroy J.C., Wheeler M.B. (1996) – Polymorphisms in the bovine  $\beta$ -casein 5'-flanking region. "Journal of Dairy Science", 79, 347-349.
- 183) Ford C.A., Connett M.B., Wilkins R.J. (1993) –  $\beta$ -lactoglobulin expression in bovine mammary tissue. "Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production", 53, 167-169.
- 184) Wagner V.A., Schild T.A., Geldermann H. (1994) – DNA variants within the 5'-flanking region of milk protein-encoding genes. II. The  $\beta$ -lactoglobulin-encoding gene. "Theoretical and Applied Genetics", 89, 121-126.
- 185) Lum S.L., Dovic P., Medrano J.F. (1997) – Polymorphisms of bovine  $\beta$ -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. "Journal of Dairy Science", 80, 1389-1397.
- 186) Kaminski S., Zabolewicz T. (1998) – SSCP polymorphism within 5' region of bovine lactoglobulin (LGB) gene. "Journal of Applied Genetics", 39(1), 97-102.
- 187) Zhou J.F., Zadworny D., Kuhnlein U. (1996) – Sequence analysis of the  $\beta$ -lactoglobulin locus in Holsteins identifies two new restriction fragments length polymorphisms. "Canadian Journal of Animal Science", 76, 299-303.
- 188) Grosclaude F., Garnier J., Ribadeau-Dumas B., Jeunet R. (1964) – Étroite dépendance des *loci* contrôlant le polymorphisme des caséines  $\alpha$ s et  $\beta$ . "Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences (Paris)", 259, 1569-1571.
- 189) Grosclaude F., Pujolle J., Garnier J., Ribadeau-Dumas B. (1965) – Déterminisme génétique des caséines k du lait de vache; étroite liaison du *locus* k-Cn avec les *loci*  $\alpha$ s-Cn et  $\beta$ -Cn. "Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences (Paris)", 261, 5229-5232.
- 190) Womack J.E., Threadgill D.W., Moll Y.D. (1989) – Synthetic mapping of 37 *loci* in cattle Chromosomal conservation with mouse and man. "Cytogenetics and Cell Genetics", 51, 1109 (abstr.).
- 191) Ferretti L., Leone P., Sgarrella V. (1990) – Long range restriction analysis of the bovine casein genes. "Nucleic Acids Research", 18, 6829-6833.
- 192) Threadgill D.W., Womack J.E. (1990) – Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. "Nucleic Acids Research", 18, 6935-6942.
- 193) Hayes H.C., Petit E.J. (1993) – Mapping of the  $\beta$ -lactoglobulin gene and immunoglobulin M heavy chain-like sequence to the homologous cattle, sheep and goat chromosomes. "Mammalian Genome", 4, 207-210.
- 194) Soulier S., Mercier J.C., Vilotte J.L., Anderson J., Clark A.J., Provot C. (1989) – The bovine and ovine genomes contain multiple sequences homologous to the  $\alpha$ -lactalbumin-encoding gene. "Gene", 83, 331-338.
- 195) Vilotte J.L., Soulier S., Printz C., Mercier J.C. (1991) – Complete nucleotide sequence of goat  $\alpha$ -lactalbumin-encoding gene: comparison with its bovine counterpart and evidence of  $\alpha$ -lactalbumin related sequence in goat genome. "Gene", 98, 271-276.

# EFFECTS OF THE HOT-HUMID CLIMATE ON RENNET-COAGULATION PROPERTIES OF MILK PRODUCED DURING SUMMER MONTHS OF 1998 AND RELATIONSHIPS WITH THE HOUSING SYSTEMS IN THE REARING OF ITALIAN FRIESIAN COWS<sup>1</sup>

Andrea Summer<sup>2</sup>, Paolo Formaggioni<sup>2</sup>, Flavio Tosi<sup>3</sup>, Enrico Fossa<sup>3</sup>, Primo Mariani<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The research was supported by the experimental program of the Emilia-Romagna region, with the technical-organising coordination of the Centro Ricerche Produzioni Animali (C.R.P.A.) of Reggio Emilia.

<sup>2</sup> *Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione, Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma.*

<sup>3</sup> *Centro Lattiero Caseario, via Torelli 17, 43100 Parma.*

## Introduction

Climatic conditions affect the welfare state of dairy cows, more or less significantly influencing the performance, not only for quantitative aspects but also for qualitative ones (1-4). The exceptional metabolic effort, peculiar of milk production, proportional to its quantity, needs a remarkable heat dispersion into the environment, functional to the maintenance of the body temperature (5-7).

High environmental temperatures, especially in presence of excessive humidity, determine considerable changes in the main physiological parameters of the cow, and significant variations to the energy, protein and mineral metabolism (8-12).

Productive efficiency of the net energy reduces, dry matter intake lowers, water consumption increases, efficiency in the absorption of the nutrients worsens, dismetabolic effects consequent to hyperventilation arise, etc.: all these conditions negatively affect the productive performance of lactating cow (13-16).

Climatic conditions, together with physiological and feeding factors, contribute remarkably to determine significant seasonal variations of milk organic and inorganic components (17-19), that have repercussions on its technological features in several manufacturing processes (20-23) and take a very particular role in cheese productions, especially in the varieties characterised by peculiar qualitative requisites (24). Under this profile, also in temperate zones, in hot-humid climate conditions, as happens during Summer in the Po Valley plain, sometimes significant effects can be recorded towards the dairy-technological features of milk (25), particularly regard to its rennet-reactivity (26-33), with important repercussions on the quality of several varieties of cheese, in particular hard cheeses (25).

Aim of this work was to study the variations of the main milk rennet-coagulation properties in relation to the unfavourable environmental conditions of hot-humid climate that have characterised the 1998 Summer months in the Parmigiano-Reggiano cheese production area.

## **Materials and Methods**

The study was carried out on 528 bulk milk samples from individual herds of Italian Friesian cows. The milk of each herd was collected monthly from January to December 1998. In Figure 1 are represented the monthly values regarding the *maximum* temperature and water vapour tension recorded during the year, compared to the 1968–97 ones; the values of THI (Temperature Humidity Index) were calculated according to Kelly and Bond (34).

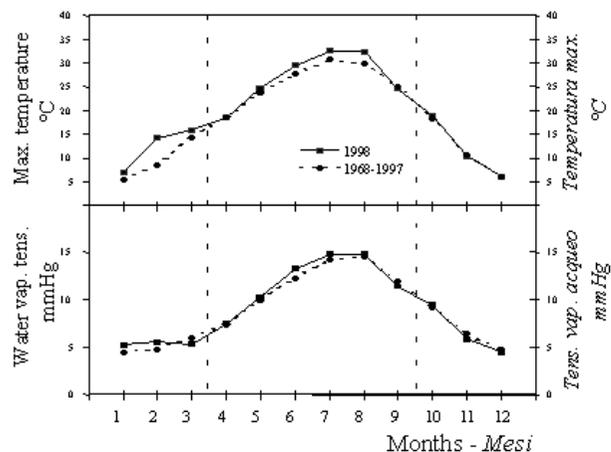


Figure 1. Monthly mean values of the maximum temperature and the water vapour tension during 1998.

Figura 1. Valori medi mensili della temperatura massima e della tensione del vapore acqueo durante l'anno 1998.

44 dairy herds were examined. The milk was collected from 5 cheese factories producing Parmigiano-Reggiano, in 4 different municipal districts of the medium and low plain in the province of Parma.

The study involved 22 tie-stall herds (7 of traditional type and 15 of modern type) and 22 free-stall herds (11 deep litter and 11 cubicles). The first ones, with variable dimension from 20 to 80 cows ( $34.2 \pm 13.7$ ), constitute a livestock of 752 lactating cows; free-stall herds, instead, with variable dimension from 70 to 220 cows ( $117.2 \pm 39.8$ ), represent 2578 cows, almost equally distributed between "deep litter" and "cubicles".

On bulk milk samples, representing morning milk production of each herds, were carried out the following analysis: acidity, by titration of 50 ml of milk with 0.25N sodium hydroxide (35); lactodynamographic parameters according to Annibaldi *et al.* (36), with Formagraph;  $r$  = clotting time;  $k_{20}$  = curd firming time;  $a_{30}$  = curd firmness measured 30 min after rennet addition; on the lactodynamographic chart were measured also curd firmness (a) adjusted for the clotting time ( $1/2r$ ) (37); fat and protein, by means of infrared lectures (38), with Milko-Scan 134 A/B; casein, calculated from the crude protein  $\times 0.77$ ; somatic cells, by means fluoro-opto-electronic counting (39) with Foss-o-Matic 250.

Statistical significance of the differences among mean monthly values of the parameters was analysed by ANOVA after control of variance homogeneity (Bartlett test).

## Results and Discussion

During 1998, climatic conditions of Summer months result particularly unfavourable for the rearing of dairy cow (9) compared to the average ones of the thirty years 1968–97 (Figure 1). In June, July and August *maximum* temperature results on average higher of at least 2°C. The highest differences are registered in correspondence of the third decade of June (32.8 vs 29.0 °C) and July (34.7 vs 31.3 °C) and the first two decades of August (33.5 vs 31.2 °C; 33.9 vs 30.3 °C).

The same fact happens for water vapour tension, that attains the *maximum* values and the *maximum* differences during the third decade of July (mmHg: 16.9 vs 14.8) and the second decade of August (mmHg: 16.8 vs 14.8).

Corresponding to those seasonal phases THI value is 85, particularly unfavourable for the metabolic-nutritional *status* of the dairy cow (4), 4 units higher than the comparison values and markedly higher than those characterising the welfare state of the dairy cow (*max.* 70–72 THI); the *maximum* difference corresponds to the third decade of June (THI: 83 vs 78).

*a) Rennet-coagulation properties of milk produced during hot months.* - During the year all lactodynamographic parameters change with statistically significance (Table 1). The most important variations are observed in correspondence of the hot-humid months, especially for curd firming time and curd firmness, characteristics between them closely correlated in a negative way (40). In the July and August months clotting time increases considerably, reaching values of 20.7 and 21.2 min, higher respectively of 9.9% and 12.9% compared to the annual average one, equal to 18.8 min (Figure 2). Such variation finds an explanation in the lessening of the titratable acidity, lessening very marked in correspondence of the August month (Table 1).

Table 1. Monthly mean values of rennet- coagulation properties of the milk during 1998 (44 herds; 12 samplings per herd; 528 herd milk samples).

Tabella 1. Valori medi mensili delle caratteristiche di coagulazione del latte durante l'anno 1998 (44 allevamenti; 12 prelievi per allevamento; 528 lattini di stalla).

Months - Mesi →		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	P
$t^{(1)}$	min	17.5	18.7	17.3	17.5	17.8	18.4	20.7	21.2	19.1	19.0	18.9	19.5	****
$k_{20}^{(2)}$	min	10.9	13.2	13.2	16.0	14.0	20.9	18.2	21.8	18.4	13.0	12.8	16.7	****
$a_{30}^{(3)}$	mm	22.7	19.1	20.2	18.4	19.4	13.8	13.4	10.2	15.1	19.0	19.0	16.0	****
$a_{1/2r}^{(4)}$	mm	16.9	15.9	14.7	14.0	14.5	11.7	12.5	10.7	13.3	16.2	16.1	14.1	****
T.A. <sup>(5)</sup>	°SH/50ml	3.33	3.34	3.27	3.28	3.26	3.30	3.25	3.18	3.29	3.24	3.27	3.34	****
S.C. <sup>(6)</sup>	10 <sup>3</sup> /ml	279	301	305	297	363	340	395	406	405	371	322	269	**
Case. <sup>(7)</sup>	%	2.47	2.44	2.40	2.40	2.38	2.35	2.36	2.34	2.41	2.49	2.52	2.51	****
Fat. <sup>(8)</sup>	%	3.61	3.56	3.48	3.45	3.45	3.36	3.38	3.37	3.39	3.60	3.67	3.65	****

Notes - Note: <sup>(1)</sup> Clotting time - *Tempo coagulazione*; <sup>(2)</sup> Curd firming time - *T. rassodamento*; <sup>(3)</sup> Curd firmness - *Consistenza coagulo*; <sup>(4)</sup> Curd firmness - *Consistenza coagulo*; <sup>(5)</sup> Titratable acidity - *Acidità titolabile*; <sup>(6)</sup> Somatic cells - *Cellule somatiche*; <sup>(7)</sup> Casein - *Caseina*; <sup>(8)</sup> Fat - *Grasso*. \*\* P<0.01; \*\*\*\* P<0.0001

Milk produced in August makes to record a particularly high curd firming time (21.8 min), just higher of 38.5 % compared to the annual average one (15.8 min), index of an insufficient aggregation ability of the para-casein micelles, which follows, therefore, a slow curd formation. This phenomenon appears in large part related to the low acidity of milk (Table 1), as well as to the smaller availability of ionic calcium and para-k-casein, factors that affect significantly the rate of casein *reticulum* formation (41). It's an anomalous condition, most probably related to modifications of the metabolic-nutritional *status* of the cows (42, 43), consequent to the influence of the particularly unfavourable climate (4, 25) that characterises this seasonal period. The anomalous value of the curd firming time, that is already evidenced in June (Figure 2), tends to characterise also the July month and to persist in September.

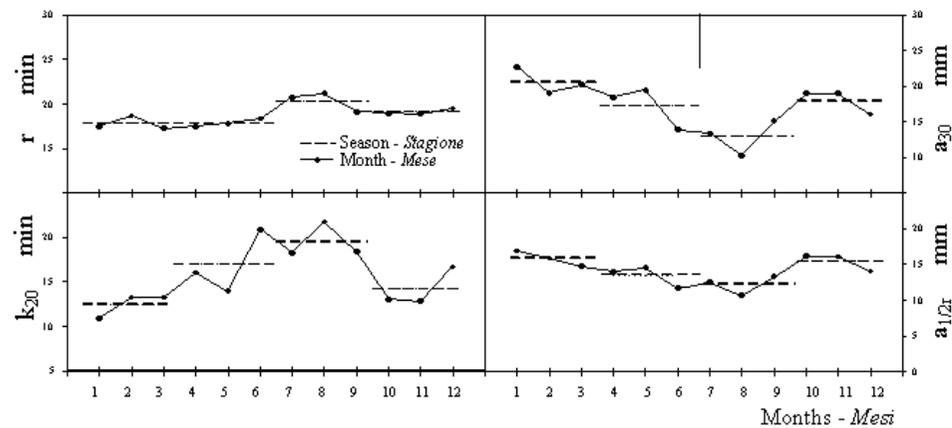


Figure 2. Monthly mean values of rennet-coagulation properties of the milk during 1998 (44 herds; 12 samplings per herd; 528 herd milk samples). See notes table 1.

Figura 2. Valori medi mensili delle caratteristiche di coagulazione del latte durante l'anno 1998 (44 allevamenti; 12 prelievi per allevamento; 528 lattini di stalla).

Important are the effects on the curd firmness measured 30 min after rennet addition, nevertheless the relatively moderate variations regarding the content in casein of the milk (Table 1). Milk produced in August gives rise to a curd very anomalous, characterised by a low firmness (10.2 mm), inferior of 40.7 % respect to the annual average one (17.2 mm).

Also milks produced in June and July, and partially those produced in September, give rise to weak rennet-curds (Figure 2). The negative effect is confirmed by the trend of the curd firmness (a) adjusted for the clotting time (1/2 r), whose values, in August, are rather low (10.7 mm), inferior of 24.7 % compared to the annual average one (14.2 mm); an analogous situation is recorded also in the June and July months.

Seasonal variations of the milk coagulation properties, with particular regard to the Summer period, confirm the results observed in other researches (26, 28-30, 44, 45). The more marked negative effects of the hot-humid conditions of the 1998 year can be compared with the analogous trends reported by Mariani *et al.* (33), particularly with reference to the clotting time of the milk.

*b) Comparison between tie-stall and free-stall.* - Milk produced in free-stall barn herds (L), provided of a lightly higher casein content and a greater degree of titratable acidity, presents better rennet-coagulation properties than that produced in tie-stall barn herds (F) (Table 2).

Table 2. Rennet-coagulation properties of the milk produced in 22 tie-stall barns – F and in 22 free-stall barns – L. 12 samplings per herd.

*Tabella 2. Caratteristiche di coagulazione del latte prodotto in 22 stalle a stabulazione fissa - F e in 22 stalle a stabulazione libera - L. 12 prelievi per allevamento.*

Months - Mesi →		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$
$r^{(1)}$	F	17.5	19.1	17.6	17.8	17.8	18.2	20.9	21.4	19.6	18.8	19.4	20.0	19.0
	min L	17.5	18.3	17.0	17.2	17.7	18.7	20.4	21.0	18.6	19.1	18.3	19.0	18.6
$k_{10}^{(2)}$	F	11.6	14.5	14.8	16.7	14.2	21.0	19.3	21.5	21.1	14.1	14.1	16.2	16.6
	min L	10.3	11.9	11.7	15.3	13.8	20.8	17.1	22.2	15.8	12.0	11.5	17.2	15.0
$a_{30}^{(2)}$	F	21.8	17.8	18.4	17.3	19.1	13.9	12.5	10.0	12.8	17.9	17.1	15.2	16.2
	mm L	23.6	20.3	22.0	19.5	19.7	13.7	14.3	10.3	17.4	20.0	20.9	16.8	18.2
$a_{1/r}^{(4)}$	F	16.3	15.4	13.7	13.5	14.3	11.5	11.7	10.8	12.1	15.2	15.5	14.1	13.7
	mm L	17.6	16.5	15.8	14.4	14.6	12.0	13.3	10.6	14.5	17.3	16.8	14.1	14.8
T.A. <sup>(5)</sup>	F	3.26	3.26	3.21	3.21	3.20	3.23	3.18	3.11	3.22	3.16	3.20	3.25	3.21
	°SH/50 ml L	3.40	3.41	3.34	3.35	3.31	3.38	3.31	3.25	3.35	3.32	3.34	3.42	3.35
S.C. <sup>(6)</sup>	F	322	340	372	325	442	372	456	466	497	476	395	295	396
	10 <sup>3</sup> /ml L	237	262	238	268	283	308	334	346	313	267	250	243	279
Cas. <sup>(7)</sup>	F	2.43	2.40	2.36	2.36	2.36	2.32	2.35	2.32	2.39	2.45	2.48	2.47	2.39
	% L	2.50	2.48	2.44	2.45	2.40	2.38	2.37	2.36	2.44	2.52	2.56	2.56	2.45
Fat. <sup>(8)</sup>	F	3.69	3.63	3.55	3.53	3.52	3.43	3.47	3.43	3.46	3.67	3.74	3.67	3.57
	% L	3.53	3.48	3.40	3.38	3.38	3.30	3.28	3.32	3.32	3.52	3.60	3.63	3.43

Notes – Note: See notes of Table 1 – Vedi note tabella 1.

This effect is observed also during the Summer months, but only partially in August; in June considerable differences are not noticed. In the months of July, August and September the milk obtained from free-stall reared cows tends to be more reactive with the rennet (min: 20.6 F vs 20.0 L) but not in a statistically significant way (Figure 3). Also curd firming time results more favourable in the free-stall milk (min: 20.6 F vs 18.3 L; P<0.05), as well as happens for curd firmness measured 30 min after the addition of the rennet (mm: 11.8 F vs 14.0 L; P<0.05).

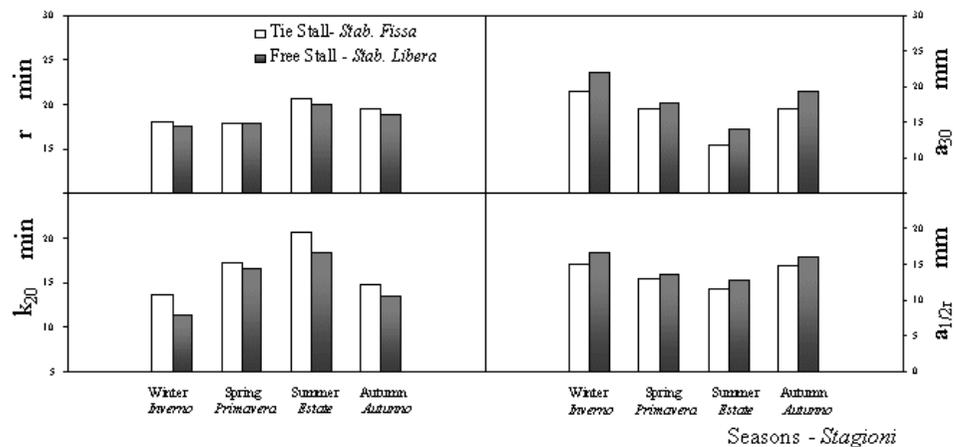


Figure 3. Rennet-coagulation properties of the milk produced in 22 tie-stall barns - F and in 22 free-stall barns - L. 12 samplings per herd. See notes table 1.

Figura 3. Caratteristiche di coagulazione del latte prodotto in 22 stalle a stabulazione fissa - F e in 22 stalle a stabulazione libera - L. 12 prelievi per allevamento.

These specific differences, besides of equal entity with respect of those observed also in the course of the winter (Figure 3), appear very probably well related with the relatively better climatic conditions that during the Summer period establish in the free-stall, conditions that are more favourable for the cow in full milk production in comparison with those of the tie-stall ones. Under this profile, data collected show some differences also between "deep litter" type herds (Llp) and "cubicles" ones (Lc), just in correspondence of the hot months: the cows reared in the "cubicles" seem to be able to better tolerate the unfavourable climatic conditions compared to those maintained on "deep litter" (Figure 4).

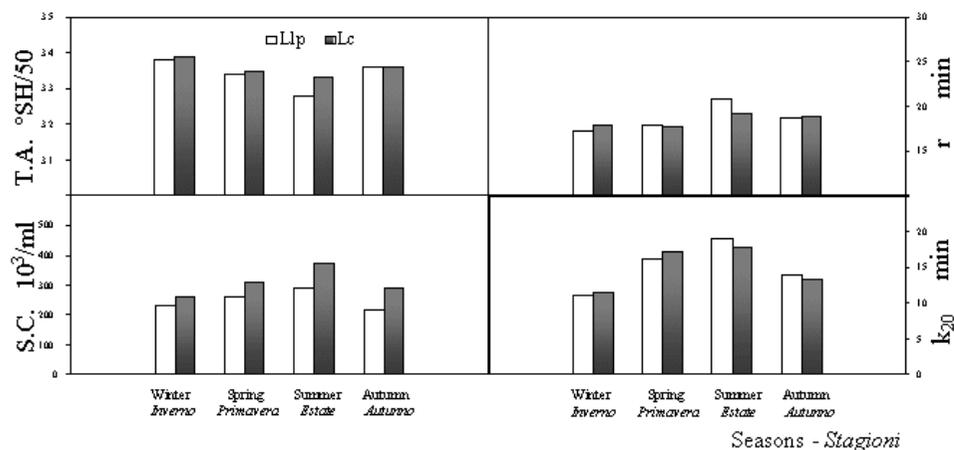


Figure 4. Rennet-coagulation properties of the milk produced in different typology of free-stall barns: deep litter - Llp (n=11 herds) and cubicles - Lc (n=11 herds). 12 samplings per herd. See notes of table 1.

Figura 4. Caratteristiche del latte di 11 stalle a stabulazione libera su lettiera permanente - Llp e 11 a cuccette - Lc. 12 prelievi per allevamento. Vedi note tabella 1.

In the case of the "deep litter", in fact, in the months of July and August is recorded a marked decrease of titratable acidity ( $^{\circ}\text{SH}/50 \text{ ml}$ : 3.25 Llp vs 3.32 Lc) with negative effects on the milk clotting time (min: 21.9 Llp vs 19.5 Lc), on the curd firming time (min: 21.2 Llp vs 18.0 Lc) and on the curd firmness (mm: 10.1 Llp vs 14.6 Lc), more marked than those observed for the "cubicles" free-stall. From the comparison instead significant seasonal differences between traditional and modern tie-stall are not observed.

## Conclusions

The results suggest that the unfavourable climatic conditions of temperature and humidity, that usually characterise the Summer period in the plain areas of Parmigiano-Reggiano cheese production, and in particular those persistent peculiar of 1998, appear to be able to influencing the physiological behaviour of the lactating cow until altering its nutritional and metabolic *status* in such a way as to affect significantly the rennet-reactivity of the milk, and therefore its total aptitude to the cheesemaking.

The hot-humid conditions of 1998 Summer slow down in a significant way also the rate of the primary phase of the coagulation, characterised by a strictly enzymatic nature, as well as, in particular way, the aggregation rate of the para-casein micelles, phenomenon of physico-chemical nature that characterises the start of the milk coagulation in proper sense. The markedly anomalous trend of this last characteristic involves, in adding to the lessening of the titratable acidity, also the presence of possible alterations at level of the salt equilibria of the milk. The milk produced in August gives rise to a rennet-curd with very low firmness, most probably characterised by a scarce syneresis aptitude, destined to give little and not uniformly dehydrated cheese masses, easily subjected to anomalous fermentations.

The cows reared in free-stall, probably in relationship to an environmental condition relatively more favourable, produce milk that, also in hot-humid climate conditions, gives lightly better rennet-coagulation properties in comparison with those of the milk produced by cows reared in the tie-stall barn. During the 1998 Summer the cows reared on "deep litter" tend to be severely affected by the negative effects of the unfavourable climatic conditions compared to those reared in "cubicles".

Key words: Friesian dairy cows, milk yield, hot-humid climate, housing systems, milk rennet-coagulation, curd firming time, curd firmness.

Parole chiave: Vacche Frisone, produzione latte, clima caldo umido, tipo di stabulazione, coagulazione presamica, tempo rassodamento coagulo, consistenza coagulo.

Summary - Seasonal variations of rennet-coagulation properties of milk produced during the year 1998 in Parma province plain dairy herds and destined to Parmigiano-Reggiano cheese production were studied. The research was carried out on 528 bulk milk samples from Italian Friesian cows reared in 44 dairy herds, equally distributed between tie-stall and free-stall, monthly collected from January to December. Rennet-coagulation properties, analysed by Formagraph, vary significantly ( $P < 0.0001$ ) during the year because of the changes of the physiological state of the cows and of the nutritional and climatic conditions. Average monthly values, compared with the average value of the year, result highest in August, both for clotting time (min: 21.2 vs 18.8) both for curd firming time (min: 21.8 vs 15.8); therefore milk produced in August gives the worst values of curd firmness ( $a_{30}$ , mm = 10.2 vs 17.2;  $a_{1/2r}$ , mm = 10.7 vs 14.2). In the same month, casein (2.34 vs 2.42 %) and titratable acidity ( $^{\circ}\text{SH}/50 \text{ ml}$ : 3.18 vs 3.28) result lowest; this last parameter is also significantly affected by the housing system ( $^{\circ}\text{SH}/50 \text{ ml}$ : 3.11 for tie-stall vs 3.25 for free-stall;  $P < 0.01$ ). Milk produced in free-stall herds reveals, also during Summer months, better rennet-coagulation properties compared with that produced in tie-stall herds.

Riassunto - Effetti delle condizioni di clima caldo-umido sulle caratteristiche di coagulazione del latte prodotto durante l'estate 1998 e rapporti con il tipo di stabulazione nell'allevamento di vacche di razza Frisone.

Sono state studiate le variazioni stagionali delle caratteristiche di coagulazione del latte prodotto durante il 1998 presso allevamenti della pianura parmense e destinato alla trasformazione in Parmigiano-Reggiano. L'indagine è stata condotta su 528 campioni di latte di massa di 44 allevamenti di vacche di razza Frisone, equamente ripartiti tra stabulazione fissa e libera, controllati mensilmente da gennaio a dicembre. Le caratteristiche di coagulazione, rilevate mediante Formagraph, si modificano significativamente ( $P < 0.0001$ ) nel corso dell'anno per effetto delle variazioni dello stato fisiologico delle bovine e delle condizioni alimentari e climatiche. In agosto si registrano i valori medi mensili più elevati, rispetto alla media annua, sia per il tempo di coagulazione del latte (21,2 vs 18,8 min), che per il tempo di rassodamento del coagulo (21,8 vs 15,8 min); conseguentemente il latte prodotto in agosto fornisce i coaguli dotati di minore consistenza ( $a_{30} = 10,2$  vs 17,2 mm;  $a_{1/2r} = 10,7$  vs 14,2 mm). Nello stesso mese si osservano i valori più bassi di caseina (2,34 vs 2,42 %) e di acidità titolabile (3,18 vs 3,28  $^{\circ}\text{SH}/50 \text{ ml}$ ), parametro quest'ultimo che risulta influenzato significativamente anche dal tipo di stabulazione (3,11 fissa vs 3,25 libera;  $^{\circ}\text{SH}/50 \text{ ml}$ ;  $P < 0,01$ ). Il latte prodotto negli allevamenti a stabulazione libera presenta, anche durante il periodo estivo, migliori caratteristiche di coagulazione rispetto a quello degli allevamenti a stabulazione fissa.

## References

- 1) Bianca W. (1965) - Cattle in a hot environment. "J. Dairy Res.", 32, 291-345.
- 2) Pan Y.S., McLean D.M., Graham E.R.B., Ellis N.J.S. (1978) - Effect of heat stress on the protein composition and manufacturing properties of milk from two diverse breeds of dairy cattle. 20th Int. Dairy Congr., 1E, 28-29.
- 3) Johnson H.D. (1987) - Bioclimate effects on growth, reproduction and milk production. In: H.D. Johnson (ed.) "Bioclimatology and the adaptation of livestock", 35-57.
- 4) Calamari L., Abeni F. (1995) - Influenza dello stress termico sui parametri riproduttivi e produttivi della bovina da latte. In: C.E.R.A.S., A.A.S.V.T. e C.R.P.A. (ed.ri) "Vacca da latte e stress da caldo", 4-65.
- 5) Thompson G.E. (1973) - Climatic physiology of cattle. "J. Dairy Res.", 40, 441-473.
- 6) Fuquay J.W. (1981) - Heat stress as it affects animal production. "J. Anim. Sci.", 52, 164-174.
- 7) Shafie M.M. (1991) - Endocrinological and neurological systems in body thermoregulation. Proc. Inter. Symp. "Animal Husbandry in Warm Climates", EAAP, publ. no. 55, 1-14.
- 8) Schneider P.L., Beede D.K., Wilcox C.J. (1988) - Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. "J. Anim. Sci.", 66, 112-125.
- 9) Cappa V., Vazhapilly P., Maianti M.G., Lombardelli R., Frazzi E. (1989) - Effetti delle variazioni ambientali (microclima) sulle performances di vacche da latte. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 40, 98-115.
- 10) Vazhapilly P., Frazzi E., Lombardelli R., Maianti M.G., Cappa V. (1990) - Influenza del microclima sulla risposta fisiologico-metabolica delle bovine e sulla qualità del latte. "Ann. Fac. Agr., Univ. Piacenza", 30, 77-83.
- 11) Webster A.J.F. (1991) - Metabolic responses of farm animals to high temperature. Proc. Inter. Symp. "Animal Husbandry in Warm Climates", EAAP, publ. no. 55, 15-22.
- 12) Ronchi B., Bernabucci U., Lacetera N., Nardone A. (1997) - Effetti dello stress termico sullo stato metabolico-nutrizionale di vacche Frisone in lattazione. "Zoot. Nutr. Anim.", 23, 3-15.
- 13) Collier R.J., Beede D.K., Thatcher W.W., Israel L.A., Wilcox C.J. (1982) - Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. "J. Dairy Sci.", 65, 2213-2227.
- 14) Nardone A., Lacetera N.G., Ronchi B., Bernabucci U. (1992) - Effetti dello stress termico sulla produzione di latte e sui consumi alimentari di vacche Frisone. "Prod. Anim.", 5 (III serie), 1-15.
- 15) Sanchez W.K., Mc Guire M.A., Beede D.K. (1994) - Macromineral nutrition by heat stress interactions in dairy cattle: review and original research. "J. Dairy Sci.", 77, 2051-2079.
- 16) Ronchi B. (1998) - Nutrition and feeding of dairy cattle during hot weather. "Zoot. Nutr. Anim.", 24, 283-293.

- 17) Mahieu H. (1985) - Facteurs de variation de la composition du lait. In: M. Luquet (Coord.) "Laits et produits laitiers", vol 1, 119-183. Ed. Technique et Documenta-tion, Lavoisier, Paris, France.
- 18) Vermeulen G.T.J. (1987) - Heat stress and its effect on milk production, milk quality and reproduction. In "Nat. Dairy Cattle Performance and Progeny Testing Scheme". "Ann. Report, South Africa", 7, 79-101.
- 19) Mariani P., Zanzucchi G., Bianco P., Masoni M. (1993) - Variazioni stagionali del contenuto in fosforo del latte di massa di singoli allevamenti. "L'industria del Latte", 29(1), 39-53.
- 20) Bruhn J.C., Franke A.A. (1977) - Monthly variations in gross composition of California herd milks. "J. Dairy Sci.", 60, 696-700.
- 21) Phelan J.A., O'Keefe A.M., Keogh M.K., Kelly P.M. (1982) - Studies of milk composition and its relationship to some processing criteria. I. Seasonal changes in the composition of Irish milk. "Ir. J. Fd Sci. Technol.", 6, 1-11.
- 22) Sommerfeldt J.L., Baer R.J. (1986) - Variability of milk components in 1705 herds. "J. Food Protection", 49, 729-733.
- 23) Coulon J.B. (1994) - Effets du stade physiologique et de la saison sur la composition chimique du lait de vache et ses caractéristiques technologiques. "Rec. Méd. Vét.", 170, 367-374.
- 24) Resmini P., Volonterio G., Prati F., Pazzaglia C., Motti G. (1982) - Caratteristiche del latte e fenomeni rilevati in caldaia nella lavorazione a formaggio Grana Padano. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 33, 229-264.
- 25) Calamari L., Mariani P. (1998) - Effects of the hot environment conditions on the main milk cheesemaking properties. "Zoot. Nutr. Anim.", 24, 259-271.
- 26) Fossa E., Pecorari M., Mariani P. (1984) - Variazioni stagionali dell'acidità e delle caratteristiche di coagulazione del latte. "L'Industria del Latte", 20 (1), 87-97.
- 27) Mariani P., Zanzucchi G., Pecorari M., Fossa E. (1991) - Variazioni dell'acidità e del tempo di coagulazione del latte in rapporto all'allevamento ed alla stagione di produzione. "Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma", 9, 277-289.
- 28) Mariani P., Zanzucchi G., Pozzatti A., Summer A., Fossa E., Pecorari M. (1994) - Variazioni mensili dell'acidità e delle caratteristiche di coagulazione del latte nel corso di un triennio. "Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma", 14, 133-148.
- 29) Calamari L., Calegari F., Maianti M.G., Abeni F., Cappa V. (1996) - Variazioni dell'attitudine alla coagulazione del latte in bovine Frisone primipare e pluripare nel periodo estivo. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 50, 491-492.
- 30) Chiavari C., Castagnetti G.B., Ferri G., Gambini G. (1996) - Composizione ed attitudine casearia del latte di caldaia in zona Parmigiano-Reggiano: fattori di variazione e riflessi sulla tecnologia. Atti Soc. Ital. Buiatria, 28, 371-388.
- 31) Fossa E., Sandri S., Mariani M.S., Summer A., Mariani P. (1996) - Il comportamento tecnologico-caseario del latte prodotto durante il periodo estivo: osservazioni su lattini individuali di vacche di razza Frisone. "Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma", 16, 103-112.
- 32) Mariani P., Summer A., Martuzzi F., Catalano A.L. (1998) - Seasonal variations of milk rennetability: summertime worsening of curd firming rate of Friesian herd milks yielded in the Po Valley plain. Proc. Inter. Symp. "Livestock production and climatic uncertainty in the Mediterranean", Agadir (Marocco) 22-24 October - EAAP, publ. no 94 (*in press*).
- 33) Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Beltrami A., Sandri S. (1998) - Andamento mensile delle principali caratteristiche di coagulazione del latte di singoli allevamenti di vacche di razza Frisone con particolare riguardo alla velocità di formazione del coagulo. "Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma", 18, 75-93.
- 34) Kelly C.F., Bond T.E. (1971) - "Bioclimatic factors and their measurement. A guide to environmental research on animals". National Academy of Sciences, Washington, U.S.A.
- 35) Anon. (1963) - Determinazione del grado di acidità del latte secondo Soxhlet-Henkel. "Milchwissenschaft", 18, 520.
- 36) Annibaldi S., Ferri G., Mora R. (1977) - Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: tipizzazione lattodinamografica. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 28, 115-126.
- 37) Mariani P., Meazza M., Resmini P., Pagani M.A., Pecorari M., Fossa E. (1986) - Osservazioni su tipi di beta-caseina e caratteristiche di coagulazione del latte. "L'industria del Latte", 22(1), 35-58.
- 38) Biggs D.A. (1978) - Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk: collaborative study. "J. Assoc. Off. Anal. Chem.", 61, 1015-1034.
- 39) Schmidt Madsen P. (1975) - Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk. "J. Dairy Res.", 42, 227-239.
- 40) Mariani P., Zanzucchi G., Summer A., Fossa E., Pecorari M. (1997) - Rapporti tra contenuto di caseina e consistenza del coagulo in lattini individuali di vacche di razza Bruna. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 51, 407-408.
- 41) Mariani P. (1989) - Attitudine del latte alla coagulazione presamica : ruolo dell'acidità nella produzione di formaggi a lunga maturazione. "Obiettivi e Documenti Veterinari", 10(2), 13-22.
- 42) Famigli Bergamini P. (1987) - Rapporti tra patologia (non mammaria) ed aspetti quali-quantitativi del latte nella bovina. Atti Soc. Ital. Buiatria, 19, 89-99.
- 43) Bertoni G. (1996) - Ambiente, alimentazione e qualità del latte. "L'Informatore Agrario", 52 (21) (suppl.), 5-41.
- 44) Ohashi T., Haga S., Yamauchi K., Katayama H., Olson N.F. (1982) - Seasonal variations in physical properties of milk rennet curd. "Jpn. J. Zootech. Sci.", 53, 445-447.
- 45) Coulon J.B., Roybin D., Congy E., Garret A. (1988) - Composition chimique et temps de coagulation du lait de vache : facteurs de variations dans les exploitations du pays de Thônes. "INRA Prod. Anim.", 1, 253-263.

## Potenziali Evocati Uditivi per Stimolazione Ossea: esperienze personali

Maurizio Dondi, Ezio Bianchi

*Istituto di Clinica Medica Veterinaria dell'Università di Parma*

### Premessa

Il test BAEP, acronimo d'origine anglosassone derivante da *Brainstem Auditory Evoked Potentials*, è una tecnica elettrodiagnostica utilizzata per valutare la funzionalità uditiva nell'uomo e negli animali domestici. Sinonimi di questo termine, spesso utilizzati in medicina veterinaria, sono anche BAER (da *Brainstem Auditory Evoked Responses*) e ABR (da *Auditory Evoked Responses*).

È un test oggettivo che può essere effettuato anche senza la collaborazione attiva da parte del paziente e non viene alterato dall'uso di sedativi o anestetici. Per questi motivi è molto utile nel valutare la sordità negli animali poiché permette di ovviare alle imprecisioni diagnostiche dei test comportamentali.

Gli obiettivi del test sono quelli di misurare, mediante elettrodi applicati allo scalpo, le modificazioni elettroencefalografiche (EEG) generate dalla stimolazione dei recettori uditivi posti nell'orecchio interno. Tali eventi bioelettrici registrati su tracciati temporali si traducono in una serie di 5 - 7 onde aventi latenze ed ampiezze ripetibili definite Potenziali Evocati (EP). Questi potenziali elettrici sono generati dall'attivazione delle varie strutture nervose che di volta in volta vengono reclutate nel processo di trasmissione delle informazioni sensoriali dall'orecchio fino alla corteccia uditiva. L'analisi della soglia di attivazione e delle latenze delle varie onde fornisce informazioni dirette sulla funzionalità di ogni struttura anatomica posta sulla via acustica (BODENHAMER, HUNTER, LUTTGEM, 1985; CHRISMAN, 1991; HOLLIDAY, TE SELLE, 1985; KAWASAKI, 1996; KAWASAKI, INADA, 1994; KAY, PALMER, TAYLOR, 1984).

La stimolazione dei recettori cocleari può essere eseguita con stimoli propri oppure impropri. Nel primo caso si utilizzano onde acustiche generate da cuffie o apparati microauricolari applicati esternamente al padiglione o all'interno del condotto uditivo esterno, mentre nel secondo caso si usano onde meccaniche prodotte da un particolare stimolatore vibratile, il quale viene applicato sulla cute esternamente alle strutture ossee del cranio che sovrastano l'orecchio interno (GORGA, KAMINSKI, BEAUCHAINE, BERGMAN, 1993).

Le onde acustiche per raggiungere l'organo del Corti devono attraversare tutte le strutture dell'orecchio esterno e medio (padiglione auricolare, condotto uditivo esterno, membrana timpanica, martello, incudine, staffa e finestra ovale) ne consegue che impedimenti nella trasmissione sonora a qualunque livello provocano blocchi o alterazioni nella generazione dei EP. Per questo motivo il BAEP test per Stimolazione Acustica eseguito da solo non riesce a differenziare le forme di sordità da conduzione da quelle neurosensoriali. La via seguita dalle onde vibratorie invece è completamente diversa: esse giungono direttamente ai recettori uditivi trasmesse attraverso le strutture ossee del cranio e per questo motivo superano ogni eventuale ostacolo di conduzione aerea (DONDI, BIANCHI, 1997).

A causa di queste particolari caratteristiche l'uso combinato dei due test permette di differenziare le sordità conduttive da quelle neurosensoriali. La differenza riscontrata nella soglia di sensibilità fra i due tipi di stimolazione viene definita *air-bone gap* ed è un reperto caratteristico delle sordità di tipo conduttivo. Mentre, nel caso in cui non ci sia nessuna differenza fra questi due parametri il tipo di sordità osservato è sicuramente dovuto alle cellule sensoriali della coclea o all'ottavo nervo cranico. Questo è il caso della sordità neurosensoriale. Va anche specificato che in alcuni soggetti possono essere osservate in vario grado entrambe le componenti della sordità con aumento della soglia per la conduzione ossea associata ad *air-bone gap*, particolare che permette di quantificare il peso delle componenti conduttive accessorie (MUNRO, PAUL, COX, 1997).

I test BAEP per Stimolazione Acustica (che per brevità in seguito definiremo BAEP-SA) sono eseguiti sugli animali domestici da diversi anni ed è disponibile un'ampia letteratura sull'argomento, essendo stati utilizzati anche come *screening* di massa per la diagnosi di sordità congenita in diverse razze di Cani e Gatti. In queste situazioni hanno dimostrato sul campo la loro concreta utilità e "semplicità" di applicazione sia in soggetti adulti sia in cuccioli di poche settimane d'età (KNOWLES, CASH, BLAUCH, 1988; MARSHALL, 1985; MOORE, FISHER, GAVIN, BARBEE, 1990; SIMS, 1990; SIMS, MOORE, 1984; STEISS, WRIGHT, STORRS, 1990;

STRAIN, 1992; STRAIN, GREEN, TWEDT, TEDFORD, 1993; TOKURIKI, MATSUNAMI, UZUKA, 1990).

A differenza del precedente, il test BAEP per Stimolazione Ossea (BAEP-SO) è stato meno studiato in passato e per questo motivo solo di recente sono stati resi disponibili alcuni valori normali relativamente alle latenze e alla soglia di attivazione (STRAIN, GREEN, TWEDT, TEDFORD, 1993; MUNRO, PAUL, COX, 1997). Il motivo di questa scarsità di dati e materiale bibliografico è dipeso da alcune limitazioni che in passato hanno impedito un utilizzo selettivo degli stimolatori disponibili in commercio. Infatti, Hall in uno studio sull'argomento pubblicato nel 1992 sostiene che nell'uomo durante il test per Stimolazione Ossea non esiste perdita energetica transcranica delle onde vibratorie. Ciò significa che lo stimolo vibratorio applicato da un lato del cranio, oltre a stimolare l'orecchio corrispondente stimola anche quello dell'altro lato. Il risultato di questa situazione è che i tracciati ottenuti riflettono la funzionalità di entrambe le vie uditive, mettendo in evidenza nel migliore dei casi l'apparato più sensibile senza identificarlo e nel peggiore alterando completamente il profilo dei tracciati, rendendo improbabile l'identificazione delle singole onde. Nello stesso studio si fa presente che, sempre nell'uomo, tale problema potrebbe essere ovviato applicando un rumore di mascheramento alla coclea non esaminata (HALL, 1992).

Questa situazione di inadeguatezza tecnica piuttosto frustrante, unita a particolari esigenze diagnostiche emerse nel corso di un'indagine epidemiologica condotta dal nostro Istituto nel 1998 sulla Sordità Congenita nel Cane Dalmata, ci ha spinto a sviluppare uno speciale stimolatore osseo, utilizzabile senza mascheramento, con caratteristiche tali da consentire l'identificazione selettiva di sordità neurosensoriali monolaterali in soggetti di giovane età.

Il presente studio ha il duplice scopo di (1) verificare l'effettiva utilità del test BAEP per Stimolazione Ossea senza mascheramento nell'identificare con univocità eventuali sordità monolaterali e di (2) evidenziare possibili cause di risultati falsi positivi del test BAEP per Stimolazione Acustica in soggetti di giovane età.

## Materiali e metodi

Animali - I test BAEP sono stati eseguiti su un gruppo di 15 cani di razza Dalmata appartenenti a due cucciolate diverse: la prima composta da 5 soggetti (3 maschi e 2 femmine) di 46 giorni d'età; mentre la seconda da 10 soggetti (6 maschi e 4 femmine) di 52 giorni d'età. Tutti i cani del gruppo non avevano segni di alterazioni neurologiche ed in nessun caso è stato necessario ricorrere alla sedazione per l'esecuzione dei test. Di ogni soggetto è stata valutata la pervietà del meato acustico esterno e la presenza di eventuali patologie timpaniche.

Entrambe le coppie di genitori, precedentemente esaminate, non avevano mostrato alcun grado di sordità e di alterazione dei tracciati BAEP.

Stimolazione acustica - La stimolazione acustica è stata condotta mediante l'inserimento nel meato acustico una coppia di microdiffusori auricolari aventi le seguenti caratteristiche:

- Sensibilità: 108 dB/mW
- Potenza massima d'entrata: 50 mW
- Risposta in frequenza: da 10 a 26.000 Hz

Gli stimoli acustici a "click", prodotti inviando un'onda elettrica rettangolare di 100 msec di durata agli auricolari (10 click al secondo) in modalità "alternata" avevano intensità di emissione pari a 90 dB/nHL (decibel/normal hearing level). Per 0 dB/nHL si intende la soglia uditiva media in un gruppo di persone senza problemi di udito e corrisponde a circa 30 dB/SPL (decibel/sound pressure level). Recentemente è stato appurato che anche nel cane la soglia uditiva è di 0 dB/nHL (SHIU, MUNRO, COX, 1997).

Stimolazione ossea - La stimolazione ossea è stata effettuata mediante un vibratore costituito da dischi di materiale ceramico piezoelettrico delle dimensioni di 15 mm di diametro (Figg. 1 e 2), progettato e costruito allo scopo del presente lavoro. I dischi sono stati applicati alla regione temporale in prossimità del limite dorsale dell'articolazione temporo-mandibolare e tenuti in posizione mediante pressione manuale. Caratteristiche:

- Banda passante a -3 dB: 1600-4000 Hz (nominale)
- Autorisonanza a vuoto 4100 Hz + / - 500 Hz (F<sub>0</sub>)

- Resistenza equivalente a F0: 200 Ohm
- Capacità elettrica: 2000 pF + / - 30%
- Temperatura di lavoro: da -20 C a + 70 C
- Tensione applicabile: da 2 a 20 Volt AC

Lo stimolatore è stato collegato al misuratore di EP utilizzando la presa dedicata agli stimolatori acustici. Anche in questo caso allo strumento è stata inviata un'onda elettrica rettangolare di 100 msec di durata agli auricolari (10 click al secondo) in modalità "alternata". La perdita di intensità approssimativa di questo sistema è di circa 30 dB a causa della differente impedenza elettrica dei materiali impiegati: quindi l'intensità effettiva fruibile è di 85 dB/NHL ed è stata controllata per linearità e calibrata rispetto ai 0 dB/NHL.



Figura 1: Immagine completa dello stimolatore osseo con adattatore di connessione



Figura 2: Particolare del disco ceramico di stimolazione.

**Elettrodi** - La registrazione è stata effettuata mediante elettrodi ad ago monopolare (10 x 1 mm) infissi nel sottocute, posizionati rispettivamente al vertice del cranio (Vertex o Cz) e sulla proiezione cutanea dell'apofisi spinosa della terza vertebra cervicale. Questo tipo di derivazione con elettrodo esplorante Cz (+) ed elettrodo di riferimento extracefalico C3 (-), definita monopolare, è stata l'unica utilizzata nel corso del presente studio e ha permesso di non riposizionare gli elettrodi sui due lati del cranio durante l'esame. Inoltre, anche in modalità di stimolazione alternata ha permesso ottenere tracciati ben definiti ed interpretabili mettendo in evidenza anche le onde aggiuntive Ib e IIb, normalmente non svelabili con altre derivazioni.

Come elettrodi di terra sono stati usati elettrodi ad ago del tutto simili a quelli utilizzati per la stimolazione, posti nel sottocute in posizione equidistante fra i due elettrodi di registrazione, al fine di ridurre gli artefatti dovuti all'attività elettrica muscolare.

**Registrazione** - L'attrezzatura utilizzata per la registrazione dei potenziali evocati (EP) è stata la Neuropack Four Mini, Model MEB-5304K, Nihon Kohden, per la quale sono stati impostati valori per i filtri di 100 Hz per le basse frequenze e di 3000 Hz per le alte frequenze, con un tempo di registrazione della tracce pari a 10 msec (KAWASAKI, INADA, 1992; KAWASAKI, INADA, 1993).

Tutti i cuccioli sono stati sottoposti sia al test per stimolazione acustica sia a quello per stimolazione ossea. Ogni traccia di entrambi gli esami, ottenuta da almeno 500 stimolazioni, è stata acquisita due volte per verificarne la ripetibilità, ed al termine di ogni test i dati ottenuti sono stati stampati su carta termica e "salvati" su supporti magnetici per renderne agevole la consultazione e la successiva rielaborazione statistica.

## Risultati

I risultati degli esami BAEP-SA e BAEP-SO, eseguiti su ognuno dei 15 soggetti presi in considerazione ai fini del presente studio, hanno definito 4 situazioni cliniche distinte:

1. 12 cuccioli normali ad entrambi i test; i valori delle latenze assolute ed interpicco ottenute sono compatibili con quelle normali disponibili in letteratura (STRAIN, GREEN, TWEDT, TEDFORD, 1993; MUNRO, PAUL, COX, 1997) (Figg. 3 e 4). All'esame otologico diretto i condotti uditivi esterni di tutti i soggetti erano normali.
2. 1 cucciolo di 52 gg con sordità monolaterale destra evidenziata sia con stimolazione acustica sia con stimolazione ossea (Figg. 5 e 6). All'esame otologico il condotto uditivo esterno di tale animale era normalmente pervio.

3. 1 cucciolo di 46 gg con sordità monolaterale sinistra alla stimolazione acustica, ma completamente normale al test per stimolazione ossea (Figg. 7 e 8). All'esame otologico il condotto uditivo esterno di tale animale non risultava aperto.

4. 1 cucciolo di 52 gg con sordità bilaterale completa evidenziata con entrambi i test. All'esame otologico entrambi i condotti uditivi esterni erano normalmente sviluppati.

I valori di latenza delle diverse onde riportate sui tracciati sono riportati in didascalia alle figure corrispondenti.

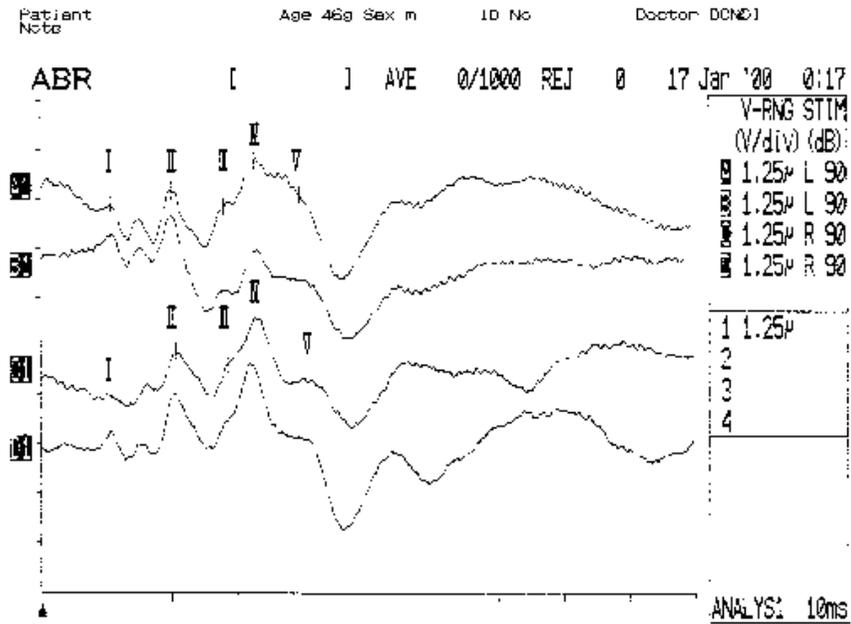


Figura 3: Esempio di tracciato normale del test BAEP con stimolazione acustica. Le latenze delle onde del lato destro sono le seguenti: I 1,04; II 2,06; III 2,86; IV 3,30; V 4,05 msec.

Patient Note Baep bone stim. Age 40g Sex m ID-No Doctor DONDI

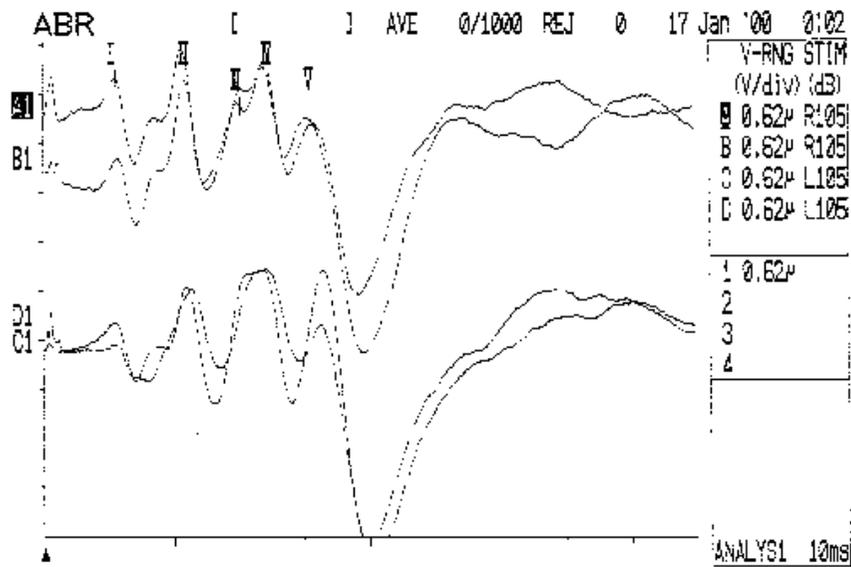


Figura 4: Esempio di tracciato normale del test BAEP con stimolazione ossea senza mascheramento controlaterale. Le latenze delle onde del lato destro sono le seguenti: I 1,10; II 2,12; III 3,02; IV 3,38; V 4,09 msec.

Patient Note

Age 45a Sex f

ID-No

Doctor UUNDI

ABR [ I AVE 0/1000 REJ 0 17 Jan '00 0:25

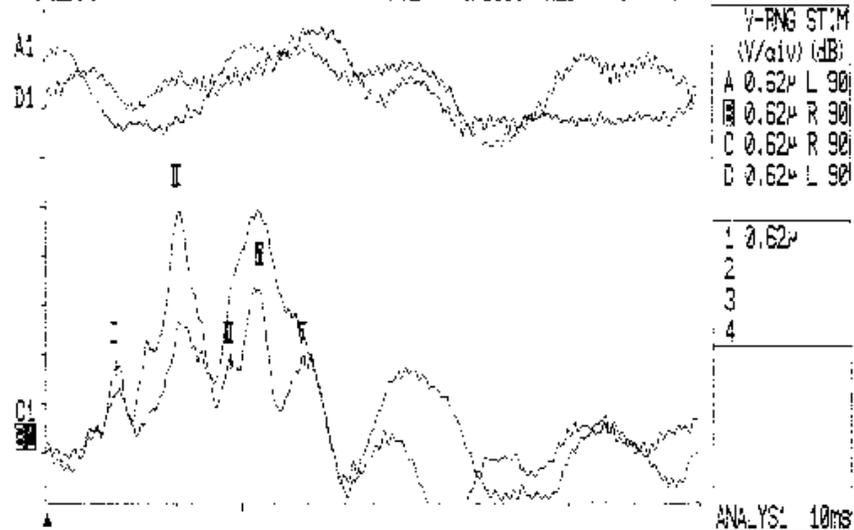


Figura 5: Tracciato del test BAEP con stimolazione acustica del soggetto risultato affetto da sordità neurosensoriale congenita sinistra. Mancano completamente le onde sul tracciato del lato sinistro, mentre quelle del lato destro sono presenti ed hanno latenze normali: I 1,08; II 2,06; III 2,84; IV 3,24; V 3,96 msec.

Patient Asc 46a Sex f ID-No Doctor DONDI  
Nota stimolazione ossea

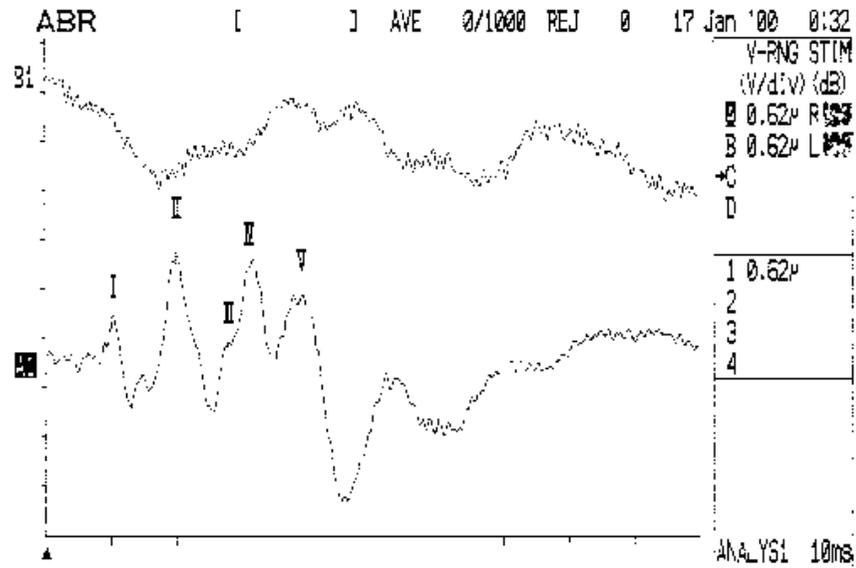


Figura 6: Tracciato del test BAEP con stimolazione ossea, senza mascheramento controlaterale, del soggetto risultato affetto da sordità neurosensoriale congenita sinistra. Mancano completamente le onde sul tracciato del lato sinistro, mentre quelle del lato destro sono presenti ed hanno latenze normali: I 1,00; II 1,98; III 2,78; IV 3,14; V 3,88 msec.

Patient:  
Note

Age 46a Sex F

ID-No

Doctor DOND1

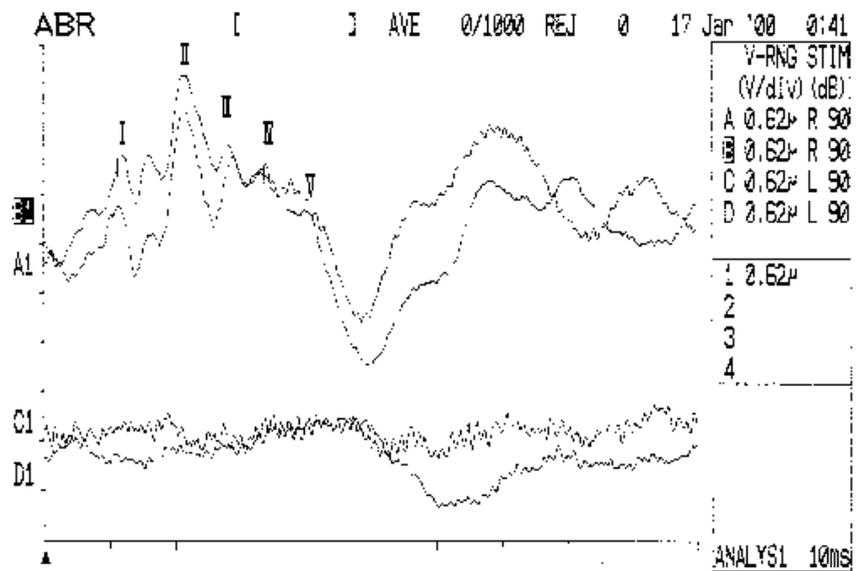


Figura 7: Tracciato del test BAEP con stimolazione acustica del soggetto affetto da sordità sinistra dovuta a ritardo nell'apertura del meato acustico. Sono visibili solo le onde del tracciato ottenuto dal lato destro. Tutte le onde hanno normali latenze: I 1,12; II 2,14; III 2,84; IV 3,36; V 4,01 msec.

Patient  
Note Bone stim

Age 46g Sex f

ID-No

Doctor DOND

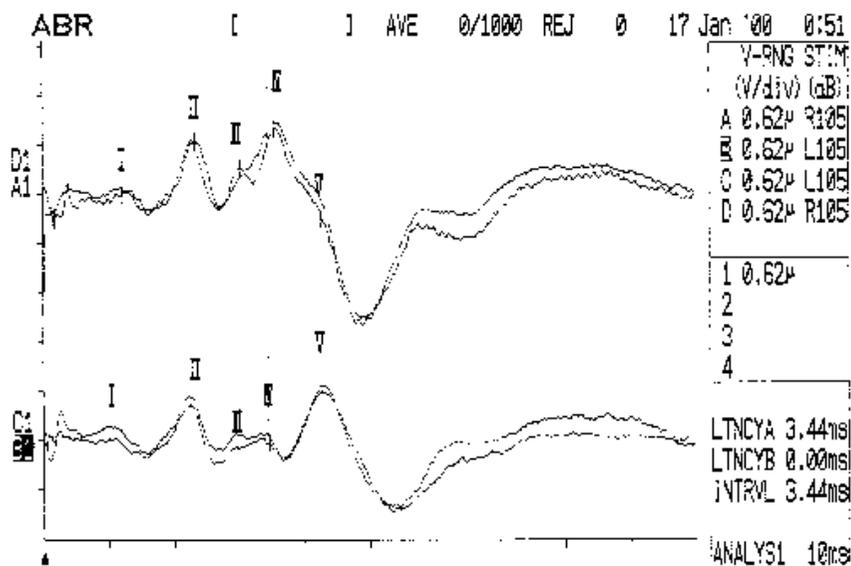


Figura 8: Tracciato del test BAEP con stimolazione ossea, senza mascheramento controlaterale, del soggetto affetto da sordità dovuta a ritardo nell'apertura del meato acustico. Sono osservabili onde aventi normali latenze su entrambi i lati. Lato destro: I 1,20; II 2,31; III 3,02; IV 3,54; V 4,26 msec. Lato sinistro: I 1,10; II 2,24; III 2,98; IV 3,46; V 4,28 msec.

## Discussione

Sulla base dei risultati ottenuti dai soggetti raggruppati nella prima situazione clinica, vale a dire quelli con completa normalità dell'apparato uditivo, è possibile affermare che le tecniche utilizzate nel corso del presente lavoro forniscono informazioni confrontabili a quanto è stato riportato in letteratura sull'argomento da lavori precedenti di altri Autori. Infatti, i valori di latenza per le varie onde rientrano negli intervalli di normalità dati per entrambe le varianti del test utilizzato. Ciò conferma in modo indiretto la validità delle procedure utilizzate e di conseguenza consente di formulare alcune considerazioni sulle situazioni particolari emerse in seguito.

In particolare, i tracciati registrati dal cucciolo della seconda situazione clinica, vale a dire quella di sordità monolaterale neurosensoriale congenita, permettono di dire che il tipo di stimolatore osseo, utilizzato senza rumore di mascheramento della coclea controlaterale, non produce gli effetti di trasmissione vibratoria transcranica ipotizzati da alcuni Autori. In questo caso la stimolazione vibratoria applicata sul lato sinistro del cranio, parimenti a quella acustica, non ha prodotto alcun tipo di onda (tracciato piatto), neppure generata dalla struttura cocleare destra, cosa che sarebbe dovuta accadere in caso di trasmissione delle onde vibratorie da un lato all'altro del cranio. Infatti, l'esecuzione di entrambi i test sull'orecchio destro hanno fornito tracciati completamente normali. Ne consegue che il particolare tipo di stimolatore utilizzato in questa circostanza consente di differenziare in modo selettivo il lato della via acustica colpito da sordità neurosensoriale anche senza necessità di dubbi rumori di mascheramento sulla coclea controlaterale.

La terza situazione clinica, quella in cui un cucciolo risulta sordo monolateralmente al test BAEP con stimolazione acustica, ma presenta normali tracciati ottenuti con stimolazione ossea, ci impone di prendere in considerazione situazioni di falsa positività dei test BAEP-SA eseguiti in soggetti molto giovani. Tale condizione, ancorché poco frequente, si può verificare anche in assenza di patologie otologiche e può essere dovuta esclusivamente ad immaturità delle vie uditive esterne (STRAIN,

TEDFORD, JACKSON, 1991).

Questo significa che pur rimanendo la necessità di eseguire diagnosi sempre più precoci, come richiesto dagli allevatori e dai programmi di controllo delle malattie genetiche, ogni cucciolo che presenti dubbi o positività al test BAEP con stimolazione acustica deve essere sottoposto anche al test con stimolazione ossea, ed eventualmente ricontrollato a distanza di qualche tempo dal primo intervento diagnostico, prima di essere escluso dai libri genealogici e dalla riproduzione.

Il quarto caso, di sordità bilaterale completa ad entrambi i test, conferma quanto affermato al primo punto.

## Bibliografia

- 1. BODENHAMER, R.D., HUNTER, J.F., LUTTGEM, P.J.: Brain stem auditory-evoked responses in the dog. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 1787-1792, 1985.
- 2. CHRISMAN, C.L.: Deafness and alterations in hearing. In: *Problems in Small Animal neurology-2nd edition*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1991.
- 3. DONDI, M., BIANCHI, E.: Potenziali evocati uditivi del tronco encefalico nel cane e nel gatto, *Annali della Facoltà di Med.Vet. dell'Università di Parma*, 17:101-116, 1997.
- 4. GORGA, M.P., KAMINSKI, J.R., BEAUCHAINE, K.L., BERGMAN, B.M.: A comparison of auditory brainstem response thresholds and latencies elicited by air- and bone-conducted stimuli. *Ear and hearing*, 14: 85-93, 1993.
- 5. HALL, J.W.: Effects of stimulus factor. In: *Handbook of Auditory Evoked Responses*. Allyn and Bacon, Boston, 104-176, 1992.
- 6. HOLLIDAY, T.A., TE SELLE, M.E.: Brain stem auditory-evoked potentials of dogs: Wave forms and effects of recording electrode positions. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 845-851, 1985.
- 7. KAWASAKI, Y.: Extra- and Intracranial Components Contributing to Brain Stem Auditory Evoked Potentials in Dogs and the Binaural Interaction. *P.V.N.*, 7: 153-158, 1996.
- 8. KAWASAKI, Y., INADA, S.: Effects of analog filtering on brain stem auditory-evoked potentials in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 1096-1100, 1992.
- 9. KAWASAKI, Y., INADA, S.: Power spectral analysis and digital filtration of brain stem auditory evoked potentials in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 1822-1826, 1993.
- 10. KAWASAKI, Y., INADA, S.: Peaks of brainstem auditory evoked potentials in dogs. *Veterinary Research Communications*, 18: 383-396, 1994.
- 11. KAY, R., PALMER, A.C., TAYLOR, P.M.: Hearing in the dog as assessed by auditory brainstem evoked potentials. *The Veterinary Record*, 114: 81-84, 1984.
- 12. KNOWLES, K.E., CASH, W.C., BLAUCH, B.S.: Auditory-evoked Responses of Dogs with Different Hearing Abilities. *Can. J. Vet. Res.*, 52: 394-397, 1988.
- 13. MARSHALL, A.E.: Brain stem auditory-evoked response of the nonanesthetized dog. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 966-973, 1985.
- 14. MOORE, M.P., FISHER, D.J., GAVIN, P.R., BARBEE, D.D.: Effects of electrode position and stimulus polarity on brain stem auditory evoked responses in dogs. *P.V.N.*, 1: 461-472, 1990.
- 15. MUNRO, K.J., PAUL, B., COX, C.L.: Normative auditory brainstem response data for bone conduction in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 38: 353-356, 1997.
- 16. SHIU, J.N., MUNRO K.J., COX, C.L.: Normative auditory brainstem response data for hearing treshold and neuro-otological diagnosis in the dog. *J. Small Animal Practice*, 38: 103-107, 1997.
- 17. SIMS, M.H.: Evoked Response Audiometry in Dogs. *P.V.N.*, 1: 275-283, 1990.
- 18. SIMS, M.H., MOORE, R.E.: Auditory-evoked response in the clinically normal dog: Early latency components. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 2019-2027, 1984.
- 19. STEISS, J.E., WRIGHT, J.C., STORRS, D.P.: Alterations in the Brain Stem Auditory Evoked Response Threshold and Latency-Intensity Curve Associated with Conductive Hearing Loss in Dogs. *P.V.N.*, 1: 205-211, 1990.
- 20. STRAIN, G.M.: Brainstem auditory evoked potentials in veterinary medicine. *Br. vet. J.*, 148: 275-279, 1992.
- 21. STRAIN, G.M., TEDFORD, B.L., JACKSON, R.M.: Postnatal development of the brain stem auditory-evoked potential in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 52: 410-415, 1991.
- 22. STRAIN, G.M., GREEN, K.D., TWEDT, A.C., TEDFORD, B.L.: Brain stem auditory evoked potentials from bone stimulation in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 1817-1821, 1993.
- 23. TOKURIKI, M., MATSUNAMI, K., UZUKA, Y.: Relative effects of xylazine-atropine, xylazine-atropine-ketamine, and xylazine-atropine-pentobarbital combinations and time-course effects of the latter two combinations on brain stem auditory-evoked potentials in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 51: 97-102, 1990.

## 78 CASI DI LESIONI CORNEALI NEL CANE: CONTRIBUTO CASISTICO

78 CASES OF CORNEAL LESIONS IN THE DOG: CASE HISTORY  
78 CASOS DE LESIONES CORNEALES EN EL PERRO: DEMONSTRACIÓN DE CASOS

Simonazzi B., Zanichelli S., Del Bue M.

*Istituto di Clinica Chirurgica Veterinaria, Università degli Studi di Parma*

### Introduzione

La cornea rappresenta uno dei più importanti mezzi diottrici dell'occhio, la sua trasparenza è dovuta all'assenza di pigmento e di vasi, alle caratteristiche dell'epitelio non cheratinizzato che la riveste, ed alla disposizione e dimensione delle fibre collagene del suo stroma (4). Il suo spessore, nel cane, raggiunge circa 1 mm e comprende, dall'esterno all'interno, l'epitelio con la membrana basale, lo stroma (90% dell'intero spessore), la *membrana di Descemet* e l'endotelio (10, 11). La porzione centrale della cornea è leggermente più spessa di quella periferica (0,6/0,8 mm) e varia da 0,73 a 0,95 mm (5). Il suo diametro dipende invece dalle dimensioni e dalla razza del cane ed è compreso fra 12 e 17 mm, con un raggio di curvatura di circa 8 mm (4, 15).

L'epitelio corneale intatto è molto resistente alle infezioni, ma qualsiasi alterazione della sua continuità, permettendo la penetrazione di microrganismi e la comparsa d'infezioni secondarie (Stafilococchi, Streptococchi, E. Coli, *Pseudomonas* spp.), può esitare nella formazione di ulcere profonde (1, 5, 15).

Le più comuni cause di lesioni corneali sono senza dubbio quelle meccaniche, seguite dalle infettive (batteri, virus, miceti), dalle metaboliche e dalle neurologiche (in alcune razze brachicefale ad esempio vi è la possibilità di una carenza dell'innervazione corneale coinvolgente in particolare modo la zona centrale) (5, 9, 11, 13).

La lesione traumatica diretta della cornea è probabilmente la causa meccanica più frequente di cheratite ulcerativa nel cane, seguita dalla presenza di corpi estranei e di alterazioni oculari che possono predisporre o causare l'ulcera corneale (es. KCS, entropion, distichie) (9, 11).

La perdita di uno o più strati a carico dell'epitelio corneale viene comunemente definita *erosione corneale*, mentre la perdita a tutto spessore dell'epitelio con concomitante interessamento dello stroma viene definita *ulcera* (14).

Le ulcere superficiali sono sicuramente le lesioni più dolorose per l'animale in quanto si ha esposizione delle terminazioni nervose della branca oftalmica del quinto paio di nervi cranici (N. trigemino) presenti fino alla zona subepiteliale dello stroma superficiale (4, 8, 15).

I processi ulcerativi a carico della cornea costituiscono uno dei più frequenti problemi oculari riscontrati nella pratica dei piccoli animali. Se trascurati e non trattati nei modi e nei tempi dovuti, rappresentano una delle più comuni cause di cecità nel cane; devono pertanto essere considerati vere e proprie emergenze oculari (15).

Scopo del lavoro è stato effettuare uno studio retrospettivo al fine di valutare la tipologia e l'eziologia delle lesioni corneali riscontrate, la concomitanza di altre lesioni oculari, il trattamento attuato ed i tempi ed i modi di guarigione dei soggetti considerati.

Abbiamo volutamente trascurato le erosioni corneali in quanto lo studio ha voluto prendere in considerazione lesioni più profonde, coinvolgenti almeno lo stroma corneale.

### Materiali e metodi

La ricerca è stata eseguita su 78 cani (47 maschi e 31 femmine) visitati presso l'Istituto di Clinica Chirurgica Veterinaria dell'Università degli Studi di Parma.

L'età dei cani presi in esame è risultata compresa tra un mese e 12 anni (media 4,1 anni).

Per quanto riguarda la razza, circa il 25% dei cani (20 casi) apparteneva a razze che svolgono attività venatoria, mentre 16 cani facevano parte di razze brachicefale, caratterizzate da orbite poco profonde ed occhi particolarmente sporgenti e quindi più facilmente predisposti ai traumatismi di tipo corneale. I restanti soggetti appartenevano alle razze normalmente osservate nella nostra zona (Tabella n.1).

**TABELLA n. 1:** Casi clinici presi in considerazione

N. Caso	Razza	Sesso	Età	Lesione	Causa	Altre lesioni oculari	Terapia chirurgica
1.	Breton	M	A 7	U. Sup.	Ce Veg.	Congiuntivite	Nessuna
2.	Segugio	M	A 10	U. Sup.	KCS	KCS	
3.	Bracco T.	M	A 3	U. Sup.	Ce Veg.	Chemosi congiuntiv.	
4.	Pintcher	F	A 3	U. Sup.	Sconosc.	Nessuna	
5.	Pechinese	F	A 8	U. Sup.	Herpes	Nessuna	
6.	Meticcio	F	M 1	U. Sup.	Sconosc.	Congiuntivite	
7.	Boxer	F	A 10	U. Sup.	Sconosc.	Cheratite	
8.	Boxer	M	A 1	U. Sup.	Sconosc.	Congiuntivite	
9.	Carlino	M	M 9	U. Sup.	Sconosc.	Nessuna	
10.	Cocker Sp	F	A 2	U. Sup.	Sconosc.	Cheratite	
11.	Pointer	F	A 1.5	U. Sup.	Sconosc.	Congiun.follicolare	
12.	Lagotto	M	A 1	U. Sup.	Ce Veg.	Entrop., cheratocong	
13.	Pointer	M	A 6	U. Sup.	KCS	KCS	
14.	Meticcio	M	A 1	U. Sup.	Trauma	Emorr. Sclerale	
15.	Meticcio	M	A 12	U. Sup.	Sconosc.	Nessuna	
16.	Meticcio	F	A 9	U. Sup.	KCS	KCS	
17.	York. T.	M	A 1	U. Sup.	Sconosc.	Cheratocong.	
18.	Boxer	M	A 8	U. Sup.	Sconosc.	Nessuna	
19.	Rottweiler	M	A 7	U. Sup.	Sconosc.	Cheratite	
20.	Bull Mast.	M	A 4	U. Sup.	KCS	KCS	
21.	Meticcio	M	A 12	U. Sup.	Sconosc.	Coagulo camera ant.	
22.	Boxer	M	A 6	U. Sup.	Sconosc.	Edema corneale	
23.	Meticcio	F	A 4	U. Sup.	Trauma	Ifema	
24.	Bracco T.	F	A 5	U. Sup.	Ce Veg.	Cataratta, chemosi c.	
25.	Shih-Tzu	M	M 10	U. Sup.	Sconosc.	Nessuna	
26.	Schn. Gig.	M	M 10	U. Prof.	Ce	Ifema, edema cornea	
27.	Meticcio	M	A 4	U. Prof.	Trauma	Ifema	
28.	Pechinese	F	M 9	U. Prof.	Trauma	Cheratite	
29.	Meticcio	M	A 9	U. Prof.	Trauma	Ipopion	
30.	York. T.	F	M 9	Descemet.	Trauma	Nessuna	
31.	Setter Ing.	F	A 5	Prof. Iride	Trauma	Cheratocong.	
32.	Segugio	M	M 1.5	U. Prof.	Trauma	Nessuna	
33.	Segugio	M	A 9	U. Prof.	Ce Veg.	Chemosi congiuntiv.	
34.	Meticcio	F	A 2	U. Prof.	Sconosc.	Nessuna	
35.	Pintcher	M	A 2	U. Prof.	Ce	Nessuna	
36.	Setter Ing.	F	A 9	U. Prof.	Sconosc.	Cheratocong.	
37.	Breton	M	A 4	U. Prof.	Ce Veg.	Nessuna	
38.	Meticcio	M	A 4	U. Prof.	Sconosc.	Prol. gh. terza palp.	
39.	WHWT	F	A 9	U. Prof.	Trauma	Cheratocong.	
40.	Dalmata	F	A 7	U. Prof.	Ce	Cheratocong.	
41.	Meticcio	F	A 1	U. Prof.	Sconosc.	Glaucoma, cheratite	
42.	Meticcio	M	A 5	U. Perf.	FA fuoco	Ipopion	
43.	Schn. Gig.	M	A 5	U. Prof.	Trauma	Edema corneale	
44.	Meticcio	M	A 9	U. Prof.	Trauma	Ifema	
45.	Bulldog F.	F	A 2	U. Prof.	Distichiasi	Cherat.,Dist.,Derm.c	
46.	Barb.Nano	F	A 6	U. Perf.	Gr. Gatto	Ipopion	
47.	Segugio	M	A 7	U. Prof.	FA fuoco	Nessuna	
48.	Doberm.	M	A 12	U. Perf.	Trauma	Ipopion, cheratite	
49.	Bracco It.	M	M 4	U. Perf.	Ce Veg.	Nessuna	
50.	Meticcio	M	A 5	U. Prof.	Sconosc.	Nessuna	
51.	Beagle	F	A 6	U. Prof.	Trauma	Edema corneale	
52.	Meticcio	M	A 5	U. Prof.	Trauma	Nessuna	
53.	Beagle	M	A 5	U. Prof.	Ce Veg.	Nessuna	

Tarsorafia

Flap congiuntivale e tarsorafia

Asportazione

46.	Barb.Nano	F	A 6	U. Prof.	Gr. Gatto	Ipopion	
47.	Segugio	M	A 7	U. Prof.	FA fuoco	Nessuna	Flap congiuntivale e tarsorrafia
48.	Doberm.	M	A 12	U. Perf.	Trauma	Ipopion, cheratite	
49.	Bracco It.	M	M 4	U. Perf.	Ce Veg.	Nessuna	
50.	Meticcio	M	A 5	U. Prof.	Sconosc.	Nessuna	
51.	Beagle	F	A 6	U. Prof.	Trauma	Edema corneale	
52.	Meticcio	M	A 5	U. Prof.	Trauma	Nessuna	
53.	Beagle	M	A 5	U. Prof.	Ce Veg	Nessuna	Asportazione corpo estraneo e tarsorrafia
54.	Segugio	M	A 7	U. Prof.	Ce	Chemiosi congiuntiv.	
55.	BassottoT.	F	M 10	U. Prof.	Ce	Nessuna	
56.	P. Ted.	F	A 2	U. Prof.	Ce Veg	Cheratite	
57.	Setter Ing.	F	A 10	Prol. Iride	Trauma	Cheratocong.	Iridectomia, sutura della cornea, tarsorrafia
58.	Meticcio	M	M 3	Prol. Iride	Trauma	Nessuna	
59.	Meticcio	M	A 4	Prol. Iride	Trauma	Ifema, cheratocong.	
60.	Shih-Tzu	M	A 2	U. Prof.	Ce	Nessuna	Flap congiuntivale
61.	Dalmata	F	M 6	U. Prof.	Trauma	Nessuna	
62.	Boxer	M	A 2	Descemet.	Trauma	Cheratocong.	Flap terza palpebra
63.	Segugio	F	A 3	Prol. Iride	FA Fuoco	Ifema	Iridectomia, sutura della cornea, flap, tarsorrafia
64.	Past.Cauc.	F	M 1.5	Prol. Iride	Sconosc.	Chemiosi congiuntiv.	
65.	Shih-Tzu	M	A 7	Prol. Iride	Trauma	Nessuna	
66.	Setter Ing.	M	A 8	Prol. Iride	Trauma	Fuoriuscita acqueo	Iridectomia, flap, tarsorrafia
67.	Volpino It.	F	M 2	Prol. Iride	Gr. Gatto	Cheratite	
68.	Past. Aust.	M	A 4	Prol. Iride	Trauma	Ipopion	
69.	Setter Irl.	M	A 3	Prol. Iride	Trauma	Emorr. sclerale	Iridect., sutura cornea
70.	Samojedo	F	A 10	U. In.Rec.	Sconosc.	Cheratite	Debrid., flap terza pal.
71.	Meticcio	M	A 1	U. In.Rec.	Sconosc.	Nessuna	Debridement
72.	Pechinese	M	A 1	Prol. Iride	Gr. Gatto	Prolasso vitreo	Enucleazione
73.	Mast. Nap.	F	M 6	U. Prof.	Entropion	Entropion, cheratite	Tarsorrafia,
74.	Pointer	M	M 1	U. Prof.	Entropion	Entropion	correzione entropion
75.	Rottweiler	F	M 5	U. Sup.	Entropion	Entropion	Correzione entropion
76.	S. Bern.	F	M 15	U. Sup.	Entropion	Entropion	
77.	S. Bern.	M	A 1.5	Prol. Iride	Entropion	Entropion, cheratoc.	Irid., sut., tars., cor.ent
78.	Pechinese	M	A 2	U. Sup.	Distichiasi	Distichiasi	Elettrodep.distichie

Tutti i cani oggetto di questo studio presentavano fotofobia, epifora, blefarospasmo. In alcuni soggetti erano già presenti visibili alterazioni della cornea quali perdita di trasparenza (edema corneale o cheratite) e neovascolarizzazione.

I soggetti sono stati tutti sottoposti ad esame clinico e a visita oculistica completa. In alcuni casi interessati da dolore e fastidio molto accentuati è stato necessario procedere ad una sedazione per potere eseguire la visita oculistica.

Le lesioni corneali sono state messe in evidenza mediante l'utilizzo della colorazione con fluoresceina nelle ulcere superficiali e profonde o mediante osservazione diretta e macroscopica nelle ulcere perforate, nei descemetocoele e nei prolassi dell'iride.

Sono stati poi valutati la reazione di ammiccamento alla minaccia ed i riflessi pupillari diretti e consensuali.

E' stato eseguito lo Schirmer Tear Test per la valutazione della produzione lacrimale in quei soggetti nei quali le lesioni potevano far sospettare una Cheratocongiuntivite Secca (KCS) (range considerato normale tra i 15 e i 25 mm/min). La presenza di KCS, e quindi di una marcata secchezza oculare, può infatti predisporre l'animale alla comparsa di lesioni a carico della cornea (5, 11).

Mediante l'esame clinico abbiamo poi messo in evidenza lesioni oculari preesistenti o conseguenti alla lesione corneale identificata.

La visita oculistica, insieme all'anamnesi, in molti casi ha permesso di accertare l'eziologia della lesione.

Le lesioni sono state classificate, a seconda della gravità e del decorso, in ulcere superficiali, ulcere indolenti recidivanti, ulcere profonde, descemetocoele, ulcere perforate e prolassi d'iride.

In tutti i casi è stata attuata una terapia di tipo medico volta a diminuire il dolore e ad impedire o combattere le infezioni batteriche secondarie. In alcuni casi è stato necessario

anche controllare la lisi corneale. Sono stati quindi impiegati farmaci parasimpaticolitici cicloplegici (atropina), antibiotici e inibitori delle collagenasi ad uso topico e somministrati più volte il giorno.

Nei casi più gravi, invece, è stato necessario intervenire chirurgicamente, sottoponendo così tali soggetti ad anestesia generale gassosa secondo un protocollo standard utilizzato in soggetti di classe ASA 2.

Le diverse procedure chirurgiche, debridement, suture corneali, flap della terza palpebra, flap congiuntivali pedunculati o liberi, iridectomie, tarsorrafie, sono state scelte in base alla gravità delle lesioni cliniche riscontrate. Quando la lesione era causata da patologie oculari preesistenti (entropion, distichie, KCS) si è provveduto a trattare le suddette patologie con terapia sia medica che chirurgica.

In tutti i soggetti è stata consigliata l'applicazione di collare Elisabetta per evitare eventuali nuovi traumatismi.

Per la terapia farmacologica postoperatoria sono stati utilizzati gli stessi farmaci locali prima elencati: antibiotici, parasimpaticolitici cicloplegici, inibitori delle collagenasi ed in alcuni casi corticosteroidi.

Tutti i cani sono stati poi sottoposti a numerose visite di controllo fino a completa cicatrizzazione della lesione corneale. I soggetti sottoposti esclusivamente a terapia farmacologica sono stati controllati ogni tre giorni fino alla completa guarigione della lesione ed alla negativizzazione dell'esame con fluoresceina. Nei soggetti con tarsorrafia i punti di sutura sono stati rimossi dopo 10/12 giorni e poi, se non guariti, visitati ad intervalli di tre giorni sino a completa cicatrizzazione della lesione. I soggetti trattati con flap congiuntivale hanno richiesto numerosi controlli nei primi giorni in attesa della vascolarizzazione del flap. Sono poi stati rivisitati dopo 20/25 giorni per la rimozione dei punti di sutura. Una volta rimossi i punti sono stati sottoposti a terapia cortisonica locale per facilitare l'assottigliamento del flap e il ritorno alla trasparenza della cornea. Le suture corneali sono state asportate dopo 15/20 giorni dall'intervento chirurgico.

### *Risultati*

Nei 78 cani presi in considerazione sono state evidenziate, 28 ulcere superficiali, 2 ulcere indolenti recidivanti 29 ulcere profonde, 2 descemetoceli, 4 ulcere perforate e 13 prolapsi d'iride.

In 22 casi non è stato possibile risalire all'eziologia della lesione, in 56 casi la visita oculistica completa e l'anamnesi ci hanno permesso di accertarne la causa. In 23 casi è stata riportata una generica causa di tipo traumatico, in 6 animali (casi n. 26, 35, 40, 54, 55, 60) la lesione è stata procurata da un corpo estraneo ed in 9 (casi n. 1, 3, 12, 24, 33, 37, 49, 53, 56) più specificatamente da un corpo estraneo di tipo vegetale (in 6 casi di questi i corpi estranei di tipo vegetale sono stati repertati nel fornice congiuntivale o al di sotto della terza palpebra). In altri 3 soggetti la lesione è stata procurata da un'arma da fuoco (casi n. 42, 47, 63), in 3 cani dal graffio di un gatto (casi n. 46, 67, 72), mentre in un solo caso (caso n. 5) è stata evidenziata una lesione causata da un agente infettivo, in questo caso herpes virus (tipica ulcera dendritica da herpes).

I restanti 11 animali alla visita clinica hanno presentato alcune anomalie oculari probabilmente responsabili della lesione. In 5 casi, infatti, la presenza di entropion ha portato alla comparsa di lesioni traumatiche della cornea dovute allo sfregamento delle ciglia contro di essa (casi n. 73, 74, 75, 76, 77). In altri 2 soggetti la causa delle lesioni corneali è stata da imputare alla presenza di distichie, ovvero ciglia ectopiche presenti a livello degli sbocchi delle *ghiandole di Meibomio* (casi n. 45, 78), mentre negli altri 4 era presente una KCS (casi n. 2, 13, 16, 20).

In 22 cani, oltre alla lesione corneale non si sono evidenziate altre alterazioni oculari significative. Nei restanti 56 soggetti invece, oltre ai già ricordati casi di entropion, KCS e distichiasi, sono state riscontrate altre modificazioni soprattutto a carico del segmento anteriore dell'occhio quali: fuoriuscita dell'umor acqueo (caso n. 66), emorragia sclerale (caso n. 69), prolasso della ghiandola della terza palpebra (caso n. 38), congiuntivite (casi n. 1, 6, 8, 11), cheratite (casi n. 7, 10, 19, 28, 41, 45, 48, 56, 67, 70, 73), cheratocongiuntivite (casi n. 12, 17, 31, 36, 39, 40, 57, 59, 62, 77), chemosi congiuntivale (casi n. 3, 24, 33, 54, 64), edema corneale (caso n. 22, 26, 43, 51), dermoide corneale (caso n. 45), ifema (casi n. 23, 26, 27, 44, 59, 63), ipopion (casi n. 29, 42, 46, 48, 68), cataratta (caso n. 24), glaucoma (caso n. 41) e prolasso del vitreo (caso n. 72). Molto spesso queste patologie sono state riscontrate contemporaneamente nello stesso occhio.

In 25 casi è stata eseguita esclusivamente una terapia di tipo farmacologico.

I rimanenti 53 soggetti invece sono stati sottoposti a terapia di tipo chirurgico; in 45 cani questa decisione è stata presa come prima scelta, mentre nei restanti 8 si è deciso a

seguito di insuccesso della terapia farmacologica.

I trattamenti chirurgici sono stati: debridement dell'epitelio corneale, tarsorrafia, flap della terza palpebra, flap congiuntivale, iridectomia e sutura corneale. Nei soggetti nei quali l'ulcera era secondaria a lesioni di altra natura si è provveduto a trattare le patologie primarie sia farmacologicamente (4 casi di KCS trattate localmente con ciclosporina A) sia chirurgicamente (5 casi di entropion, 1 caso di distichiasi).

In 21 casi abbiamo esclusivamente provveduto ad eseguire una tarsorrafia temporanea (10-12 giorni) per facilitare la riepitelizzazione e la guarigione dell'ulcera. Questo trattamento protettivo della cornea, limita molto il dolore provocato dal movimento delle palpebre e della membrana nittitante a contatto con l'ulcera. Quattro di questi casi hanno richiesto anche l'asportazione di un corpo estraneo corneale.

In 10 cani alla tarsorrafia è stato associato un flap congiuntivale (in 6 casi libero ed in 4 peduncolato) prelevato o dalla congiuntiva della palpebra superiore o dalla congiuntiva della terza palpebra (casi n. 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

In 3 cani è stato esclusivamente applicato un flap (due flap congiuntivali ed un flap della terza palpebra) (casi n. 60, 61, 62).

In 3 soggetti è stato praticato un intervento comprendente iridectomia, sutura della cornea e tarsorrafia (casi n. 57, 58, 59).

In altri 3, oltre a questo tipo di approccio è stato associato anche un flap congiuntivale (casi n. 63, 64, 65).

Altri 3 cani hanno invece richiesto l'iridectomia, l'applicazione di un flap congiuntivale e la tarsorrafia, ma non la sutura della cornea (casi n. 66, 67, 68).

In un altro ancora è stata esclusivamente effettuata l'iridectomia associata alla sutura della cornea (caso n. 69).

Due debridement dell'epitelio corneale necrotico (casi n. 70, 71) sono stati eseguiti in soggetti con ulcera indolente recidivante (uno dei quali associato a flap della terza palpebra, caso n. 71).

Un solo caso tra tutti ha richiesto l'enucleazione del bulbo oculare (caso n. 72).

In 6 animali abbiamo corretto chirurgicamente la patologia oculare responsabile della lesione (entropion in 5 casi ed elettrodepilazione distichie in un caso). In un caso di questi è risultato necessario anche eseguire un'iridectomia associata a sutura corneale e tarsorrafia (caso n. 78) e in 2 casi una tarsorrafia per la gravità delle lesioni corneali presenti (casi n. 73, 74). È stata chiaramente data la precedenza al trattamento della lesione ulcerativa, ed in seguito ci si è occupati della correzione della patologia responsabile della lesione.

In alcuni soggetti, nonostante la presenza di lesioni molto gravi, non c'è stata l'autorizzazione del proprietario ad intervenire con una terapia chirurgica costosa o complessa.

In tutti i soggetti si è verificata la guarigione della lesione corneale ad eccezione dell'unico caso in cui da subito abbiamo optato per l'enucleazione del bulbo (caso n. 72). Per guarigione abbiamo infatti inteso l'ottenimento della completa cicatrizzazione della lesione e quindi la negativizzazione all'esame con la fluoresceina oltre che la scomparsa dei sintomi con i quali l'animale si era presentato all'esame clinico (blefarospasmo, fotofobia, epifora). Non in tutti i casi è stato comunque possibile conservare la vista dell'animale. In 4 casi infatti si è ottenuta la guarigione della lesione pur con la perdita della capacità visiva. In altri 6 soggetti è residuo invece un lieve leucoma cicatriziale permanente nonostante l'impiego locale di cortisonici.

La guarigione media è risultata di 14 giorni, anche se bisogna sicuramente fare una distinzione per quanto riguarda la diversità di guarigione in base al tipo di lesione: ulcere superficiali, infatti, sono guarite in alcuni giorni, mentre, al contrario, i prolassi d'iride e le ulcere perforate hanno richiesto trattamenti ben più lunghi e tempi di guarigione superiori anche ai 30 giorni.

#### *Discussione e conclusioni*

La gestione delle ulcere corneali è sicuramente un problema di notevole importanza nell'oftalmologia dei piccoli animali, specie nella scelta della terapia.

La prima cosa da fare in presenza di un cane con occhio dolorante (fotofobia e blefarospasmo) ed epifora è sicuramente stabilire se l'animale può essere visitato in queste condizioni o se è necessario l'ausilio di una sedazione.

Si procede quindi alla visita mediante oftalmoscopio e all'esame con fluoresceina. La fluoresceina, essendo un colorante idrosolubile, non penetra attraverso cornea e congiuntiva integre, ma esclusivamente attraverso lo stroma corneale andando a pigmentare tutte quelle zone in cui manca invece l'epitelio. Non bisogna però farsi ingannare dai descemetoceli in quanto la fluoresceina fissandosi solo allo stroma corneale non pigmenta la *membrana di Descemet*; è presente comunque una gravissima lesione, un'ulcera profonda della cornea che ha coinvolto sia l'epitelio che lo stroma corneale, andando ad esporre la *membrana di Descemet* (8, 10, 12).

Molto spesso, nei casi di ulcere non troppo recenti, si può assistere alla presenza di una marcata vascolarizzazione corneale proveniente dai vasi perilimbari della congiuntiva, fenomeno questo, di naturale risposta al danno corneale.

La vascolarizzazione si ha in genere dopo 3/6 giorni dal trauma o dall'inizio dell'ulcerazione e progredisce, alla velocità di 1 mm al giorno, dal limbo verso il centro dell'occhio. E' comunque un fenomeno positivo dal punto di vista prognostico e facilmente controllabile, a riparazione avvenuta, con colliri e pomate a base di cortisone (10).

Le ulcere corneali superficiali in genere, ma anche certe ulcere profonde, guariscono invece non tramite neovascolarizzazione, ma attraverso la riepitelizzazione della lesione da parte delle cellule basali. Da notare che talvolta le ulcere profonde che guariscono per riepitelizzazione possono lasciare un difetto corneale, una mancanza di tessuto chiamata "facet" (12). In 2 soggetti (casi n. 32, 43) interessati da ulcera profonda in cui si è avuta una guarigione di questo tipo, abbiamo riscontrato la completa riepitelizzazione della lesione e la negativizzazione all'esame con fluoresceina nonostante fosse presente una "facet", ovvero una mancanza di stroma corneale e quindi un infossamento della cornea visibile anche all'esame macroscopico.

Le ulcere indolenti refrattarie non tendono invece a guarire nonostante siano trascorsi già 7/10 giorni dalla comparsa della lesione. In questi casi è necessario applicare il cosiddetto debridement, ovvero la rimozione dell'epitelio necrotico con un tampone fino a quando il margine dell'ulcera non risulti costituito da epitelio sano e fortemente adeso allo stroma sottostante (14). Se l'epitelio necrotico non viene rimosso completamente, la guarigione sarà sicuramente ritardata o improbabile. Talvolta, infatti, vi sono ulcere di questo tipo che rimangono superficiali per settimane e poi vanno ad interessare gli strati profondi in seguito a ulteriori traumi o infezioni batteriche secondarie con il rischio di una possibile perforazione dell'occhio. Oltre ai tradizionali trattamenti di tarsorrafia e flap congiuntivale, in questo tipo di lesioni, a volte anche bilaterali, risulta molto efficace l'utilizzo di lenti a contatto morbide. Hanno infatti un effetto simile a quello dei flap congiuntivali, sono ben tollerate dall'animale, hanno il vantaggio di venire applicate in anestesia locale, non rendono l'animale cieco, consentono l'applicazione delle terapie locali e possono venire tranquillamente rimosse ed applicate più volte. Gli svantaggi sono invece dati dalla possibilità, peraltro abbastanza frequente, che si dislochino e vengano perse, e dalla disparità esistente tra le dimensioni ed il raggio di curvatura delle lenti reperibili in commercio ed il raggio di curvatura della cornea degli animali (9, 15).

In caso di ulcere profonde, recidivanti, perforate, o in rapido sviluppo, descemetoceli o prolapsi d'iride, risulta sempre molto importante cercare di proteggere il più possibile la cornea sede di lesione tramite tarsorrafia, flap congiuntivali o flap della terza palpebra (9).

Le ulcere profonde risultano essere molto pericolose in quanto l'eventuale perforazione può portare ad un prolasso d'iride. Per questo motivo la terapia chirurgica mira a dare un sostegno di tipo meccanico alla cornea oltre che a bloccare un'ulteriore distruzione del tessuto corneale (13); lo stesso discorso vale chiaramente anche per i casi di descemetoceli, ulcera perforata e prolasso d'iride.

I flap congiuntivali sono sicuramente un ottimo mezzo di supporto per la cornea cui forniscono un buon apporto di sangue nella sede di lesione. La zona in cui viene prelevato il tessuto per creare il flap rigenera dopo pochi giorni senza che sia necessario ricorrere a sutura. Questo tessuto viene in genere asportato dalla palpebra superiore o dalla terza palpebra, può essere libero o peduncolato; se peduncolato mantiene la sua continuità con il tessuto congiuntivale da cui viene prelevato (7). Non si devono creare flap troppo spessi che si dimostrano opachi ed interferiscono con la vista. I flap migliori, ma più difficili da eseguire, sono senz'altro quelli più sottili. Nell'arco di 2/3 settimane la lesione cicatrizza e la congiuntiva aderisce alla cornea epitelizzata. Il flap di solito va lasciato *in situ* fino a completa guarigione della lesione corneale. Il tessuto congiuntivale che rimane sulla cornea regredisce poi dopo poche settimane.

Un altro metodo più recente è quello relativo alla possibilità di utilizzo di cornee congelate per l'esecuzione di trapianti corneali omologhi (7).

In caso di descemetoceli e quindi della protrusione della *membrana di Descemet* attraverso il fondo di un'ulcera risulta importante suturare la cornea (le suture andranno poi

rimosse dopo circa 15-20 giorni), oppure eseguire anche in questo caso un flap al fine di evitare la possibilità di un eventuale perforazione dell'occhio e conseguente prolasso d'iride. Il descemetocoele è molto frequente in caso di ulcere centrali presenti in cani con occhi sporgenti, caratterizzati da minor sensibilità superficiale della cornea.

Nei casi di prolasso d'iride invece si interviene amputando l'iride prolassata o cercando eventualmente di riposizionarla in camera anteriore, se il prolasso non è troppo esteso e se la lesione è molto recente (meno di un'ora) (6). Bisogna poi provvedere a suturare la ferita con punti da materasso orizzontali staccati o con punti semplici staccati (in genere utilizziamo Nylon o Seta 8/0). La cornea inizialmente, dopo la sutura, appare piuttosto irregolare, ma poi si modifica e torna normale; a questo punto è opportuno cercare di proteggerla ulteriormente con un flap della terza palpebra o con un'eventuale tarsorrafia.

Nei casi invece in cui repertiamo la presenza di un corpo estraneo infisso nello spessore corneale risulta a volte sufficiente l'utilizzo di un ago da 25 G per sollevare ed asportare ad esempio l'eventuale spina, altre volte invece risulta indispensabile incidere il tessuto corneale parallelamente al corpo estraneo e quindi provvedere ad asportarlo.

La prognosi in tutti questi casi è sicuramente correlata alla profondità e all'estensione della lesione oltre che alla gravità del danno interno. Quando le lesioni profonde causano anche la rottura della lente è necessario eseguire una lentesomia per evitare la formazione di una cataratta secondaria di tipo traumatico.

Traumi da contusione gravi, ferite da arma da fuoco o corpi estranei penetranti provocano a volte danni irreversibili all'uvea e alla retina.

La penetrazione completa è sempre una situazione piuttosto grave poiché il rischio di infezioni intraoculari e di uveite è considerevole. L'entità dell'emorragia ha anch'essa valore prognostico in quanto, se non è imponente, la prognosi si dimostra favorevole. I coaguli di sangue vengono infatti riassorbiti dall'umor acqueo che poi tende, in breve tempo, a tornare trasparente.

Nella gestione delle lesioni corneali dalle più superficiali fino ai prolassi d'iride, risulta quindi molto importante l'utilizzo della terapia farmacologica. Il nostro protocollo terapeutico prevede l'utilizzo di farmaci locali quali antibiotici ad ampio spettro, inibitori delle collagenasi e midriatici e cicloplegici ai fini di attenuare il dolore derivante da un'uveite collaterale (1, 6, 8, 11, 14).

Un'importante regola da tenere sempre presente è l'assoluto divieto dell'impiego della terapia cortisonica, soprattutto locale, nei fenomeni di tipo ulcerativo (sempre che non siano presenti imponenti fenomeni di tipo uveitico che richiedono la somministrazione per via sistemica di cortisone) (12). La somministrazione per via sistemica non pare infatti avere lo stesso effetto dei trattamenti topici ed è essenziale per prevenire le conseguenze indesiderate che potrebbero derivare da una possibile uveite. I corticosteroidi infatti, riducono sì il dolore e la risposta infiammatoria, ma il loro uso locale inibisce il normale processo di guarigione e può esitare nella perdita dell'occhio attraverso la perforazione dello stesso. La loro azione tende infatti ad inibire la formazione del collagene, a ridurre l'attività fibroblastica ritardando così la guarigione epiteliale (9, 15). La loro applicazione locale è esclusivamente consentita nel controllo della vascolarizzazione corneale una volta che l'ulcera è guarita e risulta negativa all'esame con la fluoresceina, oltre che per rendere il più possibile trasparente la cornea una volta asportati i punti di sutura dei flap congiuntivali (3, 8, 14).

Se l'ulcera presenta necrosi corneale o perdura da più di cinque giorni, risulta importante eseguire una terapia anticollagenasica al fine di arrestare il rapido deterioramento dello stroma corneale provocato dalla digestione da parte delle collagenasi. Questi enzimi normalmente stimolano la rimozione delle cellule morte dalla cornea promuovendo così il normale processo di guarigione, ma, a volte, quando liberate da leucociti, fibroblasti corneali, funghi e batteri (ad esempio *Pseudomonas* spp.), possono portare ad un'eccessiva velocità nella lisi della cornea (5, 8). Tra i più usati inibitori delle collagenasi vi sono senz'altro l'acetilcisteina ed il siero di sangue contenente in abbondanza sostanze anticollagenasiche (12).

La terapia antibiotica e quella anticollagenasica nei casi di ulcera superficiale hanno una frequenza di somministrazione di tre volte al giorno (ogni otto ore), la frequenza aumenta poi gradualmente con il peggiorare della patologia fino a divenire decisamente aggressiva nei casi di lisi corneale nei quali è necessaria un'applicazione addirittura oraria per alcuni giorni.

Midriatici e cicloplegici invece, vengono applicati 1/3 volte al giorno a seconda delle necessità.

Nei casi in cui ci si trovi di fronte ad un'ulcera di qualsiasi dimensione che si sta approfondendo rapidamente, ad un'ulcera superficiale o profonda con margini indistinti di colore grigio-giallo, oppure ad un'ulcera di piccole dimensioni che però presenti una risposta infiammatoria sproporzionatamente intensa, risulta di notevole ausilio diagnostico l'esecuzione di un esame citologico e colturale della cornea (9).

L'efficacia della terapia medica in questo campo è data dalla possibilità di variare giornalmente il tipo dei farmaci e la loro posologia in relazione all'andamento dei sintomi e all'evoluzione della lesione.

In molti casi quindi, le lesioni corneali si rivelano patologie d'urgenza per le quali occorre un intervento immediato al fine di eliminare il dolore e il rischio della perdita della vista, permettendo così un prognostico migliore circa il recupero della capacità visiva dell'animale. In caso di descemetocèle, ulcera perforata o prolasso d'iride, risulta infatti molto importante intervenire immediatamente per evitare, nel primo caso che l'occhio si perfori, negli altri due lo scatenarsi di imponenti fenomeni di tipo uveitico che possono esitare nella perdita dell'occhio.



Figura 1. Esame con la fluoresceina.



Figura 2. Ulcera corneale superficiale associata a KCS e a neof ormazione della rima palpebrale superiore, evidenziata dal test con fluoresceina.

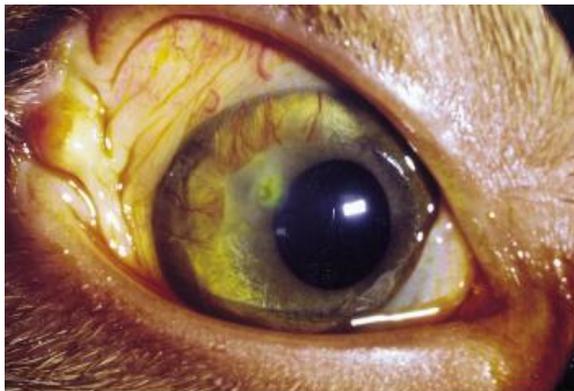


Figura 3. Piccola ulcera corneale superficiale evidenziata dal test con fluoresceina.



Figura 4. Ulcera cornea profonda evidenziata dal test con fluoresceina.



Figura 5. Cicatrice corneale esito di ulcera superficiale in un cane interessato da entropion.

Parole Chiave: Occhio, Cornea, Ulcera, Cane.

Key Words: Eye, Cornea, Ulcer, Dog.

Palabras Claves: Ojo, Córnea, Úlcera, Perro.

RIASSUNTO - Gli Autori riportano la loro esperienza circa le lesioni corneali del cane. Vengono presi in considerazione 78 soggetti (47 maschi e 31 femmine) visitati presso l'Istituto di Clinica Chirurgica dell'Università degli Studi di Parma.

Nei cani presi in esame sono stati evidenziati: 2 casi di ulcere indolenti recidivanti, 28 ulcere superficiali, 29 ulcere profonde, 2 descemetocoele, 4 ulcere perforate e 13 prolapsi d'iride.

Sono state esaminate le cause responsabili della lesione e la presenza o meno di altre patologie oculari sia preesistenti che causanti o conseguenti l'ulcera corneale. In 25 casi è stata eseguita una terapia farmacologica conservativa, mentre i restanti cani sono stati sottoposti ad intervento chirurgico. Sono stati poi discussi i vari tipi di intervento, le caratteristiche della terapia farmacologica ed i tempi di guarigione dei vari soggetti.

SUMMARY - The Authors report their experience on corneal lesions in dog. Seventy-eight dogs (47 males and 31 females) who presented at the Veterinary Surgery Department of the University of Parma were included in this study.

Of the 78 dogs included in this study: 2 presented with recurrent indolent ulcers, 28 had superficial ulcers, 29 presented with deep ulcers, 2 with descemetocoele, 4 with perforated ulcers and 13 with prolapses of iris.

We evaluated the aetiology of the corneal lesions along with the concurrent presence of other ocular pathologies, either preexistent or not.

Twenty-five dogs were treated pharmacologically, while the others underwent surgical treatment.

Then, we have discussed the different types of surgery, the characteristic of the pharmacological therapy and the time of healing of the different animals.

RESÚMEN - Los Autores aportan su experiencia acerca de las lesiones corneales del perro. Se toman en consideración 78 sujetos (47 machos y 31 hembras) visitados en el Instituto de Clínica Quirúrgica de la Universidad de los Estudios de Parma.

En los perros tomados en examen se evidenciaron: 2 casos de úlceras reincidentes, 28 úlceras superficiales, 29 úlceras profundas, 2 descemetocoele, 4 úlceras perforadas y 13 prolapsos de iris.

Hán sido examinadas las causas responsables de las lesiones y la presencia o menos de otras patologías oculares sea preexistentes, que causantes, que consecuentes de úlcera de la córnea.

En 25 casos se hizo una terapia farmacológica conservativa, mientras los demás perros fueron operados.

Uteriormente fueron discutidos los varios tipos de interventos, las características de las terapias farmacológicas y de los tiempos de cura de los varios sujetos.

## Bibliografia

- 1. Bedford P.G.C.: Urgenze oculari nel cane e nel gatto. Bollettino AIVPA, 1989, 2, 87-91.
- 2. Befanis P.J., Peiffer R.L., Brown D.: Endothelial Repair of the Canine Cornea. Am. J. Vet. Res., 1981, 42, 4, 590-595.

- 3. Bojrab M.J.: Current Techniques in Small Animal Surgery. 1990, 3rd, Lea & Febiger, 94-98.
- 4. Bojrab M.J.: Disease Mechanism in Small Animal Surgery. 1993, Lea & Febiger, 130-138.
- 5. Gelatt K.N.: Veterinary Ophthalmology. 1981, Ed. Lea & Febiger, 343-374.
- 6. Harvey C.H. et al.: Small Animal Surgery. 1990, J.B. Lippincott Company, 115-137.
- 7. Jensen H.E.: Stereoscopic Atlas of Ophthalmic Surgery of Domestic Animals. 1973, The C.V. Mosby Company, 59-89.
- 8. La Forge H.: Diagnosi e trattamento delle ulcere corneali. Waltham International Focus, 1993, 3, 1, 2-8.
- 9. Millichamp N.J., Dziezyc J.: Oftalmologia, Clinica Veterinaria del Nord America, Piccoli Animali. 1992, Antonio Delfino Editore, Volume VII N. 1-2, 69-113.
- 10. Peruccio C.: Diagnosi e trattamento delle lesioni corneali. Scienza Veterinaria, 1983, 1, 3-8.
- 11. Peruccio C.: Atlante di Oftalmologia Veterinaria. 1985, Edizioni Medico Scientifiche s.r.l., 167-218.
- 12. Petersen-Jones S.M.: Managing corneal ulceration in small animals. Atti del 4 th European FECAVA SCIVAC Congress, 1998, 337-340.
- 13. Severin G.A.: Manuale di oftalmologia veterinaria. 1990, Ed. Scivac, 115-146.
- 14. Slatter D.H.: Textbook of small animal surgery. 1985, W. B. Saunders Company, 1509-1531, 1584-1600.
- 15. Startup F.G.: Corneal ulceration in the dog. J. small Anim. Pract., 1984, 25, 737-752.

## AGGIORNAMENTI DI ELETTRORETINOGRAFIA (ERG) NEL CANE

Pier Luigi Dodi<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Istituto di Clinica Medica Veterinaria dell'Università di Parma.

### Premessa

L'elettrofisiologia dell'apparato visivo è il settore della semeiotica oculare che studia i fenomeni elettrici che si verificano a livello retinico. Infatti, gli eventi bioelettrici oculari possono essere registrati analogamente a quanto avviene per cuore e cervello.

Se si posiziona un elettrodo sulla cornea e un altro elettrodo di riferimento in una qualunque zona della testa si può misurare una differenza di potenziale di diversi millivolt, chiamato potenziale di riposo o "standing potential". Se lo stesso occhio è sottoposto ad uno stimolo luminoso si originerà un potenziale di massa (dato dalla somma di molte cellule) che costituisce l'ERG (Cordella e coll., 1991). L'ERG è uno dei più antichi potenziali biologici, già nel 1849 un ricercatore tedesco registrò una differenza di potenziale fra la cornea e l'estremità recisa del nervo ottico in un pesce.

L'ERG è una tecnica elettrodiagnostica scarsamente invasiva utilizzata in oftalmologia per la diagnosi delle patologie retiniche che coinvolgono fotorecettori (coni e bastoncelli), cellule dello strato bipolare e cellule di Müller. E' di fondamentale importanza nella valutazione della funzionalità retinica nei soggetti con cataratta e/o opacamento della cornea prima di un eventuale intervento chirurgico. In questi casi l'opacamento dei mezzi diottrici impediscono l'esame diretto del fondo oculare.

Altro campo applicativo è quello della diagnosi precoce delle malattie retiniche ereditarie quali: "Progressive Retinal Atrophy" PRA e "Sudden Acquired Retinal Degeneration" SARD, in quanto all'esame oculare diretto non può essere rilevata alcuna lesione in modo particolare nelle fasi iniziali delle patologie retiniche. Per queste retinopatie l'ERG è l'unico strumento diagnostico attualmente disponibile. L'ERG non è un test visivo ma valuta l'integrità funzionale della retina, infatti a seguito della recisione del nervo ottico il tracciato elettroretinografico rimane del tutto inalterato. L'ERG è il risultato dell'attività globale di tutte le cellule della retina e dell'epitelio pigmentato (Clerc, 1997) e non può diagnosticare lesioni focali (Slatter, 1990). Scopo della presente nota è quello di illustrare le recenti tecniche elettroretinografiche.

### Elementi di anatomia e fisiologia della retina

La retina è una parte specializzata del Sistema Nervoso Centrale costituita da una complessa struttura fotosensoriale multistratificata che delimita il segmento posteriore dell'occhio (Millichamp, 1992). E' di origine embriologica neuroectodermica, rappresenta una reale invaginazione del sistema nervoso collegata al cervello attraverso il nervo ottico (II NC), e si estende dall'entrata del disco al margine pupillare dell'iride. E' possibile dividerla in due porzioni: la porzione prossimale, che va dalla papilla all'equatore, costituisce la parte ottica della retina, dove si trovano gli elementi nervosi, e la porzione distale che non contiene fotorecettori. Lo spessore nel cane varia da 0,24 mm nella porzione centrale a 0,12 mm in quella periferica (Magrane, 1971). Istologicamente è formata da due lamine intimamente unite: quella esterna costituita da cellule pigmentate, definita retina pigmentata, e quella interna propriamente nervosa, costituita da nove strati di cellule. La connessione nervosa è organizzata su una catena di tre elementi di cellule nervose. Procedendo dalla parte periferica troviamo le cellule dei coni e bastoncelli, le cellule bipolari, le cellule multipolari e le cellule trasversali. I fotorecettori appoggiano sull'epitelio pigmentato della retina (EPR), uno strato di cellule piatte di forma poligonale sito tra coroide e strato dei fotorecettori. Le cellule dell'EPR hanno diverse ed importanti funzioni quali il trasporto dei nutrienti tra la coroide e gli strati più esterni della porzione neurosensoriale retinica, la fagocitosi e il mantenimento della retina adesiva attraverso la creazione di un gradiente di corrente di liquido all'interno dello spazio sub-retinico (Komaromy e coll., 1998/a). Tra epitelio pigmentato della retina e retina si frappono uno spazio virtuale, definito spazio sub-retinico, sede di possibile distacco o separazione retinica.

I fotorecettori (bastoncelli e coni) costituiscono lo strato più esterno della retina neurale. I bastoncelli, più stretti e lunghi dei coni, sono molto sensibili alla luce e pertanto risultano di fondamentale importanza per la visione notturna o crepuscolare (visione scotopica). I coni invece sono poco sensibili alla luce e la loro funzione principale è quella della differenziazione dei dettagli e dei colori (visione fotopica) (Stades, 1998). Il segmento più esterno dei coni e dei bastoncelli contiene molecole di pigmento che assorbono luce (rodopsina nei bastoncelli) in dischetti costituiti da una doppia membrana (Komaromy e coll., 1998/a). Nel cane la maggiore concentrazione di coni si trova nell'area centrale della retina, temporalmente al disco ottico (Koch, 1972). I bastoncelli sono più numerosi dei coni e si localizzano nell'area della periferia retinica. Nel cane nessuna parte della retina è libera da bastoncelli (come nella regione maculare dell'uomo).

La nutrizione della retina è garantita dalla coroide sottostante (seconda tunica oculare) e dai vasi della retina. Il contributo nutrizionale della coroide è fondamentale per il terzo esterno della retina in quanto la retina esterna non è irrorata da vasi sanguigni. Perciò questi strati ricevono ossigeno e nutrienti dalla coroide primariamente per diffusione. Ecco perché in caso di distacco di retina si ha atrofia delle cellule retiniche (a-Komaromy, 1998). La vascolarizzazione retinica vera e propria è assicurata dalle arterie e vene ciliari posteriori brevi, che si anastomizzano a livello del disco ottico a formare il circolo vascolare del nervo ottico, incompleto, da cui emergono quattro arteriole e venule principali (Lignereux, 1997) che si dispongono a epsilon rovesciata. Dalle arteriole e venule dipartono molti capillari microscopici che si distribuiscono nei diversi strati retinici. Nel cane, come negli altri animali e a differenza nell'uomo e dei primati, non esiste un'arteria centrale della retina (Monti, 1985).

Alla nascita la retina non è totalmente sviluppata, infatti la completa maturità morfologica nel cane si ha dalla sesta, settima settimane di vita (Aguirre, 1972). Una struttura cellulare extraretinica di fondamentale importanza per la visione notturna è il *tapetum lucidum*; è situato nello spessore della coroide, tra la coriocalpillare e lo strato dei grandi vasi della coroide, ed ha una forma triangolare a base orizzontale. Il *tapetum* è assente nei soggetti albini e nei neonati in cui si sviluppa dopo la nascita (Monti, 1985). Nel cane è costituito da 9-20 strati di cellule altamente organizzate al cui interno vi sono cristalli ad alto contenuto di zinco, cisteina (Miller e coll., 1995) e riboflavina. All'esame oftalmoscopico è visibile nel quadrante dorsale del fondo oculare con colori che variano da verde, blue e giallo a seconda della specie, razza ed età (Peiffer e coll., 1997).

La funzione del *tapetum* è quella di "amplificare" la luce (è il responsabile del fenomeno dell'abbagliamento degli occhi), per cui risulta indispensabile nelle condizioni di luminosità crepuscolare e notturna.

La fisiologia de retina è molto complessa ma lo studio dei processi che determinano la trasformazione della luce in corrente elettrica è di fondamentale importanza per comprendere i test elettrodiagnostici. La luce (fotoni) che colpisce la retina è assorbita dai fotorecettori che sviluppano una risposta elettrofisiologica definita fototrasduzione. Questo determina eccitazione ed inibizione delle cellule neurali che costituiscono la retina.

Nei fotorecettori si realizza il primo evento del processo visivo, la conversione del segnale luminoso in segnale elettrico neurale. Questo, attraverso lo strato delle cellule bipolari, arriva alle cellule ganglionari che rappresentano gli elementi di uscita della retina in quanto trasmettono alla corteccia, attraverso le fibre del nervo ottico, i segnali visivi (Cordella e coll., 1991). Le registrazioni di queste variazioni di potenziali di membrana nel tempo costituiscono l'Elettroretinogramma.

## Acquisizione ed elaborazione del segnale bioelettrico

L'equipaggiamento necessario per l'esecuzione dell'esame elettroretinografico è costituito dagli elettrodi, da una fonte luminosa flash o fotostimolatore (lampada allo xenon) e da un apparecchio di amplificazione e registrazione del segnale.

Gli elettrodi sono conduttori metallici per mezzo dei quali è possibile trasferire il segnale bioelettrico all'amplificatore.

I materiali normalmente impiegati sono l'argento, l'argento cloruro, l'oro, il platino e il carbonio (fibra di carbonio). I primi tre materiali sono da preferirsi per le loro caratteristiche di conducibilità e stabilità. Gli elettrodi si dividono in sottocutanei o ad agoinfissione e corneali (Magni, 1999).

Gli elettrodi corneali sono di materiale plastico, hanno la forma di lente a contatto e contengono un sottile filo d'oro o d'argento. L'aderenza dell'elettrodo corneale è generalmente garantita da un materiale conduttivo biocompatibile interposto fra l'elettrodo e il tessuto. A tal fine normalmente è impiegata la carbossimetilcellulosa sodica. Gli elettrodi riutilizzabili devono essere puliti con molta attenzione e sterilizzati dopo ogni uso in quanto sono potenzialmente in grado di trasmettere eventuali agenti infettivi, inoltre residui di lacrime o sangue possono compromettere la corretta registrazione dell'ERG. I protocolli di lavaggio e sterilizzazione da utilizzare sono quelli consigliati dalle case produttrici. Prima di iniziare il test elettroretinografico è necessario misurare l'impedenza dell'elettrodo, questa valutazione si ottiene facendo passare una corrente di 1 o 2 microAmper fra l'elettrodo da valutare e l'elettrodo di terra; il valore di impedenza ottenuto che deve essere al di sotto di 5 KOhm.

Lo stimolatore è un flash allo xenon (stimolo diffuso) che è posto a 20 - 30 cm dall'occhio da esaminare. Il flash può essere variato in intensità (a seconda del tipo) e durata. Inoltre è possibile interporre dei filtri (neutro, rosso o blu). E' necessario porre molta attenzione nella calibrazione del fotostimolatore in quanto variazioni in uscita sono causa di artefatti. La condizione ottimale per la stimolazione flash è la stimolazione "Ganzfeld". Lo stimolo Ganzfeld è una illuminazione indiretta ed omogenea ottenuta in una emisfera (Sims, 1999). Lo stesso tipo di stimolo può essere in parte riprodotto applicando una emisfera ottenuta da una pallina da ping-pong direttamente sull'occhio dell'animale (Macaluso, 1999).

L'amplificatore è un dispositivo in grado di "moltiplicare" il voltaggio del segnale registrato, questo è necessario in quanto il potenziale retinico è molto piccolo, inferiore ad 1 mV (Sims, 1999). L'amplificatore oltre ad amplificare la reale differenza di potenziale fra due elettrodi registra molti altri potenziali presenti tra qualsiasi coppia di elettrodi e l'ambiente circostante, che costituisce il cosiddetto rumore. Il rumore è di alcuni ordini di grandezza più elevato del segnale biologico d'interesse e può arrivare fino a mascherarlo completamente (Cordella e coll., 1991). Per evitare questo è necessaria l'elaborazione del segnale biologico e l'impiego di amplificatori differenziali. L'ambiente dove viene eseguito il test deve essere privo di apparecchi radiologici, ascensori ecc. ovvero di qualsiasi sorgente possibile causa di disturbo. In alcuni casi la schermatura dell'ambiente risulta pertanto necessaria (Tabella 1).

### **Tabella 1**

#### CAUSE DI VARIAZIONE DELTRACCIATO ERG

##### *FATTORI LEGATI ALL'AMBIENTE E ALL' ESECUZIONE*

- Temperatura dell'ambiente
- Adattamento o meno al buio
- Lunghezza d'onda
- Intensità e durata dello stimolo
- Tipo di anestesia
- Diametro pupillare

##### *FATTORI LEGATI ALL'ANIMALE*

- Età dell'animale (nei cuccioli l'ERG può essere registrato dalla seconda settimana di vita)
- Pressione intraoculare (PIO)
- Glicemia e tasso di O<sub>2</sub> ematica

(Curtis R. and Lightfoot R.M. 1993; Komaromy e coll., 1998)

## Tecnica di esecuzione

Il paziente deve essere anestetizzato e la pupilla dilatata mediante l'instillazione di farmaci midriatici (Tropicamide 1%). L'anestesia del cane è richiesta per ottenere l'immobilità dell'animale e per evitare eventuali movimenti pupillari ed oculari volontari ed involontari che comportano artefatti ed interferenze nella registrazione. Il protocollo dell'anestesia è estremamente importante in quanto gli anestetici gassosi alotano e isofluorano possono determinare una depressione del tracciato ERG (Es. riduzione dell'ampiezza). Per questi motivi può essere sufficiente una forte tranquillizzazione. Nel cane la combinazione ketamina-xylazina ha dato buoni risultati (Sims, 1999).

Il primo elettrodo positivo (attivo) è una lente a contatto che viene applicata sulla superficie corneale previa interposizione di carbossipropilmetilcellulosa, un mezzo viscoso che garantisce una maggiore adesione ed impedenza (non vi devono essere bolle d'aria fra lente e cornea). Le palpebre sono tenute aperte grazie ad un blefarostato. Il secondo elettrodo negativo (reference electrode) è infisso nella cute "dietro l'occhio" lungo l'arco zigomatico, circa a metà distanza fra il canto laterale dell'occhio e la base del padiglione auricolare. Il terzo elettrodo, definito di terra (indifferente), è infisso nel sottocute nell'area temporale o frontale (Severin, 1996), applicato alla base dell'orecchio. Gli elettrodi ad agoinfissione sono introdotti tangenzialmente nella cute e vengono a contatto con i fluidi organici. I potenziali d'azione sviluppati vengono registrati dall'elettroretinografo. La retina è stimolata sia dopo l'adattamento al buio (scotopico), sia alla luce (fotopico). La stimolazione luminosa può essere variata in intensità, colore e frequenza ed in questo modo può essere selettiva sull'attività dei coni o bastoncelli. Il tipo e la qualità della luce è modificata attraverso l'uso di filtri bianchi, blu e rossi. La luce bianca stimola sia i coni che i bastoncelli, la blu stimola solo i bastoncelli, quella rossa i coni anche se nel cane lo spettro della luce rossa risulta poco significativo (Clerc, 1997). Lo stimolo flicker (30 Hz) valuta la capacità della retina a rispondere a stimolazioni luminose veloci ed intermittenti. L'attività dei coni e dei bastoncelli può essere differenziata, variando intensità e frequenza dello stimolo, in quanto i bastoncelli rispondono a frequenze minori a 20 Hz, mentre i coni a frequenze di stimolazione superiori o uguali a 30 Hz (Mertel e coll., 1993)

## Lettura del tracciato

Il tracciato elettroretinografico è costituito da tre onde: "a", "b" e "c", anche se per scopi clinici vengono considerate solo le prime due (Figura 1).

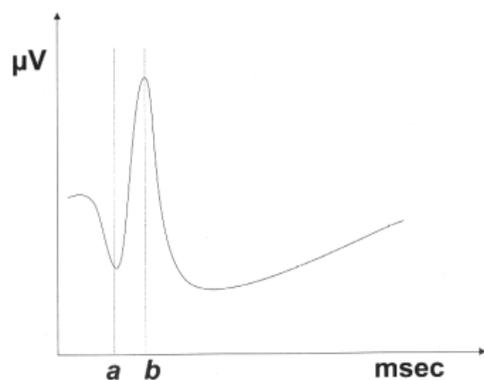


Figura 1.  
Schema del tracciato normale ERG: in cui si evidenziano le due onde a - b.

L'onda "a" si presenta come una deflessione negativa che riflette l'attività dei fotorecettori ed è il risultato di due onde: a1 e a2. La prima esprime l'attività dei coni (fotopica), la seconda quella dei bastoncelli (scotopica). Le due onde possono essere divise stimolando la retina con luce monocromatica con filtri rossi (coni) e blu (bastoncelli), al fine di individuare una deficienza di un tipo di cellule fotorecettoriali. Il culmine di tempo dell'onda "a" è di 12-14 ms e la sua ampiezza è di 12 mV. Questa è seguita dall'onda "b", positiva, che esprime la funzione delle cellule dello strato bipolare e di Müller, sulla sua porzione ascendente si identificano i potenziali oscillatori, rappresentati da piccole onde, in genere 5, che riflettono un'attività sinaptica nella retina interna (Mertel e coll., 1993). L'onda "b" è costituita da due componenti distinte: b1 che riflette l'attività fotopica e b2 che riflette quella scotopica. L'onda "c" è generata dall'epitelio pigmentato della retina (Clerc, 1997).

La valutazione clinica del tracciato elettroretinografico è immediata. I valori di riferimento utili per identificare una retinopatia devono essere determinati in ogni singola struttura. L'assenza dei valori normali delle onde elettroretinografiche è dovuto alla mancanza di procedure standard e alle differenti condizioni in cui operano i diversi laboratori (Tabella 2).

**Tabella 2**

Caratteristiche Delle onde	Luce Blu		Luce Bianca		Autore
	Onda A	Onda B	Onda A	Onda B	
Ampiezza (□V)	-	-	-12	44	Roze M., 1987 <sup>1</sup>
Latenza (msec)	-	-	14	34	
Ampiezza (□V)	-10/-15	10/20	-15/-35	30/45	Chaudieu G., 1992 <sup>2</sup>
Latenza (msec)	20/45	60/95	15/35	50/75	

<sup>1</sup> 10 minuti di adattamento al buio con fonte luminosa posta a 20 cm.

<sup>2</sup> 10 minuti di adattamento al buio con fonte luminosa posta a 20 cm e 8 stimolazioni con filtro blu.

## Applicazioni cliniche e conclusioni

Prima di iniziare un esame elettroretinografico è bene avere un sospetto diagnostico per sapere cosa si va a cercare con l'esame elettrofisiologico. Solo così facendo è possibile arrivare ad una diagnosi. Quindi, segnalamento, anamnesi e visita clinica devono precedere il test elettroretinografico.

Lo studio elettrofisiologico delle vie ottiche risulta in molti casi di estrema importanza per indirizzare la diagnosi di alcune patologie. Esistono forme in cui l'aspetto clinico ed oftalmoscopico è chiaro ma in molti casi la diagnosi (specialmente nelle prime fasi o nelle forme precoci) risulta di estrema difficoltà. L'ERG consente l'analisi obiettiva funzionale della retina e trova quindi applicazione in tutte le patologie ereditarie, tossiche, vascolari, traumatiche ecc. che coinvolgono questa struttura (Tabella 3). L'ERG preoperatorio nei cani da sottoporre all'intervento di cataratta andrebbe sempre eseguito con luce bianca per valutare la funzione retinica (Clerc, 1997). La diagnosi attraverso l'ERG ci porta non solo ad un indirizzo terapeutico dove possibile, ma ci permette soprattutto di formulare una prognosi funzionale.

**Tabella 3**

*Usi Clinici dell'ERG.*

1 Patologie dove non è possibile fare l'esame del fondo oculare:

- opacità corneali
- cataratta
- opacità vitreali
- Ifema o ipopion

2 Patologie retiniche ereditarie:

- Atrofia progressiva generalizzata della retina; la risposta all'ERG varia secondo il tipo di PRA
  - Emeraldopia – Malamute: normale risposta dei bastoncelli, assente quella dei coni
  - Nictalopia (Cecità notturna) – Diminuzione dell'onda-b
- Nei casi più gravi riduzione dell'intero ERG.
- Displasia retinica – cambi evidenti solamente in alterazioni gravi

3 Altre malattie:

- SARD – Diminuzione o assenza dell'ERG può essere osservata prima dei segni visibili all'oftalmoscopio.
- Degenerazione retinica infiammatoria – lesioni focali non determinano variazioni significative a differenza dell' distacco totale della retina che determina una depressione dell'ERG
- Malattie del nervo ottico e cecità corticale – ERG normale
- Glaucoma – Negli stadi iniziali l'ERG è normale Il Glaucoma cronico determina una diminuzione dell'ERG dovuto al sottostante atrofia retinica.

Da: Severin G.A. Severin's Veterinary Ophthalmology Notes. 3 ed. Fort Collins Colorado.

Parole chiave: cane, ERG, patologia retinica

Key words: dog, ERG, retinal disease

RIASSUNO - L'elettroretinografia è un valido aiuto per la diagnosi della cecità nel cane: patologie retiniche degenerative ereditarie. Al test devono essere sottoposti tutti gli animali prima dell'intervento di cataratta. Prima di iniziare il test è richiesta la dilatazione pupillare e l'adattamento al buio. Un elettrodo a forma di lente a contatto è posto sulla superficie corneale. L'elettrodo di riferimento è posizionato dietro la testa mentre quello di terra è posto alla base dell'orecchio. Il potenziale d'azione è prodotto dal fotostimolatore. La retina è stimolata dopo l'adattamento al buio (scotopico) e alla luce (fotopico). Lo stimolo luminoso può essere variato in intensità, colore e frequenza. Il tracciato ottenuto è composto da 3 onde. La prima, negativa, "onda a" riflette l'attività dei fotorecettori, l'onda "b", positiva, che segue è data dallo strato intermedio, mentre l'"onda c" riflette l'attività dell'epitelio pigmentato. L'adattamento alla luce riflette la funzione dei coni, quello al buio dei bastoncelli. L'ERG è un test della funzionalità retinica, non è un test visivo.

SUMMARY - Electroretinography helps in differential diagnosis of blindness in animals: hereditary retinal diseases and degeneration. The test is support animal to be operated for cataracts. Before starting test pupils must be dilated and dark adaptation may be required. A contact lens electrode is applied to the eye surface. A reference electrode is applied to the forehead a ground to an earlobe. The action potential is produced by light stimulation. The retina is stimulated after either dark (scotopic) or light (photopic) adaptation. The light stimulus can be varied in intensity, color and frequency. The tracing is made up of 3 waves. The first negative deflection, named "a wave", reflects the outer retinal layer (photoreceptor) activity. The positive "b wave" follows and is generated by intermediate retinal layer. The "c wave" is generated by pigmented epithelium. The light adapted response primarily reflects cone functions. The dark adapted response is primarily from the rods. ERG is a retinal response not a visual test.

## Riferimenti bibliografici

- Aguirre G.D., Rubin L.F., Bistner S.I. : The development of the canine eye. Am. J. Vet. Res. 33: 2399-2414, 1972.
- Chaudieu G.: Affections dysplasiques et dégénératives héréditaires de la rétine du chien. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 27:5, 647-677,1992.
- Cordella M., Franchi A., Baratta G., Macaluso C.: Guida all'esecuzione delle indagini elettrofisiologiche in oftalmologia. casa editrice Mattioli, Fidenza, 1991.
- Clerc B.: Ophthalmologie vétérinaire. 2° Ed., Point vétérinaire Maisons-Alfort, 1997.
- Curtis R., Lightfoot R.M.: Conditions of the fundus. In Petersen-Jones S.M., Crispin S.M. (Ed.): Manual of small animal ophthalmology, BSAVA, pp. 240-241, 1993.
- Gelatt K.N.: Retinal diseases in small animals, Proceedings Voorjaarsdagen Amsterdam, pp 57-58,1999.
- Koch S.A., Rubin : Distribution of cones in the normal dog. Am. J. Vet. Res., 33:2,361-363, 1972.
- Komaromy A.M., Smith P.J., Brooks D.E.: Electroretinography in dogs and cats. Part I. Retinal morphology and physiology. The Compendium 20:3, 343- 349, 1998/a.
- Komaromy A.M., Smith P.J., Brooks D.E.: Electroretinography in dogs and cats. Part II. Technique, interpretation, and indications. The Compendium 20:3, 355.- 366, 1998/b.
- Lignereux Y.: E'léments d'anatomie ophtalmologique du chien. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp. 32:(Supp.):7-20,1997.
- Macaluso C.: Comunicazione personale, 1999.
- Magni R.: Elettrodi e stimolatori visivi. In Libro del II corso di elettrofisiologia oculare. Università di Padova, 30 settembre - 1 ottobre, pp. 5-7, 1999
- Magrane W.G.: Canine ophthalmology. 2° ed. Lea & Febiger Philadelphia, 1971.
- Mertel L., de Gresti A.: Prime esperienze di elettroretinografia clinica (ERG) nel cane normale. Atti Sisvet, 1993.
- Miller P.E., Murphy C.J.: Vision in a dog. JAVMA,207:12,1623,1995.
- Monti F., Peruccio C., Solarino A. : La retina e il nervo ottico. In Peruccio (Ed.): Atalante di oftalmologia veterinaria. Ed. Scientifiche Torino, pp. 379-424,1985.
- Peiffer R.L., Petersen-Jones S.M.: Small animal ophthalmology: a problem-oriented approach. 2 ° ed. W.B. Saunders London, 1997.
- Severin G.A. Severin's Veterinary Ophthalmology Notes. 3 ed.
- Fort Collins Colorado, pp. 54-56, 1996.
- Sims M.H.: Electrodiagnostic evaluation of vision, In Gelatt K.N. (Ed.): Veterinary Ophthalmology, 3° ed. Lippincott W&W Philadelphia,1999.
- Slatter D.: Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. 2°ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1990.
- Stades F.C. Wyman M. Boevé M.H.,Neumann W.: Ophthalmology for the veterinary practitioner. Schluterssche Hannover, 1998.
- Roze M.: Affections héréditaires de la rétine du chien. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 27:5,619-644,1992.

# LE NEOPLASIE OCULARI DEL CANE E DEL GATTO: REVISIONE BIBLIOGRAFICA ED ESPERIENZE D'ISTITUTO

OCULAR NEOPLASMS OF DOG AND CAT: REVIEW OF RECENT LITERATURE AND CASE RECORDS

Miduri F., Di Lecce R., Luppi A.<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Parma. e-mail: Apvet@unipr.it

## Introduzione

Le neoplasie oculari del cane e del gatto sono fenomeni morbosi poco comuni in relazione alle altre patologie che colpiscono l'occhio stesso; tuttavia tumori primari e secondari possono insorgere in questa sede localizzandosi più frequentemente nella porzione anteriore dell'uvea.

L'esigua dimensione dell'organo e l'estrema interdipendenza fra i tessuti contigui rendono, purtroppo, difficoltosa l'applicazione di una terapia di tipo conservativo che consenta il suo rispetto anatomico ed il recupero della visione. L'esecuzione precoce dell'intervento di enucleazione riduce al minimo il potenziale rischio di metastasi e permette il prelievo di campioni tissutali necessari per la diagnosi istopatologica e la relativa prognosi.

Una miglior conoscenza di queste neoplasie pertanto, se da un punto di vista pratico può portare ad una diagnosi più precoce ed ad un eventuale terapia più consona e confortevole, sotto l'aspetto speculativo potrebbe maggiormente chiarire il valore di quei fattori citogenetici che tanto interesse hanno nella patologia tumorale d'organo, per la possibilità o meno di confermare o escludere un eventuale rapporto tra le caratteristiche istologiche del singolo reperto e l'andamento evolutivo del processo morboso.

Nel corso di questi ultimi anni il progressivo ampliamento delle nostre conoscenze in tema di patologia dell'apparato oculare negli animali d'affezione ha fatto sì che anche questa branca si configurasse come un settore scientifico disciplinare proprio, richiedente una specifica competenza formativa e professionale, al pari di quanto si verifica in medicina umana.

Sembra sempre più auspicabile, pertanto, che anche il medico veterinario cominci a prendere in considerazione questa realtà, inserendo nel proprio bagaglio culturale e professionale anche l'anatomia patologica delle neoplasie oculari e dei suoi annessi. Scopo principale della presente nota è la descrizione anatomo-patologica delle forme neoplastiche che colpiscono più frequentemente il globo oculare del cane e del gatto, mediante la revisione più recente della bibliografia in proposito supportata dai reperti osservati nell'Istituto di Anatomia Patologica di Parma. Avendo infatti a disposizione una discreta casistica di tumori oculari, giunti in quest'ultimo lustro (1995-1999) alla nostra osservazione e ben documentata istologicamente, abbiamo creduto opportuno raccoglierla ed illustrarla qui di seguito.

## Richiami anatomici

L'apparato visivo è costituito da due ordini di formazioni anatomiche: quelle direttamente collegate al fenomeno della visione e quelle accessorie, che fanno da supporto alle precedenti. In particolare, alle prime corrispondono i *bulbi oculari*, i *nervi ottici*, le *vie ottiche* che congiungono la retina ai centri nervosi ed i *centri nervosi* stessi; alle seconde corrispondono una serie di organi annessi al bulbo destinati a proteggerlo, mantenerlo in situ, consentirne il movimento e permetterne il deflusso del liquido lacrimale. Esse sono l'*orbita*, il *corpo adiposo dell'orbita*, la *periorbita*, le *fasce del bulbo*, le *palpebre* e la *congiuntiva*, le *ghiandole*, i *muscoli*, i *vasi sanguigni* ed i *linfatici*, le *vie nervose* e *lacrimali*.

Il *bulbo oculare* del cane e del gatto, isolato dalle sue connessioni, ha una forma paragonabile ad una sfera; la sua consistenza è ben definita in "vivo" e può presentare variazioni sia fisiologiche che patologiche.

Dal punto di vista strutturale l'occhio si compone di tre membrane concentriche sovrapposte: *tonaca fibrosa*, *tonaca vascolare* o *uvea* e *tonaca nervosa* o *retina*.

La *tonaca fibrosa* è formata da una porzione anteriore trasparente, la *cornea*, e da una porzione posteriore bianca, la *sclera*, separate da un solco sclero-corneale a livello del quale la seconda si sovrappone alla prima. E' formata da tessuto connettivo denso, irregolare e conferisce resistenza meccanica all'occhio.

La *tonaca vascolare* o *uvea* è molto più esile della precedente ed è di colore violaceo per la presenza di pigmenti e di abbondante vascolarizzazione. In senso oro-aborale forma l'*iride*, i *corpi ciliari* e la *coroide*. L'iride è la porzione anteriore direttamente osservabile e funge da diaframma separando la camera anteriore da quella posteriore; è dotata centralmente di un'apertura, la *pupilla*, il cui compito è quello di correggere costantemente la quantità di energia luminosa che arriva alla retina, variando la sua dimensione; è posteriormente addossata al *cristallino* ed in mancanza di questo appoggio (afachia o lussazione della lente) l'iride oscilla liberamente nell'umor acqueo (iridodonesi). La forma pupillare varia nelle diverse specie: rotonda nel cane e a fessura verticale che si arrotonda dilatandosi, nel gatto. Il colore dell'iride varia individualmente e dipende dalla densità del pigmento e dalla compattezza degli strati superficiali; in genere, negli animali domestici, il colore tende al marrone con variazioni dal chiaro, fino al giallo oro, allo scuro o al blu di varia intensità. Talvolta il colore dell'iride è diverso nei due occhi del medesimo soggetto, variando persino nell'ambito dello stesso occhio (eterocromia bi-o monoculare).

Il corpo ciliare è la parte media dell'uvea ed insieme all'iride forma la cosiddetta uvea anteriore; è composta da una *pars plicata* (anello di circa 100 processi ciliari, che variano in rapporto alla specie, e creste lamellari longitudinali inserite nella faccia interna del corpo ciliare) e da una *pars plana* confinante con la porzione periferica della retina. Ai processi ciliari sono ancorate le fibre della zonula che sospendono la lente.

La coroide è la porzione posteriore dell'uvea e si estende dai bordi della papilla all'ora serrata; è formata da tessuto connettivo lasso molto pigmentato nel quale è immersa una fitta rete vascolare che provvede al nutrimento dell'epitelio pigmentato retinico e della parte esterna della retina. La superficie interna della coroide è tenacemente adesa all'epitelio pigmentato retinico; la superficie esterna invece è lassamente unita alla sclera con la quale delimita uno spazio virtuale, lo *spazio pericoroideale* o *sovracoroideale* nel quale decorrono vasi e nervi. Strutturalmente si divide, dall'esterno all'interno, in: 1) strato sovracoroideale, 2) strato dei grossi vasi, 3) tappeto lucido, 4) coriocabillare, 5) membrana basale o membrana di Bruch. Il tappeto lucido, presente nella maggior parte degli animali domestici in modo più o meno sviluppato, è localizzato nello strato più interno della coroide, subito al di sotto della membrana di Bruch, in posizione postero-dorsale; nei carnivori è formato da cellule rettangolari che centralmente possono arrivare a 35 strati sovrapposti nel gatto e a 15 nel cane (tappeto cellulare).

La *tonaca nervosa* o *retina* forma il rivestimento interno della maggior parte del compartimento posteriore dell'occhio, è la zona otticamente stimolabile e termina lungo una linea dentellata, l'*ora serrata*, dietro il corpo ciliare. Anteriormente a tale linea, lo strato retinico si continua con uno strato epiteliale non fotosensibile che riveste sia il corpo ciliare che la superficie posteriore dell'iride. Una depressione della retina definita *fovea* è considerata l'area di maggior acuità visiva degli animali (specialmente dell'uomo) ed è circondata da una zona pigmentata, la *macula lutea*. Istologicamente, la retina viene suddivisa per tradizione in dieci strati distinti, formati dalla convivenza di tre tipi cellulari principali:

#### 1. i neuroni

- fotorecettori;
- cellule delle fibre afferenti che passano nel nervo ottico;
- neuroni di integrazione;

#### 2. le cellule epiteliali pigmentate;

#### 3. le cellule di supporto dei neuroni (cellule di Muller).

Le fibre afferenti dalla retina convergono formando il *nervo ottico* che lascia l'occhio attraverso una porzione della sclera definita *lamina cribrosa*: la parte di retina che ricopre questa lamina, la *papilla ottica* (*disco ottico*), rappresenta un punto cieco poiché manca di fotorecettori.

### **Classificazione delle neoplasie oculari**

La classificazione delle neoplasie oculari dei piccoli animali riveste notevole importanza dal punto di vista dell'anatomia patologica comparata, dal momento che anche nell'uomo sono presenti le medesime tipologie di tumore.

Tra le classificazioni proposte dai vari ricercatori ci sembra che quella desunta da Kircher C.H. et al. (1974), acquisita successivamente da Dahme e Weiss (1983) e da Cammarata (1997), sia da preferire per la semplicità e l'organicità con cui vengono raggruppate le neoplasie primarie e secondarie che possono colpire il globo oculare.

### **1. Neoplasie epiteliali**

- (palpebre, congiuntiva, cornea, ghiandole)
- Teratoma (dermoide)
- Papilloma
- Basalioma
- Carcinoma squamocellulare
- Adenoma delle ghiandole lacrimali
- Adenocarcinoma delle ghiandole lacrimali
- Adenoma della gh. di Meibomio
- Adenocarcinoma della gh. di Meibomio
- Adenoma delle gh. sebacee
- Adenocarcinoma delle gh. sebacee
- Adenoma delle gh. sudoripare apocrine
- Adenocarcinoma delle gh. sudoripare apocrine

### **2. Neoplasie mesenchimali**

#### **A. Extraoculari**

##### Neoplasie del tessuto congiuntivale

- Fibroma
- Fibrosarcoma
- Mixoma
- Mixosarcoma

##### Neoplasie del tessuto muscolare

- Rabdomioma
- Rabdomiosarcoma

##### Neoplasie dei vasi sanguigni

- Emangioma
- Emangiosarcoma

##### Neoplasie dei nervi periferici

- Fibroblastoma perineurale
- Neurofibrosarcoma

##### Neoplasie del tessuto osseo

- Osteosarcoma

##### Mastocitoma

##### Istiocitoma canino

#### **B. Del tratto ottico**

- Meningioma
- Reticulosis

#### **C. Del tratto uveale**

- Emangioma
- Leiomioma

### **3. Neoplasie neuroectodermiche**

#### **A. Epitelio iridociliare**

- Adenoma papillare, tubulo-alveolare, solido
- Adenocarcinoma
- Medulloepitelioma
- Medulloblastoma

#### **B. Retina**

- Astrocitoma
- Retinoblastoma

### **4. Neoplasie melanocitiche**

#### **A. Palpebre e congiuntiva**

- Melanoma benigno (melanocitoma)
- Melanoma maligno (melanoma)

#### **B. Tratto uveale**

- Melanoma benigno (melanocitoma)
- Melanoma maligno (melanoma)

### **5. Neoplasie secondarie**

- Linfomi
- Carcinomi mammari
- Emangiosarcomi
- Carcinomi renali, tiroidei, uterini, pancreatici, epatici
- Sarcoma venereo trasmissibile del cane
- Seminomi
- Sarcoma osteogenico
- Rabdomiosarcoma
- Tumori all'epitelio nasale, all'epidermide, alle ghiandole sudoripare.

### **6. Lesioni di aspetto simil-neoplastico**

- Dermoide oculare
- Cisti epidermoide
- Cisti dermoide.

### Neoplasie primarie

Nel cane e nel gatto le neoplasie *primarie* più comuni sembrano essere in ordine di frequenza, il *melanoma uveale anteriore* e l'*adenoma-adenocarcinoma ciliare*, limitatamente al globo oculare, nonché forme coinvolgenti le strutture ghiandolari palpebrali (gh. di Meibomio) e la terza palpebra; sono tuttavia noti casi rari di emangioma, medulloepitelioma, medulloblastoma e retinoblastoma primari.

A) NEOPLASIE della CONGIUNTIVA e della CORNEA

Le forme primarie interessanti la congiuntiva e la cornea sono abbastanza rare sia nel cane che nel gatto. Nel cane prevale l'*emangioma congiuntivale benigno*, singolo o a sedi multiple, che in genere non arreca fastidio all'animale, ma può sanguinare se irritato. Altre neoplasie presenti in questa sede sono i papillomi virali, gli istiocitomi, gli emangiosarcomi, i melanomi ed il *carcinoma squamocellulare* (Narfstrom K., 1985). Quest'ultimo (pur nella sua rarità) sembra essere il tipo di neoplasia corneo-congiuntivale più frequente nel gatto nel quale, quando si sviluppa, manifesta potenzialità più maligne rispetto all'analoga forma benigna del cane. Si qualifica, in questa specie, come forma a

carattere maligno invasivo, originante dall'epidermide, con caratteristiche morfologiche simili a quelle della corrispondente forma cutanea; interessa primariamente la congiuntiva, poi le palpebre ed eventualmente la cornea con formazione di lesioni a placca o simil-papillomatose ulcerate. Può invadere i tessuti orbitali e periorbitali per continuità e/o contiguità e le possibili metastasi coinvolgono prima i linfonodi cervicali poi il polmone, a partire dal quale possono generalizzare. E' comune nei gatti a mantello bianco, a palpebre non pigmentate e sembra essere in diretto rapporto con l'esposizione ad agenti fisici (polvere, vento, radiazioni UV), (Cammarata G., 1997).

Altre neoplasie congiuntivali riscontrabili nel gatto sono i papillomi, i fibromi-fibrosarcomi, i neurofibromi-neurofibrosarcomi e gli emangiomi-emangiosarcomi.

I *papillomi squamosi* sono tumori di origine epiteliale abbastanza comuni nel cane e nel gatto che interessano frequentemente la congiuntiva e la cornea. Si localizzano preferibilmente a livello di limbo o di margine palpebrale e macroscopicamente si presentano come neoformazioni soffici, peduncolate o sessili di colore grigio-rosso oppure intensamente pigmentate. Dal punto di vista istologico ricalcano la struttura dell'analoga forma cutanea con proliferazione di cellule squamose riunite in fasci intercalati da tessuto connettivo. Tali cellule possono successivamente andare incontro a processi di epidermizzazione o di cheratinizzazione.

L'*emangioma* è una neoplasia descritta nella congiuntiva del cane, caratterizzata dalla dilatazione ed ingorgo dei piccoli vasi sanguigni con conseguente iperplasia dell'epitelio sovrastante. Macroscopicamente appare come una neoformazione liscia, generalmente di colore rosso a livello di terza palpebra, oppure notevolmente pigmentata a livello di congiuntiva bulbare. All'esame istologico si rilevano grossi canali vascolari localizzati al di sotto dell'epitelio iperplastico (Carlton W.W., Render J.A., 1988).

#### B) NEOPLASIE delle GHIANDOLE

Nei cani giovani è abbastanza frequente l'*adenoma della ghiandola lacrimale della terza palpebra* che si presenta macroscopicamente come una formazione nodulare liscia ed intensamente rossa. Sul piano istologico si rilevano cellule ipercromatiche, cuboidali e poligonali disposte a formare strutture tubulari solide (Gwin R.M. et al., 1982; Peiffer Jr R.L. et al., 1991).

La forma maligna (*adenocarcinoma*) si osserva soprattutto in cani di età avanzata ed è caratterizzata da un maggior sdifferenziamento cellulare con aspetti di metaplasia squamosa dell'epitelio ghiandolare; l'invasività è limitata ai casi più avanzati e le metastasi (polmonari) sono un evento raro. Un'altra forma, solitamente benigna nel cane è l'*adenoma sebaceo della ghiandola di Meibomio*.

#### C) NEOPLASIE dell'EPITELIO CILIARE

Fra le neoplasie neuroectodermiche del tratto uveale l'*adenoma-adenocarcinoma primario dell'epitelio ciliare* del cane è sicuramente il più rappresentato, dopo il melanoma uveale anteriore. Esso deriva dall'epitelio differenziato del corpo ciliare ed è frequente in soggetti di media età o anziani; non sembrano esservi predisposizioni di sesso o razza. Macroscopicamente gli *adenomi* si presentano come formazioni nodulari, solide, generalmente pigmentate, a crescita molto lenta prevalentemente in direzione centripeta con caratteristica espansione intraoculare; possono originare dal corpo ciliare o, più raramente, dall'epitelio posteriore dell'iride. Dal punto di vista istologico tali neoplasie sono costituite da elementi epiteliali ben differenziati riuniti in strutture papillari, tubulari o alveolari, con nuclei ovali e citoplasma eosinofilo, appoggiati su un unico strato di membrana basale. La struttura adenoide è ben differenziata e talvolta dotata di attività secretiva; l'indice mitotico è molto basso.

La forma maligna (*adenocarcinoma*), al contrario, è caratterizzata dalla proliferazione neoplastica in senso centrifugo con progressiva invasione della base dell'iride, della coroide e della giunzione corneo-sclerale (Peiffer Jr R.L. et al., 1992). Questa neoplasia si presenta clinicamente come una neoformazione vascolarizzata, di colore rosa, non pigmentata a livello di base iridea. Dal punto di vista istologico le cellule neoplastiche hanno tendenza a disporsi in cordoni solidi, ma non all'organizzazione adenoide e nemmeno all'attività secretiva. Le due tipologie neoplastiche, benigna e maligna, si caratterizzano per dar luogo alla formazione di una membrana fibrovascolare che può occludere l'angolo iridocorneale determinando l'instaurarsi di glaucoma o di emorragie intraoculari. Le eventuali lesioni metastatiche sono, in genere, correlate a forme neoplastiche di grandi dimensioni o inveterate (Peiffer Jr R.L. et al., 1992). I pochi casi riportati nel gatto hanno finora mostrato un comportamento ben più invasivo rispetto al cane.

#### D) MELANOMI

In base alla loro sede d'origine i melanomi oculari vengono classificati in:

A) MELANOMI EXTRAOCULARI: epibulbare e palpebro-congiuntivale;

B) MELANOMI INTRAOCULARI: uveale anteriore (iride e corpi ciliari) e della

coroide.

I *melanomi dell'uvea* sono le più comuni forme neoplastiche primitive nel cane ed interessano frequentemente l'iride ed il corpo ciliare, occasionalmente la coroide. Originano da melanociti presenti nelle medesime sedi e le forme neoplastiche derivanti dall'iride mostrano un grado di benignità maggiore rispetto a quelle derivanti dal corpo ciliare. La casistica riporta maggior incidenza di neoplasia nei soggetti an-ziani (8-10 anni) e sembra che con il progredire dell'età ci sia un aumento del rischio di malignità. Nella maggioranza dei casi, tali neoplasie sono ad evoluzione benigna con accrescimento lento verso l'interno dell'occhio, ma spesso possono determinare complicanze secondarie come uveiti, ifemi e glaucomi per chiusura dell'angolo irido-corneale. Solo nel 20% dei casi si evidenziano caratteristiche istologiche di malignità ed in un terzo di questi insorgono metastasi (Peiffer Jr R.L. et al., 1992). Macroscopicamente la neoplasia si può manifestare, in forma nodulare o diffusa, come una massa vascolarizzata di colore rosa e leggermente pigmentata oppure, più tipicamente, molto pigmentata con tendenza all'estensione subito dietro al limbo.

La maggior parte dei melanomi iridei del cane rappresenta l'estensione di neoplasie del corpo ciliare che si rendono clinicamente evidenti solo nella fase di infiltrazione dell'iride o della sclera (Peiffer Jr R.L., 1981).

Nel gatto è abbastanza frequente il *melanoma diffuso dell'iride*. Macroscopicamente infila diffusamente lo stroma irideale, i corpi ciliari ed eventualmente la sovrastante sclera e la porzione periferica della cornea. All'esame istologico si evidenzia la proliferazione di cellule fusate ed epitelioidi, con citoplasma schiumoso ed eosinofilo e scarsa pigmentazione.

I *melanomi primitivi della coroide* rappresentano entità rare e distinte rispetto alle corrispondenti forme originanti dal tratto anteriore o dalla regione epibulbare. Queste neoplasie si localizzano in corrispondenza del quadrante posteriore del globo oculare ed alcune infiltrano anche il nervo ottico; si presentano a forma di cupola e di solito determinano ispessimento della coroide ed edematosità dell'epitelio pigmentato. Non sono considerate neoplasie particolarmente aggressive e difficilmente manifestano caratteri di anaplasia o di invasività, per cui si suppone siano forme benigne anche se possono provocare distacco retinico con perdita della facoltà visiva. I cani di razza Beagle sembrano essere particolarmente predisposti; al contrario i felini in genere non sembrano avere predisposizioni particolari.

Talvolta i melanomi coroidali del cane derivano dall'estensione di neoplasie originate dal tratto uveale anteriore che solo in seguito vanno ad infiltrare la coroide.

Sotto l'aspetto istopatologico i melanomi vengono classificati in base al tipo cellulare predominante, secondo lo schema di Callender usato in Medicina Umana (Peruccio C., 1985):

1. TIPO A CELLULE FUSATE (Fig.1): il TIPO A è caratterizzato dalla presenza di nuclei piccoli ed ovoidali, nucleoli piatti e scarse figure mitotiche; il TIPO B è costituito da cellule più voluminose con grossi nuclei, nucleoli evidenti e figure mitotiche più frequenti rispetto al tipo precedente.
2. TIPO A CELLULE EPITELIOIDI (Fig.2): è popolato da elementi più voluminosi di forma poliedrica e citoplasma acidofilo, da scarso ad abbondante. I nuclei sono grandi, rotondi ed irregolari con più nucleoli evidenti ed alta attività mitotica, valutata maggiore di quella del tipo a cellule fusate.
3. TIPO A CELLULE MISTE: è la forma intermedia ed è il tipo più frequentemente rappresentato nel cane e nel gatto.

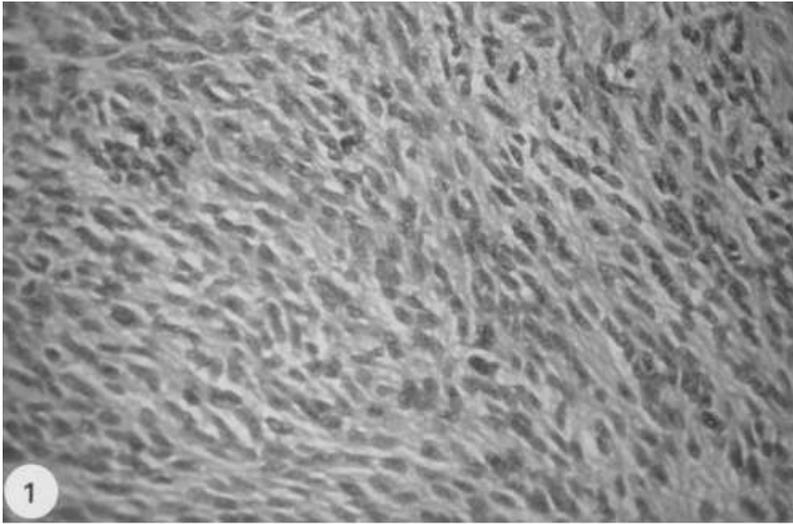


Figura 1 - Melanoma: tipo a cellule fusate (ematossilina-eosina, 200X)

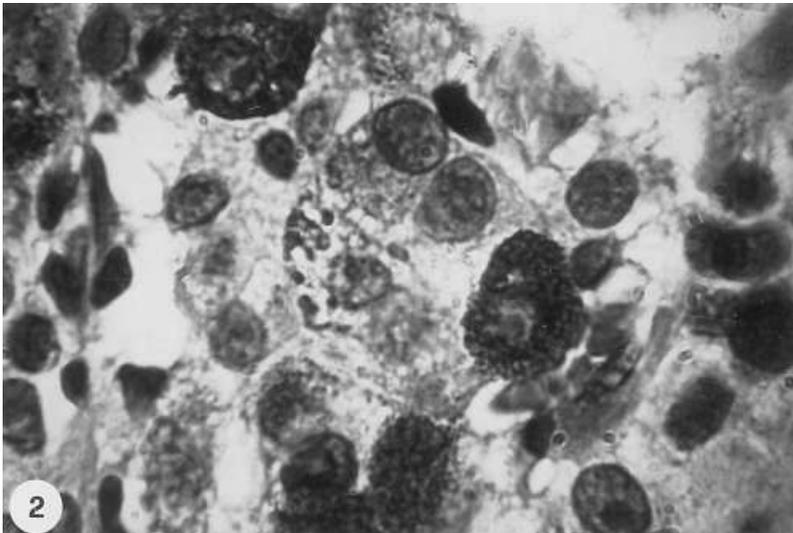


Figura 1 - Melanoma: tipo a cellule epitelioidi (ematossilina-eosina, 600X)

Essendo clinicamente impossibile distinguere le forme potenzialmente maligne da quelle benigne, nei casi di forte interessamento del corpo ciliare con complicazioni secondarie (uveite, glaucoma, ifema, dolore etc.) è indicata l'enucleazione del globo oculare. Al contrario, per le piccole lesioni all'iride si preferisce adottare una terapia di tipo conservativo, osservando periodicamente l'evoluzione neoplastica: nel caso di una crescita troppo rapida si preferisce effettuare un iridectomia.

Nel gatto, di età maggiore ai 5 anni, i melanomi dell'uvea anteriore (iride e corpi ciliari) si manifestano frequentemente in forma maligna (pur essendo presenti anche forme benigne) con tendenza precoce alla metastasi; l'indice di mortalità valutato è abbastanza elevato (75%). Si possono presentare in forma nodulare o diffusa ed, in quest'ultimo caso, iniziano

come proliferazioni cellulari pluristratificate sulla superficie anteriore dell'iride alla quale conferiscono una colorazione marrone scura. Si osserva comunemente la comparsa di glaucoma secondario che, spesso, costituisce il motivo per cui l'animale viene portato alla visita clinica.

Fra le neoplasie palpebrali i *melanomi* rappresentano circa il 20% delle forme tumorali riscontrabili nei soggetti adulti. Si configurano come formazioni pigmentate (anche amelanotiche) ad ampia base, di aspetto a cupola o sessile; generalmente sono molto invasivi, ma difficilmente coinvolgono le strutture intraoculari e sono caratterizzati da un grado di malignità progressivo in rapporto alle loro dimensioni.

Sul piano istopatologico si presentano sotto forma di lamine o nidi di cellule fusate o epitelioidi (la presenza di queste ultime corrisponderebbe ad un grado di malignità più elevato), oppure miste, contenenti quantità variabili di pigmento melanico. A volte si riscontrano quadri istologici in cui la componente fibroblastica risulta essere piuttosto rappresentata; in questo caso i melanociti appaiono raggruppati in fasci irregolari frammisti a fibroblasti.

I *melanomi epibulbari* insorgono prevalentemente a livello di giunzione sclero-corneale o in corrispondenza del limbo. Il cane risulta essere l'animale domestico più colpito ed i casi riportati in letteratura hanno evidenziato una certa predisposizione nei Pastori Tedeschi di qualsiasi età. Si manifestano come neoformazioni rilevate a lento accrescimento, circoscritte, compatte e quindi generalmente benigne. Solitamente rimangono nettamente staccate all'interno della sclera, localizzandosi prevalentemente a livello di quadrante dorso-laterale dell'occhio e comunque sempre nella porzione superiore della superficie esterna del globo oculare.

Queste neoplasie sono per la maggior parte rappresentate da cellule fusate tipo A, leggermente pigmentate, dotate di nucleo ovale e da cellule di forma tondeggianti di dimensioni maggiori, fortemente pigmentate per la presenza di granuli citoplasmatici di melanina matura (cellule epitelioidi).

Dal punto di vista prognostico si può affermare che i melanomi epitelioidi e quelli a cellule fusate tipo B sono caratterizzati da un rischio metastatico più elevato, quelli a cellule fusate tipo A hanno generalmente prognosi favorevole per l'animale, mentre quelli misti prognosi riservata.

La disseminazione metastatica dei melanomi oculari avviene per via ematogena, mentre l'infiltrazione locale si attua tramite le strutture vascolari e nervose.

I criteri di malignità si basano essenzialmente sull'aspetto macroscopico della neoplasia, sulle sue dimensioni, sul grado di invasività delle strutture circostanti, sull'assetto morfologico e sull'indice mitotico cellulare: le neoplasie che presentano meno di due mitosi per campo, a forte ingrandimento (media calcolata su 10 campi), sono da considerarsi benigne (Peiffer Jr R.L. et al., 1992).

### Neoplasie secondarie

Le neoplasie *secondarie* possono raggiungere il globo oculare per via ematogena, in caso di disseminazione metastatica da un'altra sede, oppure per estensione di una forma neoplastica primariamente localizzata nell'orbita o a livello di strutture annessiali. Quella ematogena è sicuramente la via più comune di diffusione all'occhio riportata in letteratura.

Nonostante siano ampiamente descritte dai vari autori, tali neoplasie sono da considerarsi un reperto non molto comune nei piccoli animali ad eccezione del *linfoma* che risulta essere il tipo di tumore metastatico intraoculare più frequente nel cane e nel gatto, seguito in entrambe le specie dal carcinoma metastatico (Peiffer Jr R.L. et al., 1992).

Il *linfoma* metastatico intraoculare si manifesta spesso in forma bilaterale; il tratto uveale anteriore sembra essere il sito d'elezione, anche se è possibile l'invasione di tutto il globo oculare da parte delle cellule linfoidi neoplastiche. Se la presenza di cellule neoplastiche intraoculari è limitata, esse sono per la maggior parte localizzate a livello di radice dell'iride e di corpi ciliari, arrangiate a formare strutture perivascolari o gruppi cellulari; al contrario nel caso di infiltrazione massiva oculare, la proliferazione neoplastica interessa tutta l'uvea anteriore e la corioide.

Il linfoma oculare si accompagna quasi sempre a sintomi di ordine sistemico che possono essere evidenziati dall'esame clinico e da indagini ausiliarie; le uveiti, le iriti, le emorragie intraoculari ed i glaucomi sono i segni clinici oculari più frequentemente riportati (Peruccio C., 1985).

Le neoplasie metastatiche di origine epiteliale che interessano l'occhio includono quelle derivanti dall'epitelio nasale, dall'epidermide, dalle ghiandole sudoripare, dalla congiuntiva, dalla tiroide, dal pancreas, dal fegato, dall'utero e dalla ghiandola mammaria, nonché forme derivanti dal tumore venereo trasmissibile del cane, da seminomi, da sarcomi osteogenici e da rhabdomyosarcomi. Quelle di origine mesenchimale rappresentano le forme metastatiche che più frequentemente colpiscono l'occhio del cane e del gatto, per la già citata prevalenza del linfoma oculare (Carlton W.W., Render J.A., 1988).

E' bene non dimenticare che tutte le neoplasie maligne possono interessare il globo oculare a causa della ricca vascolarizzazione uveale. Addirittura alcune neoplasie, sotto lo stimolo di particolari fattori endogeni o di altra natura, possono manifestare particolare predilezione proprio per i tessuti oculari. Tuttavia la sclera costituisce una formidabile barriera all'estensione intraoculare dei tumori dell'orbita, ed i casi di invasione oculare diretta descritti in letteratura sono per lo più rappresentati dall'estensione di meningiomi lungo il nervo ottico o da altre forme neoplastiche del tessuto nervoso (Peiffer Jr. R.L., 1992).

Macroscopicamente le lesioni metastatiche intraoculari possono essere rappresentate da neoformazioni isolate o multiple occupanti spazio all'interno dell'occhio, oppure da infiltrazioni neoplastiche diffuse, di tipo aspecifico, che possono determinare la comparsa di emorragie endoculari, uveiti e glaucomi secondari.

Dal punto di vista prognostico le neoplasie che interessano secondariamente il globo oculare hanno generalmente una prognosi riservata o infausta, dal momento che sono spesso associate ad un'estesa disseminazione di cellule tumorali (Peiffer Jr R.L. et al., 1992).

#### Casistica d'istituto

L'incidenza delle neoplasie dell'occhio valutata sui dati di archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria di Parma nell'ultimo lustro (1995-1999), si è rivelata contenuta e, purtroppo, non confrontabile per assenza di casistiche riportate in letteratura poiché esistono solo studi monografici sulle singole neoplasie oculari. Il motivo principale di questo quadro potrebbe essere imputato non tanto alla bassa incidenza delle forme neoplastiche oculari, quanto piuttosto alla limitatezza di campioni che vengono sottoposti, dopo l'enucleazione, ad una indagine di tipo istologico per una diagnosi mirata. Ciò potrebbe essere determinato da diversi fattori:

- la difficoltà ad affrontare in modo specialistico i problemi di natura oftalmologica;
- il fatto che solitamente l'animale viene condotto alla visita veterinaria a seguito di patologie secondarie;
- la scarsa possibilità di disporre di terapie alternative all'enucleazione efficaci, spesso fa ritenere non necessario un successivo approfondimento.

Di seguito vengono riportate le tabelle relative ai dati di archivio consultati negli ultimi cinque anni (1995-1999), suddivise per specie.

TABELLA A: Specie felina

NEOPLASIA	RAZZA	SESSO	ETA'	LOCALIZZAZIONE
Carcinoma squamocellulare	Europeo	F	9 a	Palpebra sup
	Europeo	M	9 a	Orbitale sx
	Europeo	M	10 a	Palpebra inf
	Europeo	M	10 a	Orbitale
Melanoma maligno	Europeo	F	12 a	Palpebra inf
	Europeo	M	13 a	Iride-Corpi ciliari
Adenocarcinoma gh.sudoripare apocrine	Europeo	M	11 a	Coroide
	Europeo	M	13 a	Palpebra infer. dx
	Europeo	M	14 a	Palpebra infer.
Fibroma	Europeo	M	12 a	Palpebra
Linfosarcoma	Europeo	F	13 a	Massa retrobulbare
	Europeo	M	10 a	Massa retrobulbare
Mastocitoma	Europeo	F	10 a	Palpebra sup. sx
Adenocarcinoma	Europeo	M	11 a	Periorbita sup. dx
	Europeo	F.C.	10 a	Gh. Terza palpebra

TABELLA B: Specie canina

NEOPLASIA	RAZZA	SESSO	ETA'	LOCALIZZAZIONE
Carcinoma squamocellulare	P.T.	M	6 a	Arcata orbitaria dx
	Drahtar	M	5 a	Palpebra-congiuntiva
Melanoma maligno	Setter	F	13 a	Palpebra
	Meticcio	M	10 a	Coroide
	P.T.	M	12 a	Corpi ciliari
Melanoma amelanotico	Shi-tzu	M	7 a	Palpebra
Adenoma gh. Meibomio	Bracco t.	M	8 a	Congiuntiva palp.
	Bobtail	F	9 a	Congiuntiva palp.
	Meticcio	F	13 a	Congiuntiva palp.
	Dalmata	M	8 a	Congiuntiva palp.
Epitelioma sebaceo	Samoiedo	F	14 a	Palpebra infer.
	Meticcio	M	6 a	Palpebra
	Breton	M	7 a	Palpebra
	P.T.	F	10 a	Palpebra
	Meticcio	M	7 a	Palpebra infer.
Medulloblastoma	Meticcio	M	5 a	Camera anteriore
Melanocitoma composto	Setter irl.	M	3 a	Palpebra
Adenoma	Alano	F	9 m	Gh.terza palpebra
	Meticcio	M	11 a	Gh.sebacee palp.
	Drahtar	M	5 a	Gh.sebacee palp.
	Terranova	M	9 a	Gh.sebacee palp.
Adenocarcinoma	Meticcio	F	8 a	Gh.sebacee palp.
Fibrosarcoma	Cocker	M	13 a	Massa retrobulbare
Istiocitoma	Dalmata	F	3,5 a	Sottorbitale

La casistica consultata presso il nostro Istituto ha compreso l'osservazione di 15 gatti e 24 cani di varie razze ed età.

#### A) SPECIE FELINA

Per quanto riguarda i gatti, tutti di razza Europea, due (maschi di 9 e 10 anni) presentavano un carcinoma squamocellulare a livello di porzione orbitale e tre (due femmine di 9 e 12 anni, un maschio di 10 anni) a livello palpebrale.

Dal punto di vista istopatologico, i due casi di carcinoma squamocellulare orbitali si sono presentati macroscopicamente come neoformazioni papillomatose ulcerate, localizzate nella porzione orbitale superiore, caratterizzate da proliferazione di elementi epiteliali squamosi atipici disposti in nidi e cordoni infiltranti il derma. Le cellule neoplastiche hanno mostrato aspetti variabili di anisocitosi ed anisocariosi e spesso si sono manifestate disposte in strati concentrici, cheratinizzati al centro, cosiddette "perle cornee". A livello palpebrale, si sono evidenziati due neoplasie coinvolgenti la palpebra inferiore ed una quella superiore. I rilievi macroscopici e microscopici hanno ricalcato i quadri lesivi già descritti in precedenza, con l'eccezione di un soggetto che ha manifestato, macroscopicamente, una neoformazione a placca non ulcerata (maschio di 10 anni).

Un melanoma amelanotico maligno interessante il tratto uveale anteriore (iride, corpi ciliari) è stato diagnosticato in un gatto maschio di 13 anni, FIV positivo. Macroscopicamente il bulbo enucleato si è presentato totalmente sovravvissuto nella sua struttura anatomica normale; la neoformazione ha interessato, infatti, l'intera cavità oculare, caratterizzandosi istologicamente per la presenza di cellule fusate (tipo B) associate a qualche rara cellula epitelioidale, prevalentemente disposte a formare *clusters* o filiere, frammiste a numerose aree di necrosi. I nuclei hanno manifestato notevole pleomorfismo e contenevano nucleoli prominenti. Si sono osservate frequenti ed atipiche mitosi (Fig.3 e 4).



Figura 3 - Melanoma amelanotico uveale anteriore (gatto maschio di 13 anni, FIV positivo). Sezione meridiana dopo fissazione: il bulbo enucleato presenta una massa modicamente pigmentata compatta, occupante l'intera cavità oculare.

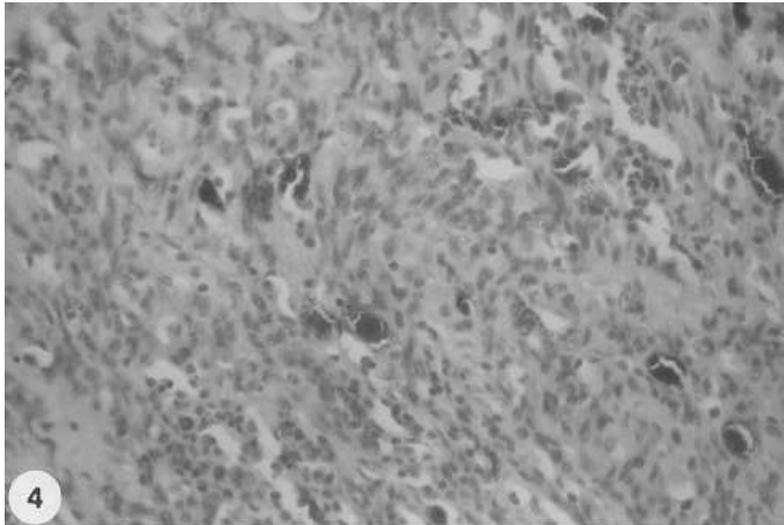


Figura 4 - Melanoma amelanotico uveale anteriore (gatto maschio di 13 anni, FIV positivo). Sezione istologica: la neoformazione si caratterizza per la presenza di cellule fusate (prevalentemente di tipo B), talune provviste di granuli di melanina, disposte in filiere, associate a qualche rara cellula epitelioide (ematossilina-eosina, 400X)

Un melanoma coroideale è stato riscontrato in un maschio di 11 anni. All'esame istopatologico del globo oculare si è osservata la presenza di una massa neoformata a livello

di quadrante posteriore, popolata da cellule melanocitarie sdifferenziate, spesso provviste di voluminosi granuli di melanina. Tali cellule si sono presentate arrangiate in modo disorganico, infiltrando ed alterando la morfostruttura oculare. Il tipo citologico dominante è stato espresso dal rilievo di cellule fuse unitamente a qualche rara cellula epitelioida. Si sono osservate frequenti mitosi (Fig.5).

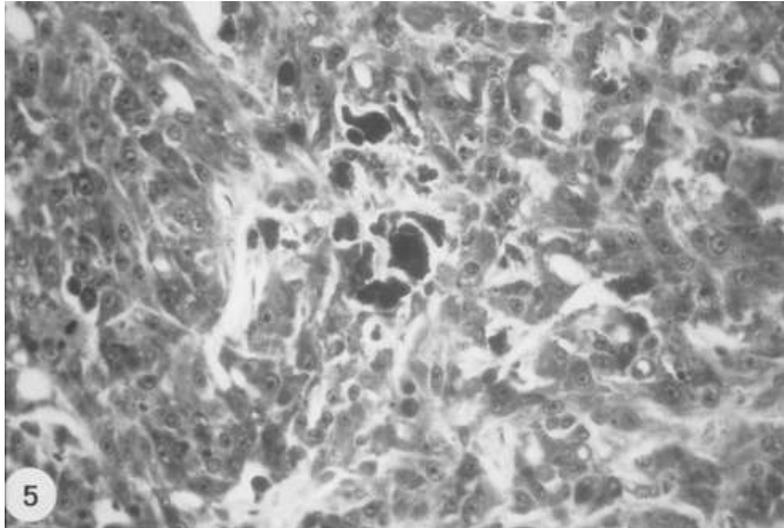


Figura 5 - Melanoma corioideale di tipo misto a prevalente composizione fusata gatto maschio di 11 anni). Sezione istologica.: la neof ormazione si presenta popolata da cellule melanocitarie prevalentemente fuse, sdifferenziate, provviste di voluminosi granuli di melanina ed arrangiate in modo disorganico (ematossilina-eosina, X400)

Nella nostra casistica abbiamo valutato solo due casi di adenocarcinoma delle ghiandole sudoripare apocrine (maschi di 13 e 14 anni), entrambi localizzati a livello di palpebra inferiore. La biopsia ha evidenziato la massiva proliferazione di elementi epiteliali atipici, atteggiati in strutture tubulari, solide o cistiche; numerosi gli elementi epiteliali in mitosi.

Un fibroma palpebrale è stato riscontrato in un maschio di 12 anni. Macroscopicamente si è presentato come una formazione rotondeggiante ben delimitata, di consistenza fibro-elastica, di circa 1 cm di diametro. Istologicamente la neof ormazione è risultata rivestita da epidermide normostrutturata ed il derma è apparso ispessito, di aspetto fibromatoso, caratterizzato da notevole proliferazione di fibroblasti e fibrociti immersi in un'abbondante quantità di collagene. Gli elementi cellulari neoplastici si sono presentati distribuiti uniformemente, con scarse figure mitotiche senza atipie nucleari.

Un adenocarcinoma della ghiandola della terza palpebra è stato osservato in una femmina sterilizzata di 10 anni. Dal punto di vista istopatologico la neof ormazione è stata caratterizzata da proliferazione di elementi epiteliali sdifferenziati, con spiccati fenomeni di anisocitosi ed anisocariosi, arrangiati in nidi e strutture simil-tubulari che infiltravano il corion. Presenza di quadri di metaplasia squamosa; discreto anche il rilievo di elementi linfo-polimorfonucleati

Sono state riscontrate due masse retrobulbari, una in una femmina di 13 anni e l'altra in un maschio di 10 anni. La biopsia ha permesso di formulare la diagnosi istopatologica di linfosarcoma, per la presenza di elementi neoplastici di origine linfoide caratterizzati prevalentemente da grosse cellule a citoplasma basofilo, talvolta microvacuolizzato, con nucleo centrale ed un nucleo prominente. Diversi i riscontri di cellule in atteggiamento cariocinetico.

Gli ultimi due casi di mastocitoma sono stati diagnosticati in un maschio di 11 anni, a livello di periorbita superiore, e in una femmina di 10 anni, a livello di palpebra superiore. Il quadro istopatologico è stato caratterizzato da proliferazione di elementi rotondocellulari, voluminosi e pleomorfi, contenenti granuli metacromatici intracitoplasmatici (Giemsa positivi), infiltranti massivamente il derma.

## B) SPECIE CANINA

La casistica relativa alla specie canina ha compreso l'osservazione di 24 neoplasie di altrettanti cani, di cui due carcinomi squamocellulari, tre melanomi localizzati in diverse sedi, un melanoma amelanotico, quattro adenomi della ghiandola di Meibomio, cinque epitelomi sebacei, un medulloblastoma, un melanocitoma composto, quattro adenomi ghiandolari palpebrali, un adenocarcinoma palpebrale, un fibrosarcoma retrobulbare ed un istiocitoma.

I due carcinomi squamocellulari hanno interessato rispettivamente un pastore tedesco (maschio di 6 anni) all'arcata orbitaria destra, ed un drahthaar (maschio di 5 anni) a livello di giunzione palpebro-congiuntivale. Il quadro istopatologico è stato caratterizzato da iperplasia dell'epidermide con fenomeni di ipercheratosi, associati a proliferazione di cellule squamose che invadevano il derma e che spesso formavano caratteristiche "perle cornee".

I tre casi di melanoma sono stati osservati in un setter (femmina di 13 anni), in un meticcio (maschio di 10 anni) e in un pastore tedesco (maschio di 12 anni), rispettivamente localizzati a livello palpebrale, corioideale e di corpi ciliari. Quest'ultimo si accompagnava a panoftalmite manifesta confermata, all'esame istopatologico, da flogosi settica interessante sia la cornea che le strutture circostanti, associata a distacco retinico. Gli elementi melanocitari a livello di corpi ciliari si sono presentati in attiva proliferazione (Fig.6).

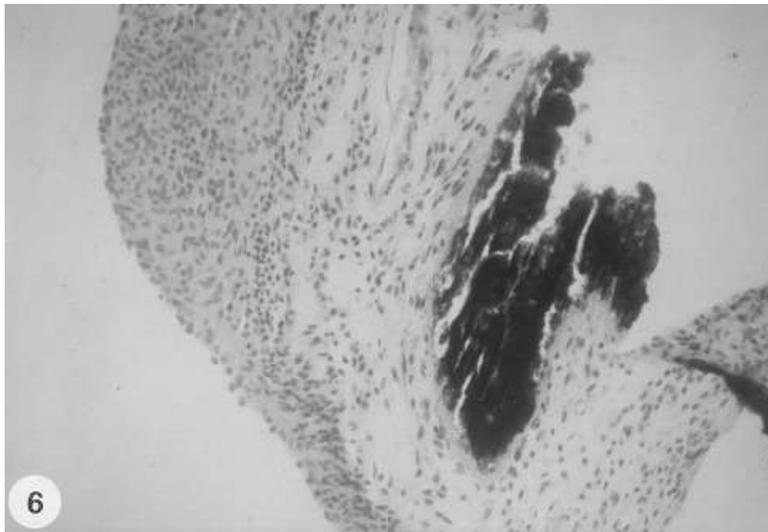


Figura 6 - Melanoma dei corpi ciliari (pastore tedesco, maschio di 12 anni) (sezione istologica, ematossilina-eosina, 200X)

In un cane shi-tzu maschio di 7 anni è stato diagnosticato un melanoma amelanotico a livello palpebrale. All'esame istopatologico del derma si è rilevata la presenza di una voluminosa neoformazione costituita da elementi cellulari fusati, rotondeggianti o stellati, con nucleo ovoidale, talvolta contenenti scarsi granuli di melanina nel citoplasma.

Quattro casi di adenoma della ghiandola di Meibomio sono stati osservati rispettivamente in un bracco tedesco (maschio di 8 anni), in un bobtail (femmina di 9 anni), in un dalmata (maschio di 8 anni) ed in un meticcio (femmina di 13 anni), tutti localizzati a livello di congiuntiva palpebrale. Dal punto di vista istopatologico le varie neoformazioni esofitiche hanno presentato proliferazione di cellule a differenziazione sebacea disposte a formare strutture adenomatose regolari (Fig.7).

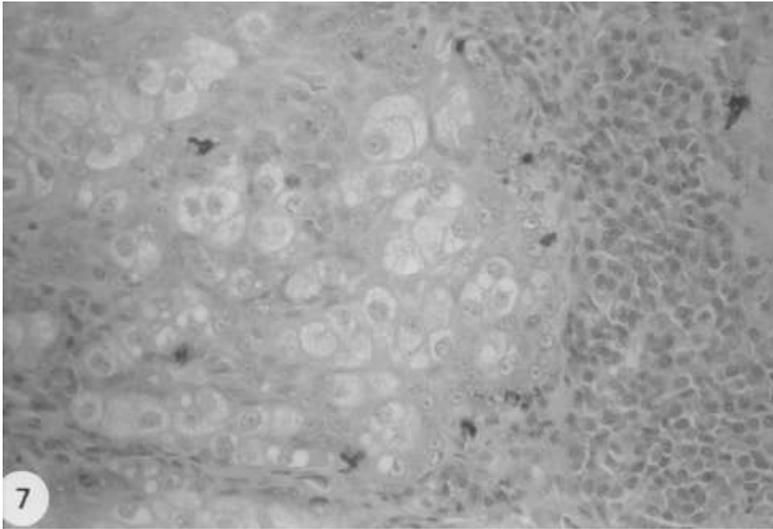


Figura 7 - Adenoma della ghiandola di Meibornio (dalmata, maschio di 8 anni). Sezione istologica: la neoformazione esofitica, a livello di congiuntiva palpebrale, è caratterizzata dalla proliferazione di cellule a differenziazione sebacea, disposte a formare strutture adenomatose regolari (ematossilina-eosina, 200X)

Cinque casi di epiteloma sebaceo palpebrali sono stati osservati rispettivamente in un samoiedo (femmina di 14 anni), in un breton (maschio di 7 anni), in un pastore tedesco (femmina di 10 anni) e in due meticci (maschi di 6 e 7 anni). I quadri istopatologici delle cinque neoformazioni sono risultati facilmente sovrapponibili per la presenza di zone più o meno ampie di ulcerazione, di proliferazione di elementi epiteliali basali di riserva, talvolta con aspetti di differenziazione sebacea e per la presenza di numerosi infiltrati di linfopolimorfonucleati. In un caso (breton, 7 anni), si sono osservati elementi cellulari contenenti granuli di melanina. In un altro si è rilevata la contemporanea presenza di linfangioma con numerosi vasi linfatici dilatati a livello di derma (meticcio, maschio, di 6 anni).

Una neoplasia particolarmente interessante, per la sua nota rarità d'insorgenza, e degna di descrizione in questa sede è il medulloblastoma, osservato in un meticcio, maschio, di 5 anni e coinvolgente la camera anteriore dell'occhio.

Il medulloblastoma è una forma neoplastica che origina dall'epitelio primitivo del neuroectoderma ed è poco comune sia nell'uomo che negli animali; solitamente è di natura congenita ma può manifestarsi clinicamente da alcuni mesi a parecchi anni dalla nascita. Contrariamente al retinoblastoma è spesso unilaterale e macroscopicamente si presenta come una massa molle, di colore bianco-grigio che si spinge ad occupare le cavità dell'occhio. Il campione bioptico giunto alla nostra osservazione ha evidenziato la proliferazione di cellule rotondeggianti a limiti mal definiti, con nucleo scuro e scarso citoplasma; tali elementi atipici per morfologia ricordano cellule blasto del sistema nervoso, fatto ulteriormente confermato dal caratteristico arrangiamento a "rosette" attorno ad un lume o ad una struttura vascolare. Numerosi gli elementi in mitosi (Fig.8).

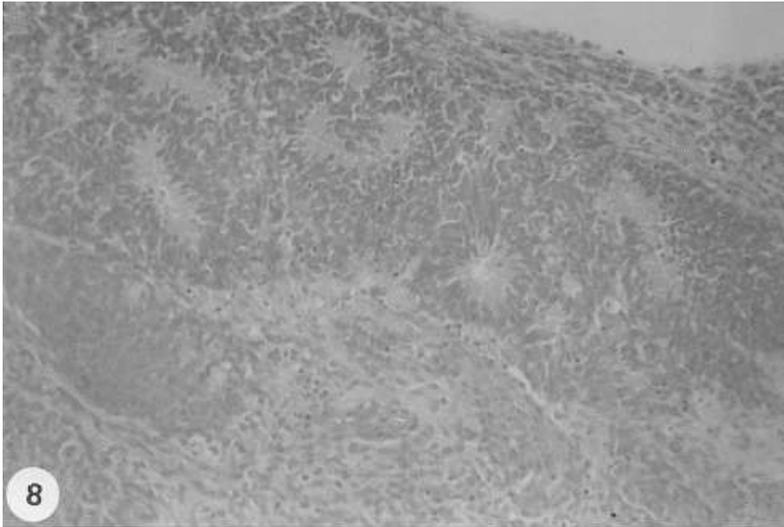


Figura 8 - Medulloblastoma (meticcio, maschio di 5 anni).  
 Sezione istologica: si evidenzia la proliferazione di cellule rotondeggianti a  
 limiti mal definiti, con nucleo scuro e scarso citoplasma che ricordano cellule  
 "blasto" del sistema nervoso. Caratteristico l'arrangiamento a "rosette" delle  
 cellule attorno ad un lume o a una struttura vascolare (ematossilina-eosina, 200X)

Un adenoma della ghiandola della terza palpebra è stato osservato in un alano (femmina di 9 mesi). Macroscopicamente si è presentata come una formazione liscia, intensamente arrossata. All'esame istopatologico si è riscontrata la proliferazione di cellule ipercromiche poligonali ben differenziate, disposte in monostrato a formare strutture tubulari. Scarso il reperto di cellule in mitosi.

Altri tre adenomi delle ghiandole sebacee palpebrali sono state riscontrate in un meticcio (maschio di 11 anni), in un terranova (maschio di 9 anni) e in un drahthaar (maschio di 5 anni). Sotto il profilo istopatologico si è rilevata la presenza di una neoformazione multilobulata, spesso capsulata, con lobuli separati da sottili sepimenti di tessuto connettivo. Le cellule hanno manifestato una spiccata differenziazione in senso sebaceo, caratterizzata dalla presenza di un citoplasma chiaro, pallido e finemente vacuolizzato. Tali cellule si sono presentate disposte a formare acini ghiandolari regolari. La struttura adenomatosa è stata ben conservata.

La forma maligna (adenocarcinoma delle ghiandole sebacee palpebrali) è stata osservata in un meticcio, femmina, di 8 anni. Il reperto istopatologico ha evidenziato la proliferazione di cellule a differenziazione sebacea, di grandi dimensioni, con fenomeni di anisocariosi, anisocitosi, prominenza dei nucleoli e figure mitotiche numerose ed atipiche.

Il bulbo oculare di un cocker maschio di 13 anni è stato enucleato a causa di un glaucoma imponente. All'asportazione del globo si è evidenziata una massa retrorbitale ritenuta la possibile causa dell'insorgenza del glaucoma stesso. L'esame istopatologico ha confermato tale ipotesi ed ha permesso di formulare la diagnosi di fibrosarcoma. Si è, infatti, osservata la proliferazione di cellule di natura mesenchimale, arrangiate in fasci e vortici, caratterizzate da atipie nucleari ed elevato indice mitotico.

L'ultimo caso pervenuto alla nostra osservazione è un istiocitoma, sottorbitale in un dalmata, femmina, di 3,5 anni, il cui quadro istopatologico si è presentato caratterizzato da proliferazione di una popolazione cellulare monomorfa (rotondeggianti), molto regolare, con mitosi frequenti ma tipiche e con citoplasma abbondante, molto pallido; i nuclei hanno manifestato la cromatina finemente dispersa e nucleoli non evidenti.

### **Considerazioni conclusive**

Quello che emerge dalla consultazione delle tabelle sopra riportate, è abbastanza conforme alle nostre aspettative e cioè che, a parte qualche caso, le forme neoplastiche a carico dell'occhio (come del resto la maggior parte delle forme che colpiscono gli altri organi) sembrano interessare più frequentemente cani e gatti anziani rispetto ai giovani ed il sesso,

in entrambe le specie, pare non influire né sull'insorgenza della neoplasia e nemmeno sulla sua localizzazione.

La morfologia e l'assetto istopatologico delle neoplasie oculari analizzate in questo lavoro ricalcano quelle di altri studi recenti. Purtroppo la scarsa casistica riscontrata riguardo alle forme coinvolgenti prettamente il bulbo oculare (melanomi uveali ed adenomi-adenocarcinomi dell'epitelio ciliare), non ci ha permesso di valutare in modo più mirato la percentuale d'incidenza di queste patologie nei piccoli animali.

Considerando in particolar modo le neoplasie melanocitiche, in umana quelle coinvolgenti il tratto uveale anteriore dell'occhio sembrano essere relativamente poco comuni (5%), mentre nel cane e nel gatto detengono un ruolo di primaria importanza (Peiffer Jr R.L. et al.,1992). Anche le nostre osservazioni, soprattutto nel cane, confermano questa prevalenza.

Non bisogna dimenticare che nei piccoli animali, a differenza dell'uomo, esse sono per la maggior parte di natura benigna, ma la loro predilezione nel localizzarsi nel tratto uveale anteriore determina frequentemente l'insorgenza di patologie secondarie, come il glaucoma, che possono richiedere l'intervento di enucleazione.

Spesso per i veterinari la decisione di enucleare il globo oculare si fonda proprio sul rilievo di queste patologie secondarie, comuni sia a forme benigne che maligne, diventate ribelli a qualsiasi trattamento. Tuttavia, la scarsità di metastasi riscontrabili e soprattutto la non certezza di poterle evitare mediante l'enucleazione, rendono di difficile giustificazione l'applicazione di tale intervento terapeutico in occhi neoplastici non ancora interessati da complicazioni secondarie.

Alla luce di queste considerazioni, sarebbe pertanto auspicabile che il ruolo dell'anatomo patologo divenisse più significativo anche nello studio della patologia oftalmologica, in associazione ad una maggior collaborazione con il chirurgo, al fine di permettere da un lato una più tempestiva diagnosi e relativa prognosi, dall'altro la ricerca di quei fattori citogenetici che rivestono notevole interesse nella patologia tumorale d'organo.

**RIASSUNTO** - La proposta degli autori è la descrizione istopatologica delle principali forme neoplastiche coinvolgenti il globo oculare e le relative strutture annessiali del cane e del gatto, mediante la revisione più recente della bibliografia in proposito, supportata dai reperti d'Istituto giunti nell'ultimo lustro (1995-1999) alla loro osservazione. Sottolineano, altresì, il ruolo del patologo nello studio delle patologie oftalmologiche auspicando nel contempo che egli diventi una figura professionale, dotata di specifiche competenze scientifico-formative, al pari di quanto si verifica in medicina umana.

Parole chiave: occhio, neoplasia, cane, gatto.

Key words: eye, neoplasia, dog, cat.

*Ringraziamenti. Un particolare ringraziamento alla Dott.ssa Kramer H.L., per la disponibilità e la preziosa collaborazione offerte.*

**SUMMARY - Introduction:** Tumors of the globe are relatively rare in dogs and cats, compared to the other pathologies involving the eye. However primary neoplasms can interest the whole globe and tumors of melanocytic origin (especially in the uveal tract) are the most common in both dogs and cats. Epithelial tumors of the ciliary body are the second most common primary tumors of the globe. Medulloepithelioma, medulloblastoma and retinoblastoma are rarely encountered primary tumors in small animals. Recently, a post-traumatic sarcoma in cat eyes has been described (Dubielzig R.R., 1990). In recent years, the progressive increase of our knowledge of ocular pathology confirms that this branch has to be considered an important discipline in veterinary medicine. Further study and training are however still necessary to reach a level of competence that can be comparable to that in human medicine. Therefore, the pathological anatomy of the most common ocular and adnexal tumors must become an essential part of the veterinary curriculum.

The aim of this report is to describe the histopathology of the most common tumors, involving both canine and feline globe, with the help of our case record, from 1995 to 1999, supported by recent bibliography.

Primary neoplasms of canine and feline globe: the classification of small animal ocular tumors is considered important for the comparative pathological anatomy, because the same kind of tumors are also found in man. Kircher C.H. et others (1974) have classified all primary and secondary tumors of the globe. In small animals the most common primary neoplasms of the globe are, in order of frequency, the anterior uveal melanoma and the ciliary adenoma-adenocarcinoma. Other adnexal neoplasms reported are those involving eyelid glands (Meibomian gland) and the third eyelid; however rare cases of hemangioma, medulloepithelioma, medulloblastoma and retinoblastoma are also described.

**Primary melanomas:** melanocytic tumors are the most commonly described primary intraocular neoplasms of dogs and cats. They are classified based on their sites of origin:

1. EXTRAOCULAR MELANOMAS: epibulbar and conjunctival melanomas;

## 2. INTRAOCULAR MELANOMAS: anterior uveal melanomas and choroidal melanomas.

Primary canine ocular melanomas are categorized as benign or malignant depending on the morphology of the neoplastic cells. Both benign and malignant uveal melanomas often involve the anterior uveal tract (iris and ciliary body) and, when examined histologically, they are usually poorly delineated so local infiltration and eye destruction are common features of both forms (Dubielzig R.R., 1990).

No examples of metastatic disease or local recurrence following enucleation have been reported from cases of benign ocular melanoma. Even among malignant ocular melanomas, only small numbers of cases have been found and the metastatic disease is minimal and not a threat to the animal's health (Dubielzig R.R., 1990).

Histologically, ocular melanomas are classified using the Callender's human scheme, based on cell type:

1. spindle-cells type-A (picture 1): these cells are long and slender, being flattened with ovoid nuclei and without nucleoli; generally have low mitotic index and contain a variable amount of melanin.
2. spindle-cells type-B: these cells are plump and have large ovoid nuclei with prominent nucleoli; they also have a low mitotic index and are variably melanized.
3. epithelioid cells (picture 2): these cells are large and polyhedral and have moderate to abundant cytoplasm, sometimes with indistinct borders. The nuclei are large and round or irregular with prominent nucleoli; the mitotic index is high and melanization is generally poor.
4. mixed cells: this type contains both spindle and epithelioid cells and it is the most common type in small animals.

**Anterior uveal melanomas:** these are the most common primary intraocular neoplasms of small animals. Macroscopically they vary from iris nodules to total involvement of iris and ciliary body with neoplastic tissue which may extend into peripheral choroid, sclera, cornea and drainage angle. Occasionally the neoplasm may fill the globe and extend posteriorly to the optic disk or protrude from the anterior segment of the globe. These tumors are usually heavily pigmented, although a few cases of tan to white masses have been described. Except for necrotic areas they are firm. Cytologically, spindle A, spindle B, epithelioid and mixed forms are seen; the grade of melanization varies from none to heavy. Spindle cells may be in whorled or interwoven patterns, but sheets of cells are most common. Neoplastic cells may be found growing along scleral vessels, occasionally reaching extraocular orbital sites. Mitosis are variable, but necrosis is frequent.

The incidence of neoplasia is higher in older patients (8-10 years). German shepherd dogs and Persian cats seem to be at higher risk

*Diffuse iris melanoma* is the most common primary ocular neoplasm in cats and begins on the anterior iris surface. As the disease progresses, the neoplastic melanocytes cause thickening and distortion of the iris and perhaps obstruction of the drainage angle. Cytologically the neoplastic melanocytes tend to be large rounded cells with abundant cytoplasm and a centrally positioned round nucleus. A smaller percentage of tumors have localized areas of pigmented spindle cells, and a few tumors are predominantly made up of spindle cells.

**Choroidal melanomas:** in small animals only a few number of primary choroidal melanomas have been reported and these tumors are considered benign. Macroscopically they consist of a dome-shaped thickening of the choroid and they tend to taper at the edges. Cytologically the proliferating melanocytes have a distribution reminiscent of the normal choroidal melanocytes. Usually there is retinal detachment over the tumor and consequently vision lost; lipofuscin is frequently seen in the retinal pigment epithelial cells. Beagle dogs seem to be at higher risk.

**Primary ciliary epithelium neoplasms:** these are the second most frequent primary intraocular neoplasms reported in small animals, after the anterior uveal melanoma. They originate from pigmented or non-pigmented mature, differentiated iridociliary epithelium. Histologically neoplastic cells are pleomorphic and may be spindle-shaped, polyhedral or columnar and also may form papillary or tubular structures; usually the stroma is delicate and may contain normal or heavily pigmented melanocytes. For this reason the degree of pigmentation is variable and some are non-pigmented. Histological differential diagnosis is determined by the increased number of mitotic figures, the more pronounced cytological variation and the definite invasiveness of the malignant form (adenocarcinoma) which is locally destructive and have little tendency to metastasize (Bernis W.O. et al., 1984).

A rare malignant neoplasia is the *Medulloblastoma*; it is a neoplastic form arising from primitive neuroectodermal epithelium and it is uncommon both in small animals and in man. It usually has a congenital nature but it may appear clinically from several months to some years. Contrary to Retinoblastoma, Medulloblastoma is often unilateral and macroscopically characterized by a soft, white-grey mass that tends to spread over the ocular cavity. Microscopically this tumor is characterized by the proliferation of round, poorly delineated cells with dark nucleus and poor cytoplasm that form characteristic rosettes around a lumen or a vascular structure. Mitosis are frequent. These atypical elements are reminiscent of the nervous system blasto-cells.

**Secondary ocular neoplasms:** the eye is an unusual site for metastasis of tumors originating elsewhere, but the possibility of ocular disease caused by hematogenous spread to the eye should be considered. Most of them are considered rare, but lymphosarcoma and metastasis from mammary carcinoma have been reported most often in dogs and cats. Secondary intraocular neoplasms generally have reserved or fatal prognosis because they are often associated with tumoral cells spreading (Peiffer Jr. R.L. et al., 1992).

**Case record:** the incidence of ocular neoplasms, based on a five-year retrospective case study (1990-1995) of the Veterinary Pathological Anatomy Institute in Parma, is rather low and unfortunately it cannot be compared to literature case records because there are only monographic studies concerning individual ocular neoplasms.

During five years (1995-1999), 15 cats and 24 dogs of various ages and breeds were examined.

**Feline species:** all cats examined were European domestic.

Five cats had squamocellular carcinoma; two cats, (both males, 9 and 10 years) had sub-orbital squamocellular carcinoma; three cats (two females, 9 and 12 years, and one male 10 years) had eyelid squamocellular carcinoma. Gross findings of two sub-orbital squamocellular carcinoma were characterized by ulcerated, papillomatous masses in the superior orbit, while microscopic findings demonstrated the presence of disordered epidermal cell proliferation, typically arranged in cords and nests and in keratinization centres ("*keratin pearls*"). The tumor cells were polygonal, had an eosinophilic cytoplasm and large nuclei. The nucleoli were prominent.

The right eye of a 13 year old male cat (FIV positive) was enucleated because of an anterior uveal amelanotic melanoma. The iris and ciliary body were replaced by tumor, which had also extended along scleral channels into the adjacent episclera. The neoplastic cells were spindle shaped, had indistinct borders, and tended to form clusters and rows. The nuclei were vesicular and pleomorphic, and contained prominent nucleoli. Mitotic figures were frequent (picture 3-4).

Only one male (11 years) had a choroidal melanoma. Gross anatomy was characterized by a dome-shaped mass placed in the posterior of the eye; this mass is populated by poorly differentiated melanocytic cells, often with voluminous melanin granules, that infiltrated and altered ocular morphology. Histologically these cells were mostly spindle and rare epithelioid cells. Mitosis were frequent (picture 5).

Sweat gland adenocarcinoma was diagnosed in the inferior eyelid of two males, 13 and 14 years old; the biopsy exhibited the proliferation of atypical epithelial cells arranged in cystic or solid structures. Mitotic figures were more numerous.

An eyelid fibroma was diagnosed in one male about 12 years old; gross anatomy demonstrated the presence of a mass with a normally structured epidermis and fibromatous dermal coating.

A third eyelid gland adenocarcinoma was observed in one female (10 years old). Microscopic findings were characterized by epithelial cell proliferation and sometimes by squamous metaplasia. These cells were characterized by anisokaryosis and anisocytosis and formed cords and nests that infiltrated the corion. There was also lymphocytic and polymorphonuclear cell infiltration.

Two retrobulbar masses were diagnosed in one female, (13 years old) and in one male (10 years old). Biopsy allowed histological diagnosis of lymphosarcoma, due to the presence of lymphocytic neoplastic cells.

Mastocytoma was diagnosed in the superior eyelid of one female, about 10 years old, and in the superior orbit of one male, about 11 years old. Histopathologic features were similar to those of the correspondent cutaneous form.

**Canine species:** canine case record showed 24 different cases of ocular neoplasia: two squamocellular carcinomas, three malignant melanomas, one amelanotic melanoma, four Meibomian gland adenomas, five sebaceous epitheliomas, one medulloblastoma, one composite melanocytoma, four eyelid gland adenomas, one eyelid gland adenocarcinoma, one retrobulbar fibrosarcoma and one histiocytoma.

Squamocellular carcinoma was diagnosed in the orbit of one G.S.D. (male, about 6 years old), and in eyelid-conjunctival junction of one Drahthaar (male, about 5 years old). Histopathologic features were similar to those of the correspondent cutaneous form.

Three melanomas were observed in the eyelid of one Setter (female, about 13 years old), in the choroid of one mixed breed (male, about 10 years old) and in ciliary body of one G.S.D. (male, about 12 years old).

Ciliary body melanoma was associated with panophthalmitis and retinal detachment. The tumor arose from melanocytes of ciliary body, and was composed of variable portions of lightly pigmented spindle cells and heavily pigmented plump melanocytes. These spindle cells were the proliferative population (picture 6).

An eyelid amelanotic melanoma was diagnosed in one Shi-tzu (male, about 7 years old). Dermal histopathologic features demonstrated the presence of a voluminous mass characterized by mesodermic elements with oval nuclei and cytoplasmatic melanin granules.

Meibomian gland adenoma was observed in one Bracco tedesco (male, about 8 years old), in one Old English Sheepdog (female, about 9 years old), in one Dalmatian (male, about 8 years old) and in one mixed breed (female, about 13 years old). Microscopically, they were comparable in most respects to sebaceous adenomas found elsewhere in the skin, however they had histologic features that were infrequently seen in their cutaneous counterparts. These neoplasia were characterized by hyperplasia of the spinous cell layer, and by proliferation of cells with sebaceous differentiation. These cells tended to form adenomatous structures. There were also lymphomononuclear infiltration (picture 7).

Eyelid sebaceous epitheliomas were diagnosed in five dogs: one Samoyed (female, about 14 years old), one Breton (male, about 7 years old), one G.S.D. (female, about 10 years old), and two mixed breed (males, about 6 and 7 years old). Histopathologic features described the presence of ulcerated areas and the proliferation of epithelial basal cells with sebaceous differentiation. Lymphocytes were common as were polymorphonuclear cells.

The presence of pigmented cells was observed in one case (Breton ). In another case, a lymphangioma was also observed (male, mixed breed about 6 years old).

A medulloblastoma involving the anterior chamber was diagnosed in one male mixed breed, about 6 years old. Gross anatomy was characterized by a soft white-grey mass that infiltrate the anterior chamber. Histologic features demonstrated the proliferation of round, poorly delineated cells with dark nucleus and poor cytoplasm. Some areas resembled retinoblastoma with the formation of ill-defined rosettes. Mitosis were frequent (picture 8).

A third eyelid gland adenoma was observed in a Great Dane (female, about 9 months old). Grossly, the mass appeared smooth and strongly pigmented red. Microscopically, the neoplasm was composed of polygonal and hyperchromic cells arranged in solid, tubular formations. Mitosis were rare.

Eyelid sebaceous gland adenomas were observed in three males: one mixed breed, about 11 years old, one Newfoundland about 9 years old and one Drahtar, about 5 years old. Grossly, the tumor was subdivided into lobules by fine connective tissue trabeculae. At the periphery the compressed dermal collagen formed a pseudocapsule. The distinctive microscopic findings was sebaceous differentiation and cells had a pale, clear, foamy cytoplasm. The eye of a Cocker (male, about 13 years) was enucleated because of a severe glaucoma, probably caused by a retrobulbar mass. Histologic features of the mass demonstrated the proliferation of fusiform cells with an "herringbone" pattern, and nuclear atypia. Mitosis were frequent. The diagnosis was fibrosarcoma. An orbital histiocytoma was diagnosed in one Dalmatian (female, about 3,5 years old); histopathologic features were similar to those of the correspondent cutaneous form.

**Conclusions:** the summarized results reveal that ocular tumors in small animals, frequently involve older patients and that sex and localization do not seem to influence the neoplasm onset.

Morphology and behavior of the ocular tumors reported here are similar to those of other recent reports. Unfortunately, studies on intraocular neoplasms (especially uveal melanomas and ciliar epithelium adenoma-adenocarcinomas) are scanty and did not allow us to show the incidence of these pathologies in small animals. For veterinarians, the decision to enucleate is often based upon the need to relieve intractable uveitis, hyphema or glaucoma accompanying both benign and malignant melanocytic tumors. Conversely, the rarity of metastasis and uncertain efficacy of enucleation in preventing metastasis makes enucleation of normotensive, non-inflamed globes containing melanoma very difficult to justify. However, following enucleation in any case of ocular disease, it would be auspicious if the pathologist began to play a more important role in the diagnosis and prognosis of these neoplasms. Furthermore, the opportunity to better define and understand the cytogenesis and risk factors involved in the onset of such disease would be extremely valuable.

## Bibliografia

1. Baldi F., Cali A. (1988): *Patologia neoplastica dell'apparato oculare*, in Cali A., Fiore Donati L., Anatomia Patologica generale e applicata. USES, Firenze, Vol. 2, 1401-1415.
2. Barron D.N., Saunders L.Z., Jubb K.V.F. (1963): *Intraocular tumors in animals. III. Secondary intraocular tumors*. Am.J.Vet.Res., 24, 835-853.
3. Bellhorn R.W., Henkind P. (1970): *Intraocular Malignant Melanoma in Domestic Cats*. J. Small Anim. Pract., Vol.10, Pergamon Press Ltd., Great Britain, 631-637.
4. Bernis W.O., Oliveira H.P., Almeida A.E.R.F. de, De Almeida A.E.R.F. (1984): *Intraocular neoplasia in the dog. A review of the literature*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 36,1, 21-27.
5. Blodi F.C., Ramsey F.K. (1967): *Ocular tumors in domestic animals*. Am. J. Ophthalmol., 64, 627-633.
6. Buyukmihci N.C. (1987): *Tumors of the eye*, in Theilen G.H., Madewell B.R., Veterinary Cancer Medicine, 2 Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 635-643.
7. Cammarata G. (1997): *Organi di senso*, in Diagnostica Istologica dei Tumori degli Animali. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, 301-317.
8. Carlton W.W., Render J.A. (1988): *Eye and ear*, in Thomson R.G., Special Veterinary Pathology, B.C. Decker Inc., Toronto, 596-601.
9. Collins B.K., Collier L.L., Miller M.A., Linton L.L. (1993): *Biologic behaviour and histologic characteristics of canine conjunctival melanoma*. Progress in Vet. and Comp. Ophthalmol., 3, 4, 135-140.
10. Cook C.s., Rosenkrantz W., Peiffer Jr R.L., et al. (1985): *Malignant melanoma of the conjunctiva in cat*. J.A.V.M.A., 186, 505-506.
11. Cordy D.R. (1990): *Tumors of the Nervous System and Eye*, in Moulton J.E., Tumors in Domestic Animals, 3 Ed., University of California Press, Berkeley, 654-665.
12. Croxatto J.O., Herrera H.D., Lightower C.H. (1992): *Malignant melanoma arising from primary acquired melanosis in a dog*. Can. Pract., 17, 22-24.
13. Dahme E., Weiss E. (1983): *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. 3 Aufl., F.Enke Verl., Stuttgart, 386.
14. Deykin A.R., Smith J.S. (1997): *Orbital neoplasia in a dog*. Australian Vet. J., 75, 9, 638-640.
15. Diters R.W., Dubielzig R.R., Aguirre G.D., et al. (1983): *Primary ocular melanoma in dogs*. Vet. Pathol., 20, 379-395.
16. Donoso L.A., Shields C.L., Lee E.Y. (1989): *Immunohistochemistry of retinoblastoma. A review*. Ophthalmic. Pediatr. Genet., 10, 1, 3-32.
17. Dubielzig R.R., Aguirre G.D., Gross S.L., et al. (1985): *Choroidal melanomas in dogs*. Vet. Pathol., 22, 582- 585.
18. Dubielzig R.R. (1990): *Ocular neoplasia in small animals*. Vet.Clin.North Am. Small Anim.Pract., 20, 3, 837-848.
19. Fabris G., Marzola A., Ravalli L. (1981): *Anatomia patologica dei tumori del bulbo oculare e dell'orbita*, in Clinica dei tumori dell'occhio e dell'orbita. Relazione LXI Congr. Soc. Oftalmol. Ital., Roma.
20. Goldschmidt M.H., Shofer F.S. (1992): *Skin tumors of the dog and cat*. Pergamon Press, Oxford, 50-64.
21. Gwin R.M., Gelatt K.N., Williams L.W. (1982): *Ophthalmic neoplasms in the dog*. J.A.A.H.A., 18, 853-866.
22. Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (1996): *Pathology of domestic animals*. 4 Ed., Accademic Press. Inc., Orlando, Vol. 1, 512-522.
23. Kircher C.H., Garner F.M., Robinson F.R. (1974): *Tumours of the eye and adnexa*. Bull.Wld. Hlth. Org., 50,135-142.
24. Krehbiel J.D.; Langham R.F. (1975): *Eyelid neoplasms of dogs*. Am.J.Vet.Res., 36, 115-119.
25. Latimer K.S., Kaswan R.L., Sundberg J.P. (1987): *Corneal squamous cell carcinoma in a dog*. J.A.V.M.A., 190,11, 1430-1432.
26. Mertel L., De Gresti A., Cammarata G. (1994): *Aspetti clinici, reperti ecografici ed anatomo-patologici di alcuni tumori del globo oculare del cane*. Veterinaria, anno 8, n°2, 69-77.
27. Peiffer Jr R.L. (1981): *The differential diagnosis of pigmented ocular lesion in the dog and the cat*. California Veterinarian, 5, 14-18.
28. Peiffer Jr R.L. (1983): *Ciliary body epithelial tumors in the dog and cat; a report of 13 cases*. J.Small Anim.Pract., 24, 347-370.
29. Peiffer Jr R.L., Peruccio C., Lotti D., Ratto A., Rossi L. (1991): *Le neoplasie oculari dei piccoli animali (prima parte). Orbita, annessi, cornea e sclera*. Veterinaria, anno 5, n°4, 5-13.
30. Peiffer Jr R.L., Peruccio C., Lotti D., Ratto A., Rossi L. (1992): *Le neoplasie oculari dei piccoli animali (seconda parte). Tratto uveale, sarcomi oculari primitivi nel gatto e neoplasie secondarie*. Veterinaria,

anno 6, n°1, 52-60.

- 31. Peruccio C., Monti F., Solarino A. (1985): *Atlante di Oftalmologia Veterinaria*. Ed. Medico Scientifiche, Torino, 239-257.
- 32. Saunders L.Z., Barron C.N. (1958): *Primary pigmented intraocular tumors in animals*. *Cancer Res.*, 18, 234-245.
- 33. Saunders L.Z., Barron C.N. (1964): *Intraocular tumors in animals. IV. Lymphosarcoma*. *Br. Vet.J.*, 126, 25-35.
- 34. Strafuss A.C., Cook J.E., Smith J.E. (1976): *Squamous cell carcinoma in dogs*. *J.A.V.M.A.*, 168, 425-427.
- 35. Wilcock B.P., Peiffer Jr R.L. (1986): *Morphology and behavior of primary ocular melanomas in 91 dogs*. *Vet.Pathol.*, 23, 418-424.

# STUDIO ANATOMOISTOPATOLOGICO DEL CARCINOMA GASTRICO DEL CANE

## HISTOPATHOLOGICAL STUDY OF GASTRIC CARCINOMA IN THE DOG

A. Luppi, F. Miduri, A.M. Cantoni

*Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria.*

### Introduzione

Le neoplasie gastriche nel cane sono state considerate, fino a pochi anni fa, patologie piuttosto rare (Lindt 1970, Wingfield 1980, Twedt e Wingfield 1983, Jubb et al. 1984, Moulton 1985, Smith et al. 1985, Wingfield e Twedt 1986, Theilen e Madewell 1987). Negli ultimi anni questi tumori hanno assunto un'importanza notevole sia per il crescente interesse nei loro confronti da parte di numerosi ricercatori, sia per gli aspetti comparati con le stesse patologie nell'uomo. In modo particolare la valutazione degli aspetti clinici, diagnostici e prognostici del carcinoma gastrico nel cane assumono nell'ambito della patologia comparata crescente valore se si considera che questa neoplasia nell'uomo costituisce una delle principali cause di morte in Italia e che la tardività della diagnosi, in ogni caso, gioca un ruolo determinante in entrambe le specie.

Una migliore conoscenza di queste neoplasie, oltre a favorire la precocità della diagnosi ed un'eventuale terapia, potrebbe chiarire gli aspetti relativi al rapporto che intercorre fra le caratteristiche istologiche del singolo caso e l'andamento evolutivo del processo neoplastico.

La valutazione dell'incidenza del carcinoma gastrico del cane è stata ottenuta in passato facendo riferimento soprattutto al numero totale di necrosco pie eseguite, in diversi periodi in Istituti di ricerca. Oggi, con il miglioramento delle tecniche diagnostiche, i riscontri necroscopici stanno lasciando sempre più il posto a quelli endoscopici e chirurgici eseguiti *intra vitam*.

Cotchin nel 1959 (come riportato da Sullivan et al. nel 1987) segnalò 4 carcinomi gastrici repertati nel corso di 4.187 neoplasie; Lingeman et al. nel 1971, pubblicarono uno studio riguardante 18 casi osservati su 10.179 necrosco pie; nel 1972 Murray et al. e nel 1975 Sautter e Hanlon riportarono rispettivamente 11 e 14 casi. Nel 1973 Hayden e Nielsen osservarono 7 casi su un totale di 15.215 necrosco pie eseguite. Nel 1978 Patnaik et al. riportarono 26 casi su 10.270 necrosco pie, nel 1985 Krauser riportò 31 casi su 8431 necrosco pie e nel 1987 Sullivan et al. descrissero 24 casi su 13.015 necrosco pie.

Nel 1989 Fonda et al. hanno pubblicato uno studio condotto su 11 casi di carcinoma gastrico venuti alla loro attenzione nel triennio 1984-1987. Nel 1999 Gualtieri et al. hanno pubblicato uno studio eseguito su 42 casi di carcinoma gastrico osservati dal 1986 al 1999, presso l'Istituto di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano.

Per quanto riguarda la casistica rilevata nel nostro Istituto nel triennio 1997-1999, su un totale di 643 neoplasie (di cui 403 epiteliali, 142 del sistema emolinfopoietico e 98 mesenchimali), sono stati diagnosticati 6 tumori epiteliali maligni gastrici che costituiscono una percentuale dello 0,93%.

### Epidemiologia

I carcinomi gastrici costituiscono circa l'1% di tutte le neoplasie maligne osservabili nel cane e sembrano non riconoscere predisposizione di razza, anche se una maggiore incidenza è stata osservata nel Pastore Scozzese, nello Stafford Shire Terrier (Sullivan et al. 1987) e nel Pastore Belga (Fonda et al. 1989; Scanziani et al. 1991).

I soggetti di età variabile tra i 9 e 10 anni risultano maggiormente colpiti, mentre una maggiore incidenza è stata osservata nei maschi rispetto alle femmine, come riportato da Murray et al. nel 1972 (rapporto 7/4), da Hayden e Nielsen nel 1973 (rapporto 6/1), da Sautter e Hanlon nel 1975 (rapporto 8/6), da Patnaik et al. nel 1978 (rapporto 17/7), da Krauser nel 1985 (rapporto 16/8), da Sullivan et al. nel 1987 (rapporto 19/12), da Fonda et al. nel 1989 (rapporto 9/2) e da Gualtieri et al. nel 1999 (rapporto 1,5/1). (Vedi tabella 1)

Tabella 1: casistica relativa al carcinoma gastrico nel cane dal 1971 al 1999.

N. Casi	Periodo	N° di necroscopie	% incidenza	Maschio/Femmina	Media età (anni)	Bibliografia
18	N.D.	10.179	0.18	N.D.	N.D.	14
11	N.D.	N.D.	N.D.	7/4	10.2	16
7	1955-1970	15.215	0.05	6/1	9.1	7
14	1951-1974	N.D.	N.D.	8/6	9.7	23
26	1962-1975	10.270	0.25	17/7	10	19
24	1970-1983	8.431	0.28	16/8	10-12	11
31	1979-1983	13.015	0.24	19/12	10.2	26
11	1984-1987	N.D.	N.D.	9/2	9	5
46	1985-1998	N.D.	N.D.	1.5/1	9.5	6

## Fattori eziopatogenetici

Numerosi sono i fattori che incidono nella genesi del carcinoma gastrico del cane e la comparazione degli aspetti eziopatogenetici con la specie umana spesso si presenta difficoltosa e poco attendibile. Si ritiene che i fattori ambientali giochino un ruolo molto importante come dimostrato per quelli dietetici (presenza di conservanti della carne come nitriti, da cui originano metaboliti cancerogeni quali nitrosamine e nitrosamidi; alimenti poveri in antiossidanti ecc.) (Theilen et al. 1987; Gualtieri et al. 1999). Per alcuni inquinanti ambientali come gli insetticidi e le micotossine (le aflatossine ad es.), nei confronti dei quali il cane può essere considerato come una specie animale c.d. "sentinella" (Misdorp W. 1996), è stata dimostrata l'attività carcinogena a livello gastrico (Theilen et al. 1987; Gualtieri et al. 1999).

La frequenza piuttosto modesta di queste neoplasie nel cane, anche in paesi come il Giappone dove l'incidenza nell'uomo è piuttosto elevata, suggerisce l'ipotesi che gli animali possano avere maggior resistenza di specie verso le molecole cancerogene per l'uomo o anche minor possibilità di assorbimento nell'arco della loro esistenza, avendo una vita più breve (Moulton 1985).

I fattori legati all'ospite sono sicuramente il secondo punto più importante da considerare. Analogamente a quanto evidenziato nell'uomo, i cani affetti da gastrite cronica atrofica presenterebbero un rischio superiore alla norma di sviluppare il carcinoma gastrico ed in studi sperimentali condotti sul cane si è evidenziata una forte attività proliferativa cellulare in corrispondenza della mucosa gastrica atrofica (Casteleyn et al. 1975). La frequente associazione nel cane di casi di carcinoma gastrico con fenomeni di gastrite e di linfangectasia intestinale ha suggerito che queste lesioni possano essere legate ad un unico processo patogenetico (Kolbjornsen et al. 1994). Cani sottoposti a gastrectomia parziale presentano un rischio leggermente più elevato a sviluppare un carcinoma gastrico nel moncone residuo, attribuito a complicazioni secondarie alla gastrectomia come l'ipocloridria, da eccessivo reflusso biliare duodeno-gastrico e la gastrite cronica (Miwa et al. 1995).

L'infezione da *Helicobacter pylori* sembra fungere da cofattore nella cancerogenesi gastrica in diverse specie animali compreso l'uomo (Lecoindre 1997; Gualtieri 1999; Rossi 1999), nel quale è stato dimostrato un ruolo eziologico importante del batterio nell'insorgenza sia del carcinoma gastrico di tipo diffuso che di tipo intestinale (Rugge et al. 1999). Se il trattamento dell'infezione da *H. pylori* sia in grado di determinare una riduzione dell'incidenza del carcinoma gastrico deve essere ancora dimostrato (Cotran, Kumar e Robbins 1997).

Il ruolo svolto da fattori genetici e di razza, importante in alcune neoplasie del cane, non è ancora stato chiarito per quel che riguarda lo sviluppo dei tumori gastrici (Scanziani et al. 1991; Misdorp 1996).

## Morfologia

Le sedi più frequenti di insorgenza dei carcinomi gastrici del cane sono state ampiamente descritte da diversi autori. Hayden e Nielsen nel 1973 pubblicarono le osservazioni condotte su 7 casi di carcinoma gastrico con localizzazione a livello di corpo (1 caso), di antro pilorico (4 casi), di antro pilorico con estensione al corpo (2 casi) e un caso dove la neoplasia invadeva in modo diffuso lo stomaco. Sautter e Harlon nel 1975, descrissero 14 casi di carcinoma gastrico di cui 7 localizzati a livello dell'antro pilorico con estensione al corpo dello stomaco, 4 al piloro e 3 al corpo. Patnaik et al., in uno studio pubblicato nel 1978, elencò le sedi di localizzazione di 20 adenocarcinomi dello stomaco, descrivendone 10 a livello del piloro, 4 a livello del fondo, 3 a livello di grande curvatura, 2 in corrispondenza del cardias ed 1 di tipo diffuso. In base alle osservazioni riportate da Sullivan et al. nel 1987, su un totale di 29 casi, le sedi maggiormente colpite dal carcinoma gastrico risultarono la piccola curvatura (14 casi), il piloro (11 casi), l'antro pilorico con estensione alla piccola curvatura (1 caso), la piccola curvatura con il coinvolgimento del cardias (2 casi), mentre l'autore riportò un unico caso di carcinoma di tipo diffuso. Nel 1989 Fonda et al. descrissero 11 casi di carcinoma gastrico con localizzazione a livello di piloro (3 casi), di piccola curvatura (2 casi), di piccola curvatura con estensione al fondo ed al cardias (2 casi), di piccola curvatura e fondo (1 caso), di piccola curvatura e corpo (1 caso), di piccola curvatura, corpo e fondo (1 caso) e di piccola curvatura, corpo e piloro (1 caso). Gualtieri et al. nel 1999 hanno pubblicato uno studio condotto su 42 casi di carcinoma gastrico, di cui 15 localizzati a livello di piccola curvatura, 4 a livello di antro e 4 a livello del piloro, 3 in corrispondenza del fondo e 2 della grande curvatura. In 14 casi il tumore primario si trovava localizzato in diverse sedi a livello gastrico (vedi tabella n° 2).

Tabella 2: Sedi di localizzazione del carcinoma gastrico nel cane.

Autore	Cardias	Corpo	Piccola Curvatura	Grande Curvatura	Fondo	Piloro	Diffuso
7		1 (2)				4 (2)	
22		3 (7)				4 (7)	
17	2			3	4	10	1
26			14 (1)			11 (1)	1
5		(1)*	2 (1) (1)*		(1)	3	
6			15	2	3	8	

N.B.: I numeri tra parentesi indicano lesioni localizzate contemporaneamente in due sedi. In 4 casi (Fonda et al. 1989) ed in 14 casi (Gualtieri et al. 1999) le lesioni neoplastiche erano localizzate in più sedi a livello gastrico e pertanto sono state riportate per esteso nel testo.

In ordine a quanto sopra espresso possiamo affermare che la sede più frequente di localizzazione anatomica del carcinoma gastrico del cane è costituita dall'antro pilorico, con estensione al corpo dello stomaco, normalmente a livello di piccola curvatura. La localizzazione primaria a livello di corpo dello stomaco

risulta più frequente in corrispondenza della piccola piuttosto che di grande curvatura. Un numero inferiore di segnalazioni riguardano invece la localizzazione primaria della neoplasia a livello di fondo e di cardias (Moulton 1985; Fonda et al. 1989; Gualtieri et al. 1999).

## Classificazione

I carcinomi gastrici sono stati classificati in base a diversi criteri che possono essere così sintetizzati: 1) Invasività; 2) Sviluppo; 3) Tipo istologico.

L'invasività, caratterizzata dalla capacità delle cellule neoplastiche di propagarsi in territori impropri, è il fattore che determina il maggiore impatto sul decorso clinico. La neoplasia infatti può essere confinata alla mucosa ed alla sottomucosa (carcinoma gastrico precoce o "early gastric cancer" contemplato in medicina umana) oppure estendersi oltre la sottomucosa nella parete muscolare (carcinoma gastrico avanzato). In base al tipo di crescita, il carcinoma gastrico nell'uomo, sia nella forma precoce sia in quella avanzata, può essere definito di tipo esofitico o polipoido (con protrusione della massa neoplastica all'interno del lume), piatto o depresso (nel quale non si osserva una massa neoplastica chiaramente visibile) ed escavato (quando è presente un'ulcerazione superficiale o profondamente erosa) (Cotran, Kumar e Robbins 1997). Nel cane lo sviluppo neoplastico maggiormente descritto è rappresentato da una lesione a placca, ispessita, di colore grigio-biancastro, di consistenza aumentata rispetto alla mucosa circostante ed ulcerata in posizione centrale (Fonda et al. 1989 e Gualtieri et al. 1999). Quadri macroscopici meno frequenti ma normalmente descritti nel carcinoma gastrico del cane, sono caratterizzati dalla lesione a placca ispessita, ma non ulcerata e quadri di crescita infiltrativa od esofitica della massa neoplastica (Fonda et al. 1989, Gualtieri et al. 1999, Head et al. 1976). (vedi tabella n. 3)

Tabella 3: Classificazione del carcinoma gastrico nell'uomo in base all'invasività ed ai quadri di sviluppo.

PROFONDITA' dell'INVASIONE	DEFINIZIONE	QUADRI MACROSCOPICI
Mucosa/sottomucosa	Carcinoma gastrico precoce	Esofitico Piatto
Sottomucosa/muscolare	Carcinoma gastrico tardivo	Depresso Escavato

I tipi istologici delle neoplasie epiteliali maligne dello stomaco del cane sono stati classificati in vario modo. La classificazione WHO (Head K.W. 1976) include l'adenocarcinoma (tubulare, papillare, mucinoso ed a "cellule con castone") ed il carcinoma indifferenziato (vedi tabella n.4), mentre la classificazione di Lauren, utilizzata nell'uomo, che inquadra il carcinoma gastrico nel tipo intestinale ed in quello diffuso, può essere adattata facilmente anche al cane, come hanno dimostrato alcuni ricercatori (Krauser et al. 1985, Fonda et al. 1989, Gualtieri et al. 1999).

Tabella n. 4: Classificazione istologica dei tumori epiteliali maligni gastrici del cane secondo Head (1976).

TIPO	INCIDENZA NEL CANE	AUTORE
Adenocarcinoma tubulare	3 - 7	5, 11
Adenocarcinoma papillare	-	5
Adenocarcinoma mucinoso	2 - 1	5, 11
Carcinoma «a cellule con castone»	4 - 1	5, 11
Carcinoma indifferenziato	2 - 12	5, 11

In base alla classificazione WHO (Head K.W. 1976) nell'adenocarcinoma di tipo papillare si evidenzia la proliferazione di elementi epiteliali neoplastici arrangiati a costituire strutture papillari, mentre nel tipo tubulare gli elementi epiteliali neoplastici proliferanti sono disposti a costituire strutture tubulari immerse in uno stroma fibroso. L'epitelio dei tubuli può essere cilindrico, cubico o piatto.

Nell'adenocarcinoma di tipo mucinoso l'eccessiva produzione di mucina può esitare nella distensione delle strutture ghiandolari ed addirittura portare alla formazione di laghi di mucina, dove è possibile repertare clusters di cellule epiteliali mentre il tipo "a cellule ad anello con castone" è caratterizzato dalla presenza di cellule rotondeggianti per lo più isolate e ripiene di mucina (Head K.W. 1976).

Talvolta ci si può trovare di fronte a quadri difficilmente classificabili nei quattro gruppi sopra menzionati e pertanto si ricorre a definizioni, in realtà poco utilizzate in diagnostica medico-veterinaria. Alcuni esempi sono costituiti dal c.d. carcinoma in situ, nel quale si descrivono cellule epiteliali con un alto grado di atipia, che non hanno ancora interessato la *muscularis mucosae* dello stomaco o dal carcinoma scirroso dove il tumore, infiltrante, mostra un'eccessiva produzione di tessuto fibroso ben differenziato, che talvolta può anche mascherare la presenza di foci di cellule epiteliali neoplastiche.

Il carcinoma indifferenziato è costituito da piccoli "clusters" di cellule sdifferenziate, pleomorfe, con scarso citoplasma, non arrangiate in strutture papillari o tubulari e con scarsa tendenza a produrre mucina.

La classificazione di Lauren, utilizzata nell'uomo e adattata anche al cane, inquadra il carcinoma gastrico nel tipo intestinale ed in quello diffuso (Head 1976, Krauser et al. 1985, Fonda et al. 1989, Gualtieri et al. 1999).

Il tipo intestinale (papillare, acinoso e solido) è così denominato per la presenza di strutture simil-tubulari neoformate costituite da cellule che ricordano l'epitelio cilindrico intestinale. La neoplasia presenta margini ben definiti e la mucosa gastrica, adiacente al tessuto neoplastico, può mostrare spesso quadri di metaplasia intestinale (Patnaik et al. 1978).

Il carcinoma di tipo diffuso (indifferenziato e ghiandolare), maggiormente osservato nel cane rispetto a quello di tipo intestinale, è caratterizzato dalla presenza di cellule anaplastiche, di aspetto rotondo, molte delle quali ad "anello con castone" che hanno la tendenza ad infiltrare diffusamente la parete gastrica. A causa della sua crescita infiltrante la neoplasia mostra margini non ben definiti, mentre è facile osservare la presenza di mucina sia intra sia extracellulare (Patnaik et al. 1978). Alcuni autori, oltre al tipo intestinale ed a quello diffuso, contemplano un ulteriore tipo di carcinoma gastrico, denominato intermedio (Head 1976, Krauser 1985, Fonda et al. 1989).

Nel tipo intermedio sono inquadrati i carcinomi gastrici con aspetti comuni al tipo intestinale ed a quello diffuso oppure casi in cui il grado di sdifferenziazione cellulare non permette di classificare con precisione la neoplasia (Head 1976). (vedi tabella n. 5).

Tabella 5: Classificazione istologica del carcinoma gastrico dell'uomo elaborata da Lauren nel 1965 e adattata al cane da Head nel 1976, da Patnaik nel 1978, da Krauser nel 1985 e da Fonda nel 1989.

TIPO	INCIDENZA NEL CANE OSSERVATA DA PATNAIK 1978 KRAUSER 1985, FONDA 1989	AUTORE
1) INTESTINALE	2 - 1	5, 11
Papillare	5	21
Acinoso	3	21
Solido	1	21
2) DIFFUSO	8 - 17	5, 11
Indifferenziato	14	21
Ghiandolare	3	21
3) INTERMEDIO	1 - 3	5, 11

I carcinomi gastrici nel cane tendono ad infiltrare la parete dello stomaco in modo aggressivo ed a invadere i vasi linfatici, metastatizzando frequentemente nei linfonodi gastrosplenici e spesso nei polmoni, nel fegato, nella milza, nei reni, nelle surrenali, nell'omento e nel diaframma. (Gualtieri et al. 1999, Fonda et al. 1989, Hayden et al. 1973, Head 1976, Moulton 1990, Murray et al. 1972, Patnaik et al. 1977, Sautter e Hanlon 1975, Sullivan et al. 1987, Krauser 1985).

#### Aspetti clinico-diagnostici

Il carcinoma gastrico è una patologia neoplastica a carattere insidioso che si manifesta clinicamente solo quando è in uno stadio molto avanzato. I sintomi, estremamente aspecifici, comprendono perdita di peso, anoressia, vomito e meno frequentemente anemia ed emorragie. Segni tardivi possono essere l'emaciazione, la presenza di masse addominali palpabili ed il dolore epigastrico (Fonda 1989; Gualtieri 1999).

La diagnosi precoce tramite programmi di "screening" in soggetti a rischio rimane l'unico mezzo per migliorare la prognosi infausta di questa neoplasia maligna.

La diagnosi si effettua radiologicamente (rx al tubo digerente che possono rivelare difetti di riempimento, ulcere, rigidità della parete, stenosi) ed endoscopicamente. La gastroscopia può rivelare la presenza di una neoformazione vegetante o polipoide, od evidenziare la zona infiltrata dalla proliferazione neoplastica, con la possibilità di eseguire biopsie multiple o il cosiddetto "brushing" per l'esame citologico. Tutti questi parametri, legati allo stato dei tessuti circostanti la neoplasia ed alla presenza di metastasi ai linfonodi regionali o a distanza (valutabili tramite la TAC, l'ecografia epatica, splenica, la laparoscopia ed esami radiografici al torace), permettono di valutare l'operabilità del soggetto. In modo particolare la laparotomia esplorativa permette di formulare una diagnosi definitiva e di valutare l'estensione della neoplasia. A questo scopo grande importanza assume la stadiazione della neoplasia, che si effettua applicando lo schema TNM (non utilizzato per il linfoma gastrico) proposto da Owen nel 1980. (vedi tabella n. 6).

Tabella n. 6: Stadiazione delle neoplasie gastriche in base allo schema TNM proposto da Owen nel 1980

T	N	M
T0= non evidenza di tumore primitivo	N0= non evidenza di metastasi nei linfonodi regionali.	M0= assenza di metastasi
T1= tumore che non invade la sierosa	N1= metastasi riscontrate a livello dei linfonodi regionali	M1= presenza di metastasi
T2= tumore che invade la sierosa	N2= metastasi riscontrate a livello di linfonodi distanti dal sito in cui si è sviluppata la neoplasia primaria.	
T3= tumore che invade i tessuti perigastrici		
Tm= indica la presenza di tumori multipli		

### Casistica d'Istituto

Nel triennio 1997-1999 presso il nostro Istituto sono state diagnosticate nel cane 6 neoplasie epiteliali maligne a localizzazione gastrica. L'età media dei soggetti colpiti è stata di 8,3 anni, con una preponderanza dei maschi sulle femmine (rapporto 5:1). La valutazione dei dati d'archivio d'Istituto si è rivelata sovrapponibile a quella riportata dagli autori citati in bibliografia, sia per quanto riguarda l'incidenza di razza, sesso, età e sede della lesione neoplastica (vedi tabella n. 7).

Tabella n. 7: Razza, sesso, età, sede e diagnosi istologica di 6 casi di carcinoma gastrico osservati presso l'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Parma nel triennio 1997-1999.

RAZZA	SESSO	ETA'	SEDE	DIAGNOSI ISTOLOGICA (Secondo la classificazione di Head 1976)
1. Boxer	M.	7 a.	Regione del fondo	Carcinoma indifferenziato
2. Bull-mastiff	M.	9 a.	Antro pilorico	Carcinoma indifferenziato
3. Pastore belga	M.	6 a.	Regione del fondo	Carcinoma «a cellule con castone»
4. Pointer	M.	12 a.	Regione del fondo	Adenocarcinoma tubulare
5. Bobtail	M.	9 a.	Regione cardiaca	Adenocarcinoma papillare
6. Pastore scozzese	F.	7 a.	Grande curvatura	Adenocarcinoma mucoso

I campioni tissulari ottenuti da exeresi chirurgica (n° 3 casi); da biopsie gastriche (n° 1 caso) e da materiale prelevato nel corso di esami necroscopici (n° 2 casi), sono stati fissati in formalina calcica al 10%, inclusi in paraffina e colorati con metodiche di routine come l'ematossilina-eosina e l'alcian-PAS reazione a pH 2,5 e con colorazioni immunostochimiche con gli anticorpi anti-citocheratina 19 (Dako, cod. M0772) e anti-vimentina (Dako, cod M0725) per fenotipizzare i diversi istotipi cellulari e per evidenziare il grado di differenziazione delle cellule neoplastiche.

Quadri istologici, istochimici ed immunostochimici.

Per la caratterizzazione istologica delle neoplasie si sono seguiti i criteri classificativi proposti dall'OMS.

In due casi (1 e 2, vedi tabella n. 7), classificati come carcinomi indifferenziati, si è osservata la proliferazione di elementi epiteliali atipici che infiltrano diffusamente, come cellule singole o disposte in piccoli aggregati solidi, lo strato inferiore della mucosa, la sottomucosa e la tonaca muscolare della regione fundica ed antrale dello stomaco, con presenza di clusters di cellule neoplastiche nel lume dei vasi linfatici ed ematici (foto 1). Alla colorazione istochimica per l'Alcian- Pas a pH 2,5 gli elementi neoplastici hanno mostrato scarse mucine acidofile, mentre conservano una discreta espressione immunoistochimica per la citocheratina 19. Soprattutto in un campione è presente a livello di tonaca muscolare un'intensa reazione desmoplastica, con proliferazione di fasci di tessuto connettivo fibroso in cui sono racchiusi nidi di cellule neoplastiche (foto 2).

Nel campione n. 3 (classificato come carcinoma a cellule con castone) si sono rilevate numerose cellule poliedriche, con citoplasma pallido e nucleo disposto alla periferia, che invadono e sovvertono gli strati medi e profondi della mucosa ghiandolare per infiltrare poi diffusamente le restanti tonache ed i vasi linfatici. In questo caso le cellule neoplastiche hanno mostrato abbondanti mucine alcianofile intracitoplasmatiche ed una debole reattività alla citocheratina 19 (foto 3, 4 e 5).

Le restanti neoplasie hanno evidenziato la proliferazione di strutture ghiandolari con aspetti morfologici e differenziativi diversi.

Nel campione n.4 (adenocarcinoma tubulare) si sono osservate formazioni tubulari di varie dimensioni nella parete dello stomaco e nei vasi linfatici, caratterizzate da un epitelio cubico con nuclei atipici, da scarsa presenza di mucopolisaccaridi sia nel citoplasma sia nel lume ghiandolare e da una forte espressione immunoistochimica per la citocheratina 19 (foto 6 e 7).

La neoformazione n.5, che si è presentata macroscopicamente come una massa aggettante nel lume gastrico, mostra dal punto di vista istologico strutture papillari ramificate, tappezzate da cellule cilindriche in pluristrato, con un grado variabile di pleomorfismo nucleare ed un elevato indice mitotico. Le cellule neoplastiche hanno manifestato reazione positiva sia per le mucine neutre sia per quelle acide (foto 8).

Nel campione n.6, ottenuto mediante prelievo biotico, si sono evidenziate strutture ghiandolari distese dalla presenza di mucine Pas positive, in cui si osservano pochi elementi cellulari atipici scompagnati dalle abbondanti secrezioni. L'esiguità del campione ha permesso di formulare solo un indirizzo diagnostico di adenocarcinoma mucinoso.

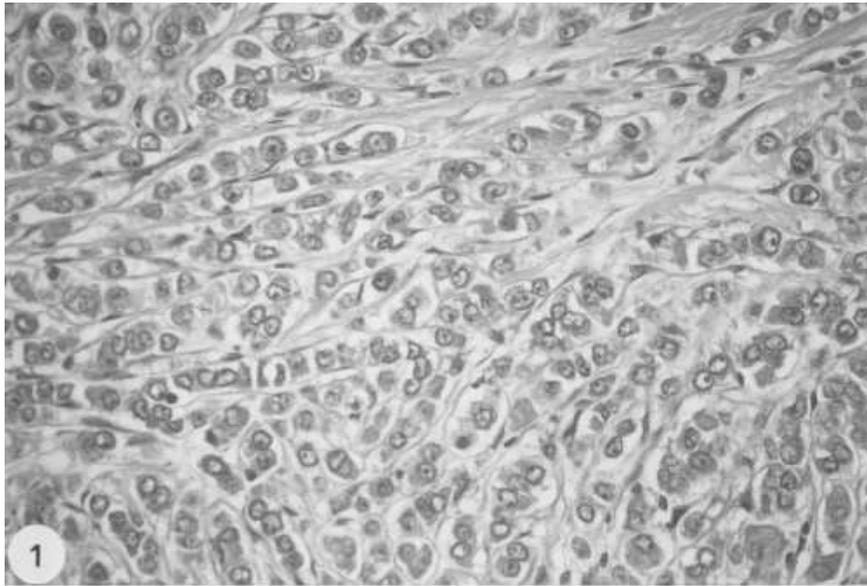


Fig. 1 Cane, Boxer, Maschio, 7a. E.E., 400x. Carcinoma indifferenziato. Si evidenziano elementi epiteliali atipici disposti in aggregati solidi che infiltrano diffusamente le torache gastriche.

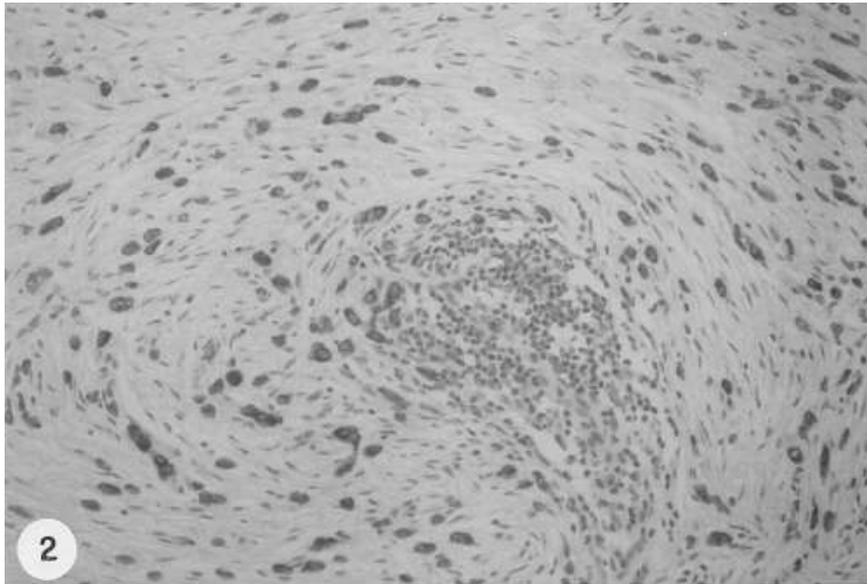


Fig. 2 Cane, Boxer, Maschio, 7a. Colorazione immunistochemica CK 19, 200x. Carcinoma indifferenziato. Nella tonaca muscolare si osservano cellule neoplastiche positive per la citocheratina 19, immerse in un abbondante stroma fibroso.

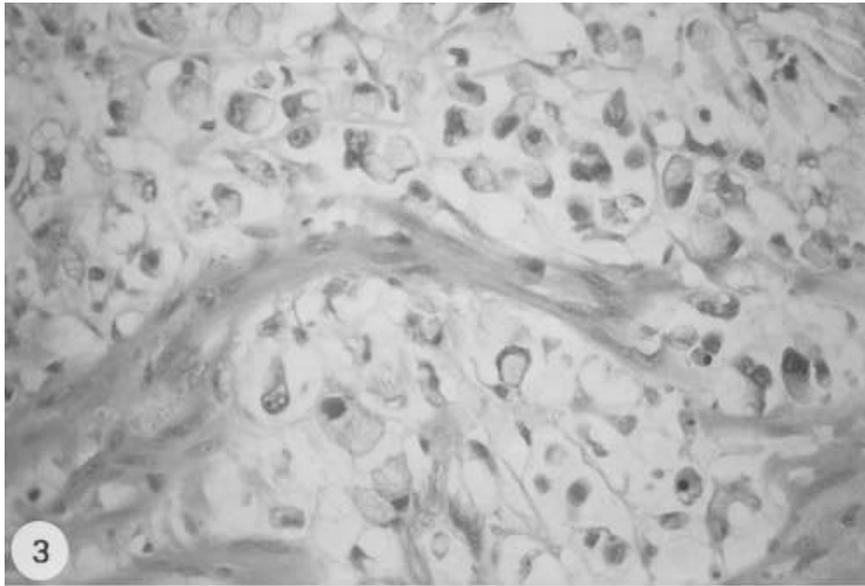


Fig. 3 Cane, Pastore Belga, Maschio, 6a. E.E., 400x. Carcinoma a cellule "ad anello con castone". La tonaca mucosa appare infiltrata da elementi cellulari con citoplasma pallido e nucleo disposto alla periferia.

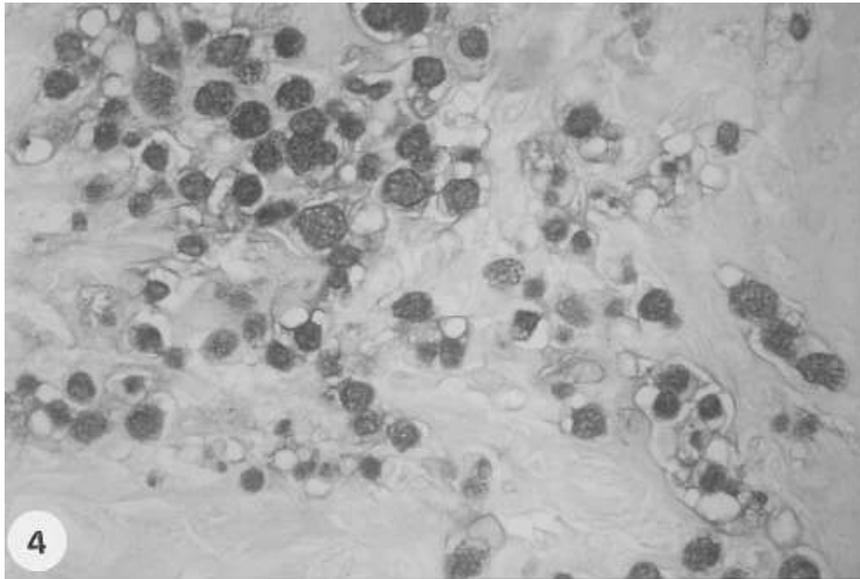


Fig. 4 Cane, Pastore Belga, Maschio, 6a. Alcian-PAS a pH 2,5, 400x. Carcinoma a cellule "ad anello con castone". Si evidenziano numerose cellule neoplastiche che mostrano abbondanti mucine alcianofile intracitoplasmatiche.

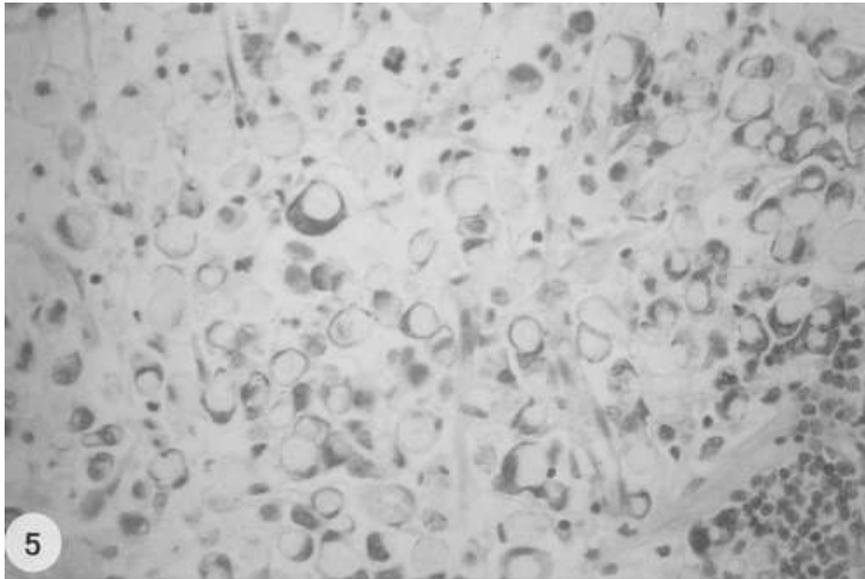


Fig. 5 Cane, Pastore Belga, Maschio, 6a. Colorazione immunohistochimica con CK19, 400x. Carcinoma a cellule "ad anello con castone". Le cellule neoplastiche presentano una debole positività alla citocheratina 19.

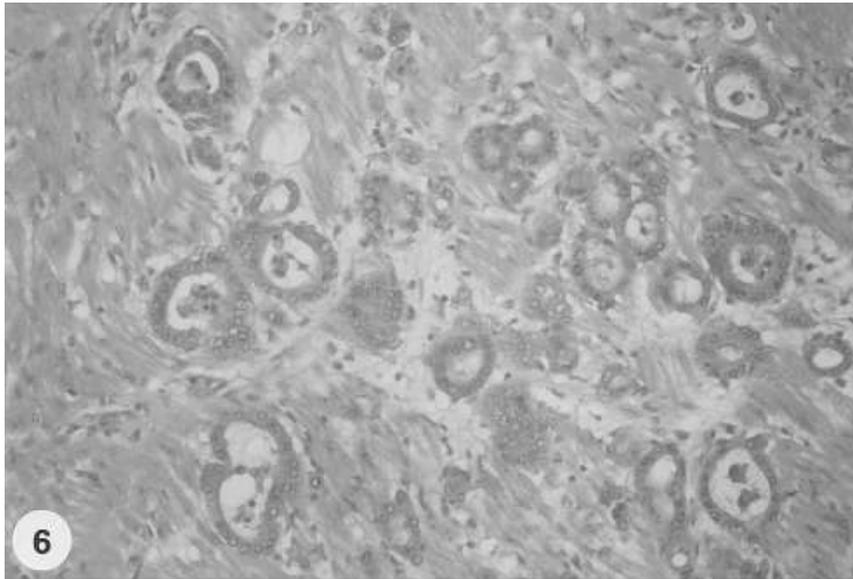


Fig. 6 Cane, Pointer, Maschio, 12a. E.E., 200x. Adenocarcinoma tubulare. Nella parete gastrica si evidenziano strutture tubulari caratterizzate da un epitelio cubico con nuclei atipici.

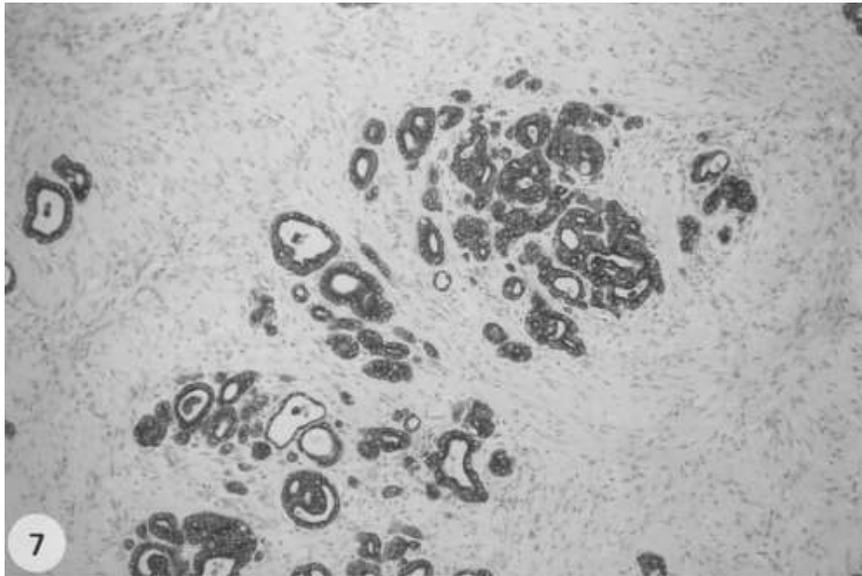


Fig. 7. Cane, Pointer, Maschio. 12a. Colorazione immunohistochimica con CK19, 200x. Adenocarcinoma tubulare. Gli elementi epiteliali mostrano una intensa positività alla citocheratina 19.

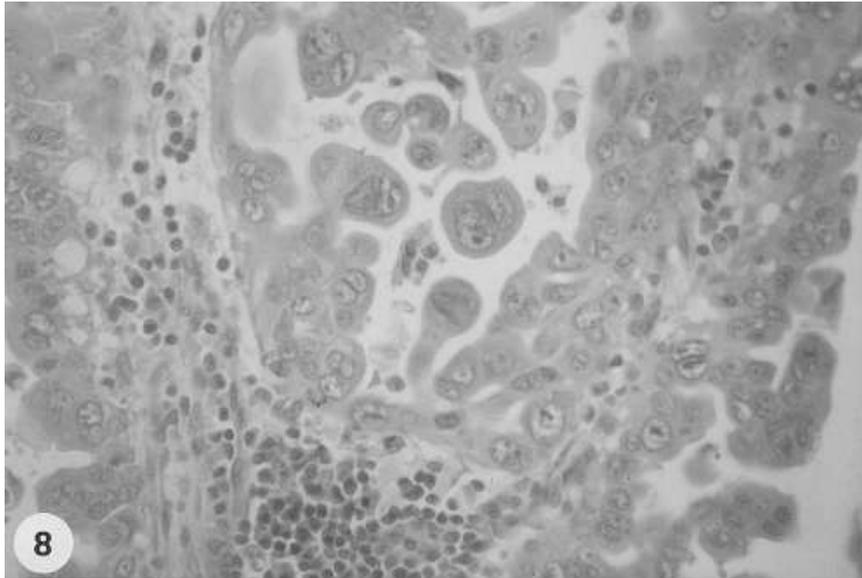


Fig. 8. Cane, Pointer, Maschio. 9a. E.E., 400x. Adenocarcinoma papillare. Formazioni papillari tappezzate da cellule epiteliali con atipie nucleari e nucleoli evidenti.

## Conclusioni

Il contributo dell'anatomia patologica nello studio dei tumori gastrici assume aspetti diversi a seconda che ci si trovi nel momento pre-operatorio, post-operatorio o nel contesto dell'esame necroscopico. Il momento pre-operatorio si avvale della citologia e del prelievo biotico che permettono di accertare la presenza di una neoplasia e di tipizzarla, attraverso preparati fissati ed inclusi in paraffina o congelati e sezionati al criostato, nei casi in cui sia necessario l'esame istologico intraoperatorio. L'utilizzo dell'immunocistochemica risulta estremamente utile nella diagnosi e tipizzazione dei tumori gastrici soprattutto nei casi dubbi e di difficile interpretazione.

Nel momento post-operatorio è importante caratterizzare la progressione della neoplasia, raccogliendo i dati necessari per la stadiazione (sistema TNM) e la definitiva tipizzazione del tumore. L'esame citologico del lavaggio peritoneale nel momento post-operatorio, già ampiamente sperimentato nell'uomo, potrebbe assumere notevole importanza anche in medicina veterinaria per evidenziare la presenza di cellule neoplastiche nel cavo addominale. Infatti nell'uomo le disseminazioni peritoneali rappresentano i siti più comuni di ripresa della malattia dopo una chirurgia potenzialmente curativa e l'esame citologico ed immunocistochemico, mettendo in evidenza le cellule neoplastiche nel cavo addominale, rappresentano un criterio fondamentale per interventi chemioterapici immediati post-operatori.

Infine l'esame necroscopico consente all'anatomopatologo il controllo delle valutazioni precedenti, compresa la reale propagazione del processo neoplastico nell'organismo (staging necroscopico).

Il contributo dell'anatomopatologo è quindi di fondamentale importanza nella diagnosi precoce delle neoplasie gastriche, nell'indirizzare il chirurgo verso un

corretto approccio terapeutico (anche attraverso la diagnosi intraoperatoria di cui abbiamo accennato sopra) e nella valutazione degli aspetti prognostici, caratterizzando la progressione e la relativa stadiazione della neoplasia.

Parole chiave: Carcinoma gastrico, cane, Ematossilina-Eosina, Alcian-PAS pH 2,5, Citochratina 19.

Key words: Gastric carcinoma, dog, Haematoxylin-Eosin, Periodic Acid Schiff - Alcian blue pH 2.5, Cytokeratin 19.

RIASSUNTO: Con il presente lavoro gli autori hanno voluto prendere in considerazione gli aspetti eziopatogenetici, classificativi ed anatomoistopatologici relativi al carcinoma gastrico del cane. Gli autori riportano inoltre l'esperienza personale, relativa a casi di carcinoma gastrico del cane osservati presso l'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria di Parma, descrivendo in modo particolare gli aspetti istopatologici, istochimici ed immunoistochimici.

SUMMARY: Stomach neoplasia is a common gastric pathology in human beings, but it is considered rare in the dog and its most important type is represented by gastric carcinoma in order to 1-2% of all canine malignant neoplasms and 47 to 72 % of all gastric tumors ( 6, 9, 13, 17, 27, 29, 30, 31, 32). From 1971 to 1999 many authors have described record cases of gastric carcinoma in the dog (5, 6, 7, 11, 14, 19, 20, 21, 24, 25, 28), considering also breed predisposition (Rough Collie, Belgian Shepherd and Stafford Shire Terrier), mean age (9.5 years), and sex incidence (male prevalence - ratio 2.5/1) (5, 6, 11, 24, 25, 28). The aetiology of gastric carcinoma is characterised by different factors and most important are: environment (pollution, pesticides, mycotoxins) and salt (4, 6, 29). Endogenous genetic factors, that play a role in pathogenesis of many tumors, are unidentified in the origin of gastric carcinoma (15). Recently, *Helicobacter pylori* gastric infection has been identified as a predetermining pathological condition in the development of natural gastric neoplastic lesions in man and in experimental conditions also in several animal species (5, 11, 21, 22, 25). Atrophic gastritis and duodenogastric reflux (after distal gastric resection) increases the risk of gastric carcinoma in human beings (1, 4, 6, 16). Gastritis and intestinal lymphangectasia, as a significative lesions associated to gastric carcinoma, have been detected in Lundehunds breed and they might represent a pathological triad of a single process (10). Gastric carcinoma in the dog is frequently located in the pyloric antrum region and lesser in the curvature region, infrequently diffuse to whole stomach cavity. Fundus and cardias anatomic regions are less affected by the tumour (4, 6, 7, 11, 14, 19, 20, 21, 24, 25, 28). The classification of gastric carcinoma in human beings is based on (2): A) Depth of lesion; B) Type of growth; B) Histological type. In early gastric carcinoma the lesions involve the mucosa and the sub-mucosa layers while in advanced forms the submucosa is massive involved by the neoplasia with extension to the muscularis mucosae. The type of growth can be exophytic, flat or depressed and ulceriform. In the dog the four main patterns of carcinoma given in order of frequency of occurrence, are: 1) ulcerated, plaque-like thickening; 2) diffuse non-ulcerated thickening; 3) proliferative thickening; 4) raised sessile polyp (5, 6, 17). Histologically gastric carcinoma can be classified as adenocarcinoma, in four different sub-types, (papillary, tubular, mucinous and signet ring cells adenocarcinoma) or undifferentiated adenocarcinoma (Head 1976), while Lauren's classification (for human beings) distinguishes two types of gastric carcinoma: intestinal and diffuse type. Some studies have demonstrated that Lauren's classification can be easily adapted to the dog (5, 6, 8, 20, 21). Papillary adenocarcinoma exhibits papillary structures with a lamina propria core covered by polar, columnar or cuboidal epithelium. The tubular adenocarcinoma consists of branching tubules embedded in a fibrous stroma. The epithelium of tubules may be columnar, cuboid or flattened (8). The mucinous adenocarcinoma is characterised by excessive mucin production so that the distended glands may rupture, leading to the formation of lakes of mucin in which groups of epithelial cells may be found. The signet-ring cell carcinoma is composed of isolated cells with mucin in their cytoplasm (8). In the undifferentiated carcinoma no glandular structure is visible. It is characterised by three types: intestinal, diffuse and intermediate type (6, 8). Intestinal type is characterised by neoplastic cells that resemble intestinal columnar epithelial cells while diffuse type comprises small rounded cells. Many but not all of the cells are of signet-ring pattern. Intermediate type is composed of equal amounts of the two above types or of solid carcinoma. Gastric adenocarcinoma and carcinoma can present metastasis in local lymph nodes, in liver, in spleen, in kidney, in adrenal glands, in omentum and in diaphragm (6, 7). The clinical signs are non-specific and for this reason many dogs with gastric carcinoma are diagnosed in advanced stage of the disease. The clinical signs are characterised by weight loss, anorexia, vomiting, abdominal pain and, less frequently, anaemia, haematemesis and melena (5, 6, 25). Radiology, endoscopy, histological or cytological biopsy and laparoscopy are fundamental for the early diagnosis of gastric carcinoma. These techniques are also useful in screening programs. The clinical stage of gastric adenocarcinoma and carcinoma in dog is determined by applying the scheme TNM proposed by Owen in 1980. This scheme includes the tumour categories (T), the lymph node categories (N) and metastasis categories (M). From 1997 to 1999 the pathologists of the Department of Veterinary Anatomic Pathology (University of Parma), have diagnosed 643 canine neoplasms (403 epithelial tumors, 142 round cell tumors and 98 mesenchymal tumors) of which 6 were classified as malignant epithelial gastric tumors (0.93%). The mean age of the affected dogs was 8,3 years with a male to female ratio of 5/1. Tissue samples collected during surgery pathology service (3 cases), gastric endoscopy (1 case), necropsy (2 cases) were fixed in 10% buffered formalin, cut at 5 µm thick and stained for haematoxylin-eosin and Periodic Acid Schiff - Alcian blue pH 2.5. The cases were immunohistochemically studied vs. anti-cytokeratin 19 (Dako cod. M0772) and anti-vimentin (Dako, cod M0725) detected with immunoperoxidase method. Histologically all tumors were epithelial and malignant. Two cases (cases 1 and 2; tab. 7) of carcinoma were classified as undifferentiated carcinoma. The malignant epithelial cells, weakly positive to Alcian-Pas and CK 19 immunoreactive, invaded the mucosa, the submucosa and the muscularis mucosae. An undifferentiated carcinoma (case 1) shows big clusters or isolated epithelial cells embedded in a fibrous stroma (Fig. 1 and 2).

One case was classified as diffuse type carcinoma of signet ring cells (case 3; tab. 7), strongly positive to Alcian-Pas and a weakly immunopositivity to CK 19, has shown substantial intracellular mucin and eccentric nucleus. The neoplastic cells invaded the mucosa, the submucosa, the muscolaris mucosae and also the lymphatic vessels (Fig. 3, 4, and 5).

One case was classified as tubular adenocarcinoma (case 4; tab. 7). In this case, epithelial cells organised in tubular structures were observed in the mucosa, in the submucosa and in the muscolaris mucosae (Fig. 6 and 7). The malignant epithelial cells, weakly positives to Alcian-Pas and strongly CK 19 immunoreactives, were also observed in the lymphatic vessels associated to few signet ring cells.

One case was classified as papillary adenocarcinoma (case 5; tab. 7). In this case the tumour show papillary structure in the mucosa, with neoplastic epithelial cells, strongly reactive for the Alcian-Pas (Fig. 8).

One case was classified as mucinous adenocarcinoma (case 6; tab. 7). The epithelial cells show intracellular acid and neutral mucins.

Pathologist in canine gastric carcinoma management has a very important role in the pre-surgery phase, in post-surgery phase and in necroscopic examination. In the pre-surgery phase, the diagnostic activity of the pathologist is essential for characterising the tumour cytologically or histologically, while immunohistochemistry technique is extremely important in the diagnosis of canine gastric neoplasm of uncertain morphology.

The post-surgery phase requires competence of the pathologist regard to gross pathology examination, histology, cytology and information for the TNM staging of the tumour, also in order its follow-up.

The necroscopic examination permits the pathologist to evaluate the necroscopic staging.

The role of the pathologist is active and fundamental in the management of the neoplastic dog above all in the early diagnosis of gastric cancer. The cytology, the histology and the immunohistochemistry are very important techniques to know all prognostic and therapeutic aspects of canine gastric carcinoma.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia la Dott.ssa Laura Kramer per l'aiuto nella traduzione del testo.

#### Bibliografia

1. Casteleyn P.P., Willems G.: Cell proliferation and atrophic gastritis in explanted canine gastric mucosa. J. Natl. Cancer Inst. 55, 6, 1383-1387, Dec 1975.
2. Corradi A., Cantoni A.M., Di Lecce R., Scanziani E., Luppi A., Cabassi E.: Expression of alternative spliced CD44 (isoforms v5-v6) transcript in canine gastric carcinoma. 16th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Lillehammer, Norway, p. 27, 23-26 september 1998.
3. Corradi A., Cantoni A.M., Di Lecce R., Scanziani E., Luppi A., Cabassi E.: A comparative preliminary study on CD44 isoforms (v5-v6) in canine gastric carcinoma and in chronic canine gastritis by *Helicobacter spp.* 17th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Nantes, France, September 14-17, p. 164, 1999.
4. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L.: Le basi patologiche delle malattie. Ed. Piccin, V edizione, Vol. II, 889-893, 1997.
5. Fonda D., Gualtieri M., Scanziani E.: Gastric carcinoma in the dog: A clinicopathological study of 11 cases. Journal of Small Animal Practice. 30, 353-360, 1989.
6. Gualtieri M., Monzeglio M.G., Scanziani E.: Gastric Neoplasia. Vet. Clin. of North America Small Animal Practice. Vol. 29, 2, 415-440, March 1999.
7. Hayden D.W., Nielsen S.W.: Canine alimentary neoplasia. Zentralbl. Veterinarmed. A, 20, 1-22, 1973.
8. Head K.W.: Tumours of the lower alimentary tract. Bull World Health Organ., Vol. 53, 167-186, 1976.
9. Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N.: Pathology of domestic animals 3rd edn. Academic Press, Orlando, p 49, 1984.
10. Kolbjornsen O., Landsverk T.: Gastropathies in the Lunde hund. I. Gastritis and gastric neoplasia associated with intestinal lymphangiectasia. A.P.M.S. 102, 9, 647-661, Sep 1994.
11. Krauser V. K.: Neoplasien des magens beim hund. B.M.T.W., 98, 48-53, 1985.
12. Lecoindre P., Chevallier M., Peyrol S., Boude M., Ferrero R.L., Labigne A.: Pathogenic role of gastric *Helicobacter sp* in domestic carnivores. Vet Res 28, 3, 207-215, May-Jun 1997.
13. Lindt S.M: Handbuch der speziellen pathologische Anatomie der Haustiere. Ed. E. Joest, 3rd end. Vol. V, Parey, Berlin, pp 477-495, 1970.
14. Lingeman C.H., Garner F.M., Taylor D.O.N.: Spontaneous gastric adenocarcinomas of dogs: A Review. J Natl Cancer Inst 47, 137, 1971.
15. Misdorp W.: Veterinary Cancer Epidemiology. Vet. Q, 18, 1, 32-36, Mar 1996.
16. Miwa K., Hattori T., Miyazaki I.: Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis. Cancer 15, 75, 1426-1432, Mar 1995. Moulton J.E.: Tumours in Domestic Animals. University of California Press. Third Edition, 391-397, 1990.
17. Moulton J.E.: Tumours in Domestic Animals. University of California Press. Third Edition, 391-397, 1990.
18. Muller W., Schneiders A., Heider K.H., Meier S., Hommel G., Gabbert H.E.: Expression and prognostic value of the CD44 splicing variants v5 and v6 in gastric cancer. Journal of Pathology, 183, 222-227, 1997.
19. Murray M., Robinson P.B., McKeating F.J.: Primary gastric neoplasia in the dog: A clinicopathological study. Vet. Rec. 91, 474, 1972.
20. Owen L.N.: TNM Classification of tumors in Domestic Animals. World Health Organization, Geneva, 26-32, 1980.
21. Patnaik A.K., Hurvitz A. I., Johnson G.F.: Canine gastric adenocarcinoma. Veterinary Pathol., 15, 600-607, 1978.
22. Patnaik A.K., Hurvitz A. I., Johnson G.F.: Canine gastrointestinal neoplasm. Veterinary Pathol., 14, 547-555, 1978.
23. Rossi G., Rossi M., Vitali C.G., Fortuna D., Burrioni D., Pancotto L., Capecci S., Sozzi S., Renzoni G., Braca G., Del Giudice G., Rappuoli R., Ghiara P., Taccini E.: A conventional beagle model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. 67, 6, 3112-3120, Jun 1999.
24. Rugge M., Busatto G., Cassaro M., Shiao Y.H., Russo V., Leandro G., Avellini C., Fabiano A., Sidoni A., Covacci A.: Patients younger than 40 years with gastric carcinoma: *Helicobacter pylori* genotype and associated gastritis phenotype. Cancer, 85, 12, 2506-2511, Jun 1999.

- 25. Sautter J. H., Hanlon G.F.: Gastric neoplasms in the dog: A report of 20 cases. J.A.V.M.A., Vol. 166, 7, 691-696, April 1975.
- 26. Scanziani E., Giusti A.M., Gualtieri M., Fonda D.: Gastric carcinoma in the Belgian shepherd dog. Journal of Small Animal Practice, 32, 465-469, 1991.
- 27. Simpson K.W., McDonough P.L., Strauss-Ayali D., Chang Y.-F., Harpending P., Valentine B.A.: Helicobacter felis Infection in Dogs: Effect on Gastric Structure and Function. Vet. Pathol 36, 237-248, 1999.
- 28. Smith A.H., Jones T.C., Hunt P.H.: Veterinary pathology, 3 rd edn. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 1204, 1985.
- 29. Sullivan M., Lee R., Fisher E.W., Nash A.S., McCandlish I.A.P.: A study of 31 cases of gastric carcinoma in dogs. Veterinary Record 120, 79-83, 1987.
- 30. Theilen G.H., Madewell B.R.: Tumors of the digestive tract. In Veterinary Cancer Medicine, ed Philadelphia, Lea & Febiger, 499, 1987.
- 31. Twedt D.C., Wingfield W.E.: Diseases of the stomach. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Ed S. J. Ettinger, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1267-1269, 1983.
- 32. Wingfield W.E.: Small animal gastric disease. Veterinary gastroenterology. Ed. N.V. Anderson W.B. Saunders, Philadelphia, pp442-444, 1980.
- 33. Wingfield W.E., Twedt D.C.: Medical diseases of the stomach. Canine and feline gastroenterology. Eds B. D. Jones and W.D. Liska, W.B. Saunders, Philadelphia pp. 124-126, 1986.

# DILATED CARDIOMYOPATHY IN A FAMILY OF GREAT DANES: EFFICACY OF ORAL L-CARNITINE

Cecilia Quintavalla, Danitza Pradelli, Giuseppe Zannetti

*Istituto di Clinica Medica Veterinaria – Università di Parma*

## Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a primary myocardial disease characterised by progressive systolic dysfunction due to impaired myocardial contractility and cardiac chamber dilatation (usually all four chambers to some degree, but sometimes predominantly left or more rarely predominantly right)<sup>1,10</sup>. Diastolic dysfunction also occurs in DCM, but it is less notable than the characteristically severe systolic dysfunction<sup>2</sup>.

The disease was first described by Ettinger et al. in 1970 as congestive heart failure in conjunction with dilation of cardiac chambers and absence of other congenital or acquired heart diseases<sup>3</sup>. Since this first description, DCM has been widely observed in the dog.

DCM is considered one of the most common acquired heart diseases in the dog and it has been recognised in many medium-sized, large and giant breed dogs, notably English<sup>4</sup> and American Cocker Spaniels<sup>9</sup>, Boxers<sup>5</sup>, Dalmatians<sup>6</sup>, Doberman Pinschers<sup>7</sup>, Newfoundlands<sup>8</sup>, Irish Wolfhounds, Great Danes, Saint Bernards, Old English Sheepdogs, Scottish Deerhounds<sup>1</sup>. However, the prevalence of the disease in most affected breeds shows wide differences related to geographic locations. Whether this variability reflects genetic or environment differences is unknown.

Despite the differences in breed distribution, the disease is rarely identified in dogs less than 12 kg, and male dogs are overrepresented in most demographic investigations on the disease<sup>1</sup>.

Many efforts have been spent to identify the causes of the disease.

A lot of theories have been proposed, taurine<sup>9</sup> e/o carnitine<sup>5</sup> deficiency, antibodies against beta-receptors<sup>11</sup> or the adenine nucleotide translocator<sup>12</sup>, mutations in the cardiac actin gene<sup>13</sup> or dystrophin abnormalities<sup>15</sup>, infectious agents, toxins<sup>1</sup> and even pregnancy<sup>14</sup>, but the cause in most cases remains unknown.

Despite the variety of potential causes of DCM, a relative morphologic, histologic and ultrastructural homogeneity of patients with DCM has been observed. This suggests the existence of similarities in the response of the myocardium to different types of injuries and that some common cellular pathways that respond to those injuries cause and/or exacerbate the structural and functional changes typical of DCM<sup>1</sup>.

This paper relates about two cases of dilated cardiomyopathy in a family of Great Danes and the successful use of oral L-carnitine in the management and in the clinical course of the disease.

## Case history

Three 2-year-old Great Danes, one male (dog A) and two females (dogs B and C), have been presented at the Institute of Veterinary Internal Medicine of the University of Parma on May 1997 for cardiovascular examination because of a familial history of sudden death. Their 4-year-old father died suddenly a few days before without showing overt clinical signs of heart disease. No necroscopic examination had been performed on this dog, belonging to a different owner. A physical and electrocardiographic examination performed by a practitioner on dogs' mother did not reveal signs of congenital or acquired heart diseases. At the time of writing the mother is still healthy.

The three dogs belonged to a litter of 7 puppies. Three littermates, two males and a female, died suddenly at 1 year of age, but the cause of the death is still unknown because necroscopic examination has not been performed. A 18-month-old male littermate died of cardiovascular collapse because of severe dehydration due to haemorrhagic gastroenteritis. Microbiological culture of faecal samples revealed an high titre of *Salmonella* spp. and protozoa.

At the time of presentation, the three Great Danes were asymptomatic. Dogs' growth was normal, as well as the level of activity and major organic functions. Dogs had been regularly vaccinated and submitted to prophylaxis against heartworm disease.

### Cardiovascular physical examination

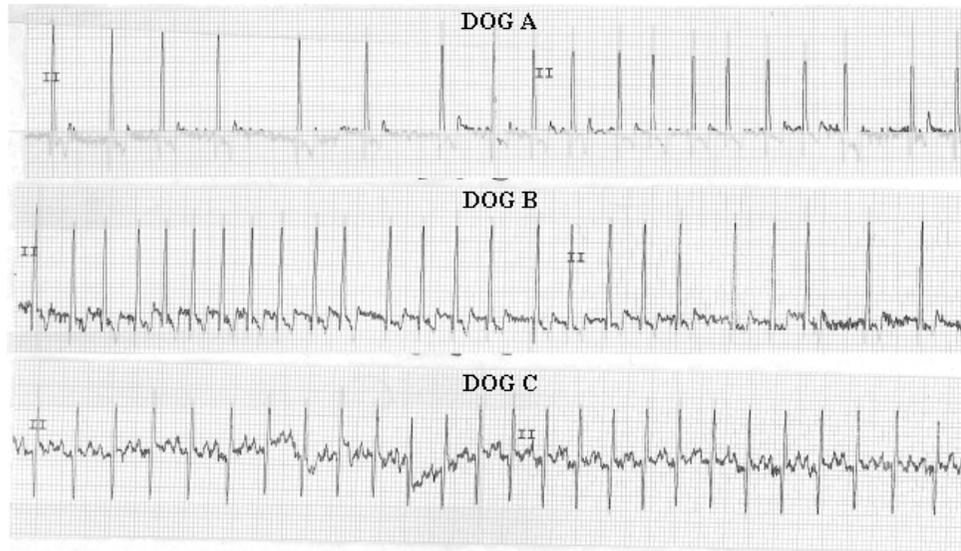
Dogs underwent a complete cardiovascular physical examination revealing a normal mucous membrane colour and normal capillary refilling times (< 2 sec).

In two dogs out of 3 (A and B) a rapid, irregular arterial pulse of variable strength was felt. Cardiac auscultation revealed tachycardia with irregular rhythm. Heart sounds varied in intensity beat by beat. A diastolic, 3/6 heart murmur, best heard on the left apex, was audible in dog B.

In dog C, the pulse was regular but tachysphygmic. On cardiac auscultation heart sounds were normal and only tachycardia was present.

The auscultatory findings were consistent with atrial fibrillation in dogs A and B and with tachycardia in dog C.

An electrocardiographic examination has been performed on the three dogs in order to characterise the existing arrhythmias (Fig.1).



**Fig. 1:** Electrocardiographic tracings in DII of dogs A, B, C at first examination. The first (dog A) and second (dog B) strips are consistent with atrial fibrillation as shown by the lack of P waves, the variability of R-R intervals and the normal morphology of QRS complexes. A low-frequency (average heart rate = 150 bpm) and high-frequency atrial fibrillation (average heart rate 200 bpm) were found in dog A and B, respectively. Sinus tachycardia is present in the third strip (dog C).

Paper speed = 25 mm/sec, sensitivity 1 cm = 1 mV

Dog A showed a low frequency atrial fibrillation with an average heart rate of 150 bpm, dog B a high frequency atrial fibrillation with an average heart rate of 200 bpm and dog C a sinus tachycardia with an average heart rate of 190 bpm.

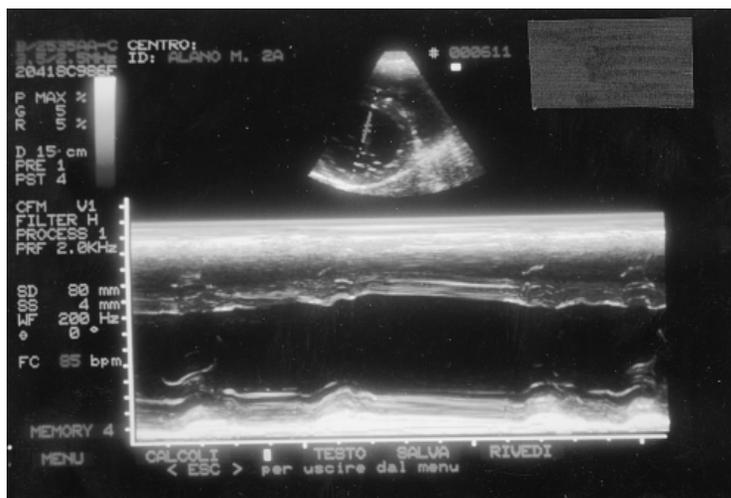
#### Echocardiography

Ultrasound imaging was performed with a SIM 7000 Challenge CFM machine and a 2.5-3.5 MHz transducer with conscious dogs restrained on an appropriate scanning table with a cutout.

Standard images have been obtained from the right and left parasternal views according to the guide-lines of Thomas et al., 199420.

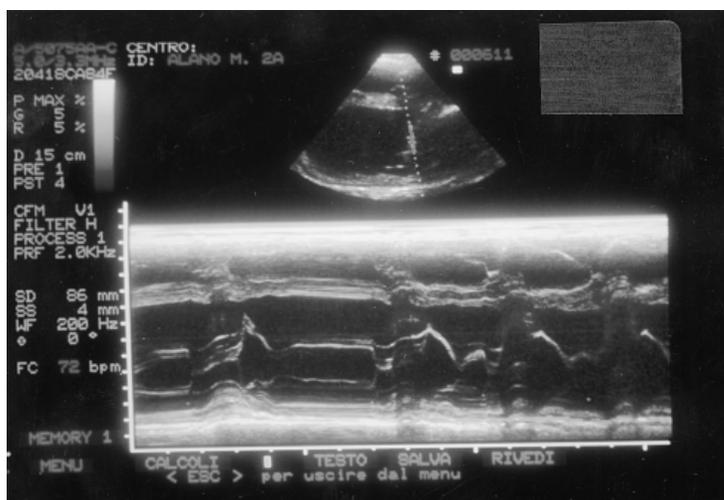
Dog A

B-mode echocardiography showed a mild increase in left atrial diameter, as shown by an increased left atrium/aorta diameter ratio (LA/Ao = 2.1) measured from the right parasternal short-axis view at the heart base level. The right atrium appeared similarly enlarged. A mild dilation of ventricular chambers was apparent and a marked septal and parietal hypokinesis was appreciated (Fig. 2).



**Fig. 2:** Dog A: Duplex echocardiography performed by the right parasternal short axis view at papillary muscles level. A noticeable hypokinesis of interventricular septum and left ventricle posterior wall is appreciable. M- mode measurement have been performed from this view, showing a reduction of fractional shortening and a slight increase in left-ventricle end-diastolic and end-systolic diameters. Septal and free-wall thickness was normal.

On Duplex echocardiography, a reduction of fractional shortening (FS) to value in the lower limit of the range reported for the breed has been observed: the FS, measured on 6 cardiac cycles to reduce the influence of ventricular rate and diastolic pause on ventricular filling, averaged 16%. Other relevant finding were an increased EPSS (13.8 mm) (Fig.3) and a slight increase of endo-diastolic (70 mm) and end-systolic (54.2 mm) diameters, as compared to normal values for Great Danes<sup>21,22</sup>.



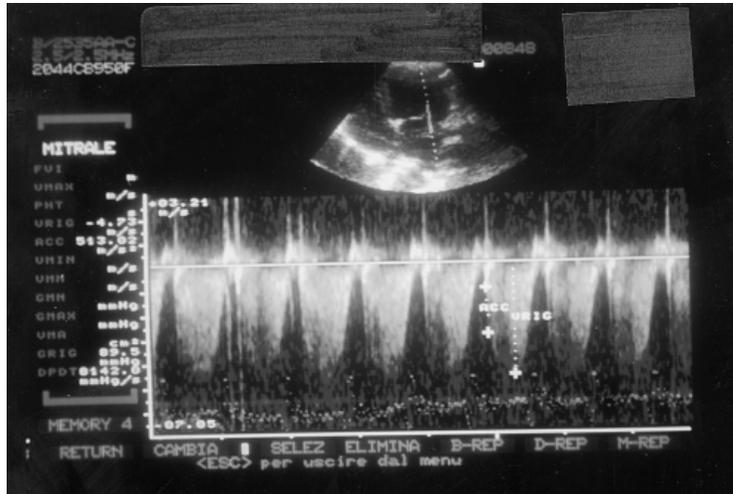
**Fig. 3:** Dog A: Duplex echocardiography performed from the right parasternal short axis view at mitral valve level. Parietal and septal hypokinesis is evident as well as an increased distance between point E of mitral valve opening and interventricular septum, index of left ventricle enlargement.

Doppler evaluation of transvalvular flows was normal, with exception for predictable flow velocity variations related to variable ventricular filling due to atrial fibrillation.

Echocardiographic findings were consistent with dilated cardiomyopathy.

Dog B

Echocardiographic examination of dog B showed similar findings: increased end-diastolic (77 mm) and end-systolic (60 mm) left ventricle diameters, increased EPSS (15 mm), reduced FS (15%) and increased left atrium/aortic diameter ratio (LA/Ao = 3). Moreover, an high velocity regurgitant flow was registered at mitral level on spectral echocardiography (Fig. 4).



**Fig. 4:** Dog B.: Continuous spectral Doppler performed from the left apical four-chamber view showing an high velocity regurgitant flow in the left atrium, as a consequence of mitral valve apparatus distortion due to chamber dilation. An high regurgitant flow (> 4 m/sec) is generally considered a better prognostic indicator in dogs with dilated cardiomyopathy<sup>23</sup>.

Echocardiographic findings were consistent with dilated cardiomyopathy.

Dog C

All measured parameters fell into normal range for this breed.

#### Treatment and follow-up

Dogs A and B have been allocated in Class I of heart failure according to the guide-lines of the NYHA and of the International Small Animal Cardiac Council.

To both dogs a therapy with ACE-inhibitors (enalapril: 0.5 mg/kg/b.i.d.) associated with digoxin (0.22 mg/m<sup>2</sup>/b.i.d.) and beta-blockers (propranolol: 0.5 mg/kg/t.i.d.) has been prescribed. Moreover, oral L-carnitine has been administered (5 grams/die).

At the 10-day follow-up, the owner reported weakness, lethargy and anorexia of dog A. Electrocardiographic tracing showed a persistent atrial fibrillation with marked reduction of ventricular rate (70 bpm). Digoxin administration has been discontinued and the dog has been maintained under beta-blocking therapy at the same dosage.

Dog B was still asymptomatic and the EKG showed a slowing of ventricular rate to 140 bpm. No therapy adjustment has been applied.

At the 15-day follow-up dog A showed an increase of heart rate to 80-100 bpm and the vanishing of previous clinical signs.

At the 8-month follow-up, echo-Doppler parameters were stable as compared to previous data for both dogs, A and B. EKG tracings showed atrial fibrillation with an heart rate of 100 and 140 bpm, respectively.

Dygoxinemia of dog B fell into normal range (1.2 ng/ml).

At 14-month follow-up a slight increase in EPSS (13.5 mm) and of LA/Ao ratio (2.7) has been observed in dog A. Atrial fibrillation was still present.

At 2-year follow-up dog A showed an increase in left ventricle end-diastolic (77 mm) and end-systolic (63.7 mm) diameters, an increase of EPSS (14.5 mm) and a slight decrease in FS (14%) as compared to previous controls, but clinical conditions were stable and no signs of heart failure have been manifested.

Dog B did not show consistent alterations in echo-Doppler and EKG parameters as compared to previous control.

Dog C has not been treated and at the time of writing it has not showed overt clinical signs of heart failure nor alterations of echocardiographic patterns.

## DISCUSSION

DCM has been long suspected to be a familial disease in the dog with a possible genetic basis because of a high prevalence of the disease in certain breeds and specific families. Familial DCM has been demonstrated in Boxers<sup>5,10</sup>, Dobermans<sup>16</sup>, Irish Wolfhounds<sup>17</sup>, Portuguese water dog puppies<sup>18</sup> and Newfoundlands<sup>19</sup>. In most cases the mode of inheritance has proved difficult to conclusively elucidate although most Authors suspect an autosomal dominant transmission (with the exception of Portuguese water dog pups DCM which is autosomal recessive).

The familial nature, male predominance and geographic variation in breed prevalence rates suggest that genes play an important role in the pathogenesis of DCM in dogs or initiating inherited DCM and/or influencing the progression of DCM caused by environmental (not genetic) factors.

Myocardial L-carnitine deficiency has received considerable attention as a possible cause of or contributor to cardiomyopathy in dogs and humans<sup>5,9,24-27</sup>. Carnitine plays important roles in mitochondrial metabolism, including transporting long-chain free fatty acids into the inner mitochondrial membrane where beta oxidation occurs. Because fatty acids are the heart's major metabolic fuel, it is theorised that inadequate amounts of free L-carnitine could cause myocardial damage as a result of altered energy metabolism<sup>1,28</sup>.

In normal mammals, plasma and myocardial concentrations of carnitine are strictly related. However, reduced concentrations of myocardial L-carnitine have been measured in several canine breeds with DCM, including Boxers, Doberman Pinschers and American Cocker Spaniels. Dogs with low myocardial L-carnitine concentrations usually have normal plasma concentrations, suggesting the possibility of a membrane transport defect. Has been reported that the 80% of dogs with DCM have a myocardial deficiency of carnitine but normal to increased L-carnitine plasmatic level, while both myocardial and systemic L-carnitine deficiency is registered only in the 20 % of dogs with DCM<sup>26</sup>. As a result, the dosage of plasma concentration of carnitine is a specific but insensitive indicator for myocardial carnitine deficiency.

The response of dog with DCM to oral carnitine supplementation is also variable. In some dogs a dramatic improvement has been observed<sup>5</sup> while in other cases of DCM a clinical subjective improvement has been noted, not supported by improved cardiac function as assessed by echocardiography<sup>24,26</sup>. Dogs with proved L-carnitine deficiency may not experience benefits from supplementation<sup>29</sup>. The supplementation with L-carnitine and taurine has been proved as beneficial in experimental study in American Cocker Spaniel with decreased plasma concentrations of both carnitine and taurine<sup>9</sup>.

As the natural history of dilated cardiomyopathy is variable and the most part of clinicians prescribe a combination of drugs to treat heart failure and arrhythmias associated to the disease, it is difficult to objectively evaluate the effects of carnitine supplementation on survival or on other clinical and cardiac function parameters<sup>29</sup>.

The early clinical benefits observed in the most part of dogs treated with oral L-carnitine were an increase of appetite and of activity level, as reported by the owners 1-4 weeks after starting supplementation. Cardiac function, as assessed by ultrasonography, showed a variable improvement only after 2-3 months of oral L-carnitine therapy. The clinical improvement could go on for 6-8 months until a "plateau" stage was reached, even if cardiac function remained depressed on echocardiography and no effects were noted on cardiac arrhythmias<sup>29</sup>.

The evidence suggests that L-carnitine deficiency is not the primary cause of most cases of canine DCM but it could occur secondary to other genetic or acquired abnormalities in approximately 40% of canine cases<sup>1,30</sup>.

As in most cases the primary cause of DCM can not be established and as myocardial L-carnitine deficiency can not be surely confirmed by blood examination but only by endomyocardial biopsy, it is a matter of discussion whether oral supplementation with L-carnitine should be given beside conventional therapy in dog with DCM, or not.

In three recently published papers, the percentage of survival of dogs affected from overt DCM at 1 year from the diagnosis was 37.5%<sup>31</sup>, 17.5%<sup>32</sup> e 12%<sup>23</sup>, respectively. Lifespan dramatically decreases in Doberman Pinscher, where a mean survival time of 9.5 weeks has been reported after the occurrence of an episode of pulmonary edema<sup>33</sup>. According to Tidholm et al.<sup>32,1997</sup>, the worst prognostic factors are the young age, followed by the presence of ascites and dyspnea. According to Monnet et al.<sup>31,1995</sup>, pleural effusion and pulmonary oedema are the major negative prognostic elements. According to Calvert et al.<sup>33,1997</sup>, in Doberman Pinschers atrial fibrillation is associated with a shorter time of survival. According to Borgarelli et al.<sup>23,1998</sup>, major negative prognostic factors are the peak velocity of mitral regurgitation (MR) (lower chance of survival for dogs with MR < 4 m/sec as compared to dogs with MR > 4 m/sec: 54% vs 23% at 6 months; 31% vs. 15% at 1 year) and end-systolic left ventricular index (ESV-I) (the cumulative chance surviving at 12 months was 36% in dogs with ESV-I < 140 ml/m<sup>2</sup> and 1% in dogs with ESV-I > 140 ml/m<sup>2</sup>).

In our experience, reported in this paper, affected dogs are still healthy at 2 year and 7 months from the diagnosis of DCM and the progression of the disease appears slowed down, as attested by the only slight variations in echocardiographic para-meters of systolic and diastolic function. Moreover, no dog has by now shown overt clinical signs of DCM, in spite of the young age and the presence of atrial fibrillation.

In these dogs oral L-carnitine has been administered without a preliminary evaluation of blood or byoptic endomyocardial carnitine contents. Moreover, supplementation has been associated with standard therapy of the disease based on the administration of ACE-inhibitors and anti-arrhythmic drugs, so it could be difficult to attribute the relative efficacy of L-carnitine integration on the course of the disease.

However, described cases have shown a better clinical course of the disease, as compared with the prognosis of DCM reported for dogs in recent literature. No objective improvement of cardiac function has been noticed in serial echocardiographic examinations, but the progression of the disease seems slowed down with reference to normal clinical history of DCM in absence of oral L-carnitine therapy.

## CONCLUSION

The lack of an apparent univocal cause of DCM in the dog makes prevention and treatment of the disease a challenge for the clinician. In most cases, as it is impossible to demonstrate the initiating event causing DCM, only a symptomatic treatment is allowed, but the progression of the disease can not be avoided.

Ideally, carnitine supplementation should be instituted only if myocardial carnitine deficiency is certainly documented. Unfortunately, endomyocardial biopsy is a technique difficult to perform, invasive and hazardous. Moreover, plasma concentration of L-carnitine is an insensitive indicator of myocardial deficiency.

According to available statistical survey, at least 40% of dogs with heart failure secondary to DCM seems to have also a L-carnitine deficiency in association to other congenital or acquired defects. Probably, the most part of these dogs could take advantage from L-carnitine supplementation.

It is difficult to state if L-carnitine supplementation could be useful in all Great Danes with DCM or if this should be considered an isolated case. However, according to our observations, even in lack of diagnostic confirmation of endomyocardial carnitine deficiency, oral L-carnitine therapy could be recommended in young dogs with familial CDM and with highly motivated clients who wish to pursue every treatment avenue.

Parole chiave: cane, Alano, cardiomiopatia dilatativa, L-carnitina, terapia

Key words: dog, Great Dane, dilated cardiomyopathy, L-carnitine, therapy

Riassunto - Vengono descritti due casi di cardiomiopatia dilatativa in cani di razza Alano appartenenti alla stessa cucciolata e con anamnesi familiare di morte improvvisa. Il decorso clinico viene discusso alla luce della terapia adottata, con particolare riferimento alla somministrazione orale di L-carnitina.

Summary - Authors describe two cases of dilated cardiomyopathy in Great Danes belonging to the same litter and with a familial history of sudden death. The clinical course of the disease is discussed on the basis of given therapy, with particular reference to oral L-carnitine administration.

## REFERENCES

- 1) Sisson D.D., Thomas W.P., Keene B.W.: Primary myocardial disease in the dog. In Ettinger S.J., Feldman E.C. (Eds.): Textbook of Veterinary Internal Medicine, 5th Edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 2000
- 2) Lord P.F.: Left ventricular diastolic stiffness in dogs with congestive cardiomyopathy and volume overload. Am. J. Vet. Res., 37, 953, 1976
- 3) Ettinger S., Bolton G., Lord P.: Idiopathic cardiomyopathy in the dog. J. Am. Vet. Med. Assoc., 156, 1225, 1970
- 4) Staaden R.V.: Cardiomyopathy of English Cocker Spaniels. J.A.V.M.A., 178, 1289, 1981
- 5) Keene B.W., Panciera D.P., Atkins C.E.: Myocardial L-carnitine deficiency in a family of dogs with dilated cardiomyopathy. J.A.V.M.A., 198, 647, 1991
- 6) Freeman L.M. et al.: Idiopathic dilated cardiomyopathy in dalmatians: nine cases (1990-1995). J.A.V.M.A., 209, 1592, 1996
- 7) Calvert C.A., Chapman W.L., Toal R.L.: Congestive cardiomyopathy in Doberman Pinscher dogs. J.A.V.M.A., 181, 598, 1982
- 8) Tidholm A., Jonsson L.: Dilated cardiomyopathy in the Newfoundland: a study of 37 cases (1983-1994). J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 32, 465, 1996

- 9) Kittelson M.D., Keene B., Pion P.D. et al.: Results of the multicenter spaniel trial (MUST): taurine and carnitine-responsive dilated cardiomyopathy in American Cocker Spaniels with decreased plasma taurine concentration. *J. Vet. Int. Med.*, 11, 204, 1997
- 10) Wotton P.R.: Dilated cardiomyopathy (DCM) in a family of Boxers and its possible resemblance to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) in humans. *Proceedings 8th ESVIM Congress, Vienna*, 67, 1998
- 11) Limas C.J., Goldenberg I.F., Limas C.: Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation Research*, 64, 97, 1989
- 12) Schultheiss H.P., Bolte H.D.: Immunological analysis of auto-antibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 17, 603, 1985
- 13) Olson T.M., Michels V.V., Thibodeau S.N. et al.: Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science*, 280, 750, 1998
- 14) Sandusky G.E., Cho D.Y.: Congestive cardiomyopathy in a dog associated with pregnancy. *Cornell Vet.*, 74, 60, 1984
- 15) Moise N.S.: Duchenne's cardiomyopathy in a canine model. *Proceedings 8th Annual Veterinary Medical Forum*, 897, 1990
- 16) Meurs K.M. et al.: Canine models of familial dilated cardiomyopathy. *Proceedings ACVIM*, 228, 1996
- 17) Cobb M.A. et al.: Evidence for genetic involvement in dilated cardiomyopathy in the Irish Wolfhound. *Proceedings BSAVA*, 215, 1996
- 18) Dambach D.M. et al.: Familial dilated cardiomyopathy of young Portuguese water dogs. *J. Vet. Int. Med.*, 13, 65, 1999
- 19) Dukes Mc Ewan J.: The genetics of dilated cardiomyopathy in Newfoundland dogs. *Proceedings 9th ESVIM Congress, Perugia*, 60, 1999
- 20) Thomas W.P., Gaber C.E., Jacobs G.J., Kaplan P.M., Lombard C.W., Moise N.S., Moses B.L.: Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 35 (3), 173, 1994
- 21) De Majo M., Masucci M., Pantano V.: Misurazioni ecocardiografiche in cani di razza Alano Tedesco: valori normali. *Atti S.I.S.Vet.*, 51, 591, 1997
- 22) Tarducci A., Borgarelli M., Bussadori C., D'Angelo A., Ru G., Dotta U.: Valori ecocardiografici negli Alani normali. *Atti S.I.S.Vet.*, 51, 593, 1997
- 23) Borgarelli M., Tarducci A., Santilli R.A., Priano L.: Fattori prognostici ecocardiografici ed eco Doppler in cani con miocardiopatia dilatativa. *Atti S.I.S.Vet.*, 52, 233, 1998
- 24) Keene B.W., Kittleson M.D., Rush J.E.: Myocardial carnitine deficiency associated with dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3, 126, 1989
- 25) Gilbert E.F.: Carnitine deficiency. *Pathology*, 17, 161, 1985
- 26) Keene B.W.: L-carnitine deficiency in canine dilated cardiomyopathy. In Kirk R.W., Bonagura J.D. (Eds.): *Kirk's Current Veterinary Therapy*, XI, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 780, 1992
- 27) Keene B.W.: L-carnitine supplementation in the therapy of canine dilated cardiomyopathy. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, 21, 1005, 1991
- 28) Scholte H.R.: The role of the carnitine system in myocardial fatty acid oxidation: carnitine deficiency, failing mitochondria and cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*, 82 (Suppl. 11), 63, 1987
- 29) Costa N.D., Labuc R.H.: Case report: efficacy of oral carnitine therapy for dilated cardiomyopathy in Boxer dogs. *J. Nutr.*, 124, 268, 1994
- 30) Keene B.W. et al.: Frequency of myocardial carnitine deficiency associated with spontaneous canine dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the 6th Annual Veterinary Medical Forum*, 757, 1988
- 31) Monnet E., Orton C., Salman M. et al.: Idiopathic dilated cardiomyopathy in dogs: survival and prognostic indicators. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9, 12, 1995
- 32) Tidholm A., Svensson H., Sylvé C.: Survival and prognostic factors in 189 dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of American Animal Hospital Association*, 33, 544, 1997
- 33) Calvert C.A., Pickus C.W., Jacobs G.J. et al.: Signalement, survival and prognostic factors in Doberman Pinschers with end-stage cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11, 323, 1997

# QUADRI LESIVI POLMONARI IN CORSO DI MANGANISMO ALIMENTARE NEL CONIGLIO

LUNG LESIONS DURING MANGANESE DIET SUPPLEMENTATION IN THE RABBIT

Pinotti G., Luppi A., Cantoni A., Di Lecce R.

*Istituto di Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma - e-mail: apvet@unipr.it*

## **PREMESSA**

La letteratura scientifica non offre, per ora, indicazioni complete circa il fabbisogno in manganese negli animali allevati in produzione zootecnica. Questo oligoelemento viene considerato un componente indispensabile per l'organismo animale e alla sua equilibrata presenza nella dieta si attribuiscono insostituibili compiti nutritivi, utili in particolare, all'estrinsecazione delle attitudini funzionali e produttive degli animali, riproduzione compresa.

Fino ad una decina di anni fa le segnalazioni di episodi di manganismo erano piuttosto rare ed il manganese introdotto in eccesso con la razione, soprattutto in conseguenza ad errori di formulazione del complesso vitaminico ed oligominerale, e/o con l'acqua di bevanda, si riteneva non in grado di determinare fenomeni di tossicosi, soprattutto in rapporto alle note difficoltà che il metallo incontra nell'assorbimento da parte dell'organismo.

In questi ultimi anni tuttavia i casi di intossicazione, spontanea o sperimentale, da manganese, vengono sempre più frequentemente riscontrati negli animali e nell'uomo e la letteratura bibliografica si arricchisce sempre più di nuovi contributi (1, 7, 9, 11, 16).

Sulla base di quanto premesso ci è parso opportuno approfondire ed ampliare le nostre conoscenze sugli effetti di un iperdosaggio di manganese nell'acqua di bevanda di conigli, per verificarne eventuali alterazioni morfofunzionali.

Il manganese è l'elemento numero 25 della tavola periodica, appartiene al gruppo VII-A e assieme a titanio, vanadio, cromo, nickel e rame fa parte degli elementi di transizione.. Molti di questi elementi svolgono funzioni essenziali nei sistemi biologici.

Allo stato elementare si presenta come un metallo di colore grigio-biancastro e lucente; ha una reattività abbastanza elevata riconducibile per lo più alla varietà degli stati di ossidazione in cui può trovarsi e che vanno da -1 a +7, con maggiore stabilità quando ha valenza +2.

Il manganese è relativamente abbondante in natura e le sue concentrazioni nel suolo e nelle acque dipendono dalle caratteristiche geotermiche del suolo, dall'attività di microrganismi e di piante e dalle trasformazioni ambientali, tutti fattori in grado di determinare una maggiore o minore solubilizzazione del manganese dai minerali nei quali si trova.

## **Utilizzazioni**

L'impiego di manganese è noto fin dai tempi antichi quando veniva utilizzato soprattutto nella fabbricazione del vetro. I Romani e gli Egiziani lo impiegavano sia per decolorare il vetro sia per dare tinte rosa, viola o nere.

Tuttavia solo dall'inizio del XX secolo esso ha trovato diverse ed importanti applicazioni industriali, soprattutto nella produzione dell'acciaio, dell'alluminio, del magnesio e della ghisa; forma inoltre composti organometallici come il metil-ciclopentadienil manganese tricarbonile ( $\text{CH}_3\text{C}_5\text{H}_4\text{Mn}(\text{CO})_3$ ), più conosciuto come MMT, utilizzato quale additivo negli oli combustibili e come agente antidetonante nelle benzine (in sostituzione al piombo tetraetile e tetrametile).

Derivati organici del manganese sono impiegati come fungicidi: etilen bis-ditiocarbammato (Maneb) e l'analogo con addizione di rame e di zinco (Mancozeb).

### ***Manganese nell'acqua***

Il manganese si ritrova naturalmente presente sia nelle acque superficiali sia nelle acque di falda. La solubilità dei composti del manganese è fortemente influenzata dal pH e dal potenziale di ossidoriduzione; nei terreni acidi i sali di manganese vengono facilmente solubilizzati ed il manganese può circolare nelle acque sotterranee.

Il DPR n° 236 del 24/5/88, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, stabilisce la concentrazione massima di manganese nell'acqua potabile di 0,05 mg/l ed il valore guida di 0,02 mg/l. Con decreto del 14/7/88 il Ministero della Sanità, di concerto con il Ministero dell'Ambiente, ha derogato il valore di 0,05 mg/l al valore massimo ammissibile di 0,2 mg/l di manganese nell'acqua potabile (4).

L'OMS ha definito il valore di linea guida di 0,1 mg/l sulla base non tanto delle proprietà tossicologiche del manganese quanto sugli effetti indesiderabili che questo elemento produce nell'acqua potabile. Il manganese infatti determina alterazione delle caratteristiche organolettiche dell'acqua quali sapore indesiderabile e torbidità (4).

Dai dati relativi ai livelli di manganese nelle risorse idropotabili in Italia si desume che, in quasi tutte le regioni, vi sono comuni interessati da acqua potabile con valori di manganese superiori a quelli stabiliti dalla normativa vigente. Nelle Marche e più precisamente in alcuni comuni della provincia di Pesaro, si sono riscontrati livelli piuttosto elevati di manganese nelle acque potabili pari a 10 mg/l, riconducibili alla natura idrogeologica del terreno (4).

### ***Manganese negli alimenti***

Negli alimenti la concentrazione di manganese può variare secondo il livello e della disponibilità dell'elemento nel suolo, nell'acqua ed in relazione all'impiego di sostanze chimiche in agricoltura. I maggiori contenuti in manganese si rinvencono nei cereali, nelle crusche, nelle nocciole e nelle foglie di tè. E' da notare però che tra i cereali il mais ha una bassa concentrazione di manganese. Livelli inferiori si trovano nel latte, nei prodotti caseari, nel pesce, nelle uova e livelli ancor più bassi si hanno nelle carni (1, 12).

### ***Assorbimento***

L'elemento viene assorbito dall'organismo sia per inalazione sia per ingestione. Relativamente ai meccanismi che presiedono all'assorbimento del manganese introdotto nell'organismo per ingestione, ancora poco si conosce. In vitro è stato dimostrato che vi sono fenomeni di trasporto attivo attraverso il duodeno e l'ileo.

L'assorbimento nel tratto gastrointestinale è sotto stretto controllo omeostatico e la quantità di manganese assorbita dipende e dalla quota ingerita e

dalla concentrazione del metallo nei tessuti (1).

Il calcio e la carenza di ferro favoriscono l'assorbimento gastroenterico di manganese.

Sia per l'uomo sia per gli animali, è stata stimata una percentuale di assorbimento gastrointestinale di manganese attorno al 2,5-5,5% (1).

### ***Funzioni biologiche e stati di carenza***

Il manganese è un elemento essenziale, importante per lo svolgimento di alcune funzioni biologiche.

In qualità di cofattore dissociabile, partecipa in diverse attività enzimatiche quali idrossilasi, chinasi, decarbossilasi e transferasi; è anche il costituente di una metalloproteina, chiamata glutammina sintetasi, presente nei neuroni e a questa è correlato l'80% del manganese presente nell'encefalo.

Il manganese è anche un componente dell'enzima superossidodismutasi, importante per l'eliminazione dei radicali liberi (1).

Un ruolo di primaria importanza è svolto dal manganese nella formazione del tessuto osseo e nella sintesi del condroitinsolfato. Una carenza di manganese causa, infatti, una minor sintesi dei proteoglicani, con modificazioni qualitative dei proteoglicani stessi nella cartilagine di accrescimento epifisaria. La carenza di manganese causa nei polli, in associazione ad una carenza di Zn e di altri fattori quali colina, biotina, niacina, acido folico e vitamina B6, un'alterazione scheletrica nota come perosi, che colpisce specialmente il pollo giovane, che manifesta zoppicatura, deambulazione impossibile e condrodistrofia, soprattutto a livello tibio-metatarsico (5).

Oltre ad alterazioni scheletriche, la deficienza di manganese può provocare anche sterilità, mortalità neonatale, perdita di peso, dermatiti e nausea in varie specie (6).

E' stata ipotizzata anche una correlazione tra metabolismo dei carboidrati e metallo: in questo caso, ad una carenza di manganese, conseguirebbero anomalie nel metabolismo dei carboidrati, riconducibili ad un'anomala produzione di insulina (15).

### ***Tossicodinamica***

Gli effetti tossici conseguenti alla esposizione al manganese, presentano variazioni secondo la forma chimica del metallo (1) e della via di assunzione. Se ingerito, il manganese presenta una bassa tossicità che diviene maggiore quando l'oligoelemento viene inalato, determinando disturbi di ordine neurologico (disfunzioni extrapiramidali e sintomatologia neuropsichiatrica), respiratorio e riproduttivo.

La tossicità del manganese è strettamente condizionata dalla forma chimica del metallo (1).

### ***FINALITA' DELLA RICERCA***

E' noto che in alcuni pozzi della provincia di Cremona, utilizzati per l'approvvigionamento idrico della popolazione locale, vi sono livelli di manganese superiori alla concentrazione massima stabilita per l'acqua potabile di 0,05 mg/l, derogata ad un valore massimo ammissibile di 0,2 mg/l.

Altrettanto noto che la maggior parte degli allevamenti di animali da reddito di tale comprensorio si vedono costretti ad attingere acqua per gli animali da pozzi con livelli di manganese piuttosto elevati e privi di impianti di demanganizzazione. E' importante segnalare che molto spesso le aziende

agricole della zona dispongono di sistemi di irrigazione (pivot) delle coltivazioni con acque di falda, che possono essere particolarmente ricche di manganese e pertanto il metallo si potrebbe concentrare nei vegetali utilizzati per l'alimentazione degli animali.

Sulla base di questi presupposti, ci è parso opportuno dare inizio ad una serie di indagini per valutare se una discreta quantità di manganese ingerita per un periodo prolungato di tempo dagli animali della zona potesse evocare, in questi ultimi, alterazioni comportamentali e morfofunzionali e non ultimo lasciare residui del metallo nelle carni, con possibili implicazioni morbose nell'uomo che si nutre di tali derrate.

In particolare con le nostre indagini si è inteso valutare gli aspetti clinico-funzionali e gli eventuali effetti alterativi nei principali organi di conigli, la cui dieta conteneva dosi suppletive di manganese solfato nell'acqua di bevanda, in comparazione con un gruppo di conigli di controllo la cui acqua non era addizionata di sali di tale oligoelemento.

### **MATERIALI e METODI di RICERCA**

Per la nostra indagine sono stati impiegati n°15 conigli (8 maschi e 7 femmine) derivati dall'incrocio di soggetti di razza Bianca di Nuova Zelanda per soggetti di razza Californiana. Prelevati dall'allevamento di origine all'età di circa 50 giorni, sono stati sottoposti, per una settimana, ad un periodo di adattamento ambientale e successivamente ripartiti, con metodo casuale, in 2 gruppi:

. gruppo A n°7 conigli di controllo;

. gruppo B n°8 conigli la cui acqua di bevanda è stata addizionata con 5 mg/l di manganese come elemento sotto forma di manganese solfato monoidrato.

I conigli del gruppo di controllo sono stati abbeverati con acqua di pozzo con concentrazione di elemento pari a 0,037 mg/l, acqua che, addizionata di manganese solfato (5mg/l di manganese come elemento), ha rappresentato la bevanda per i conigli del gruppo B.

A tutti i conigli l'acqua è stata somministrata *ad libitum*; la soluzione con l'apposita concentrazione di manganese veniva preparata periodicamente ogni tre giorni.

Per quanto riguarda l'alimentazione, a tutti i conigli dei due gruppi, è stato somministrato *ad libitum*, per tutta la durata della prova, pari a 135 giorni, un mangime composto integrato specifico per conigli contenente 40 mg/Kg di manganese come elemento.

Nel corso della prova sono stati registrati i seguenti dati:

. peso iniziale e peso finale di ogni singolo coniglio;

. consumo medio di acqua per soggetto e per gruppo;

. consumo medio di mangime per soggetto e per gruppo.

Nell'arco dei 135 giorni di trattamento sono deceduti tre animali (due di controllo e uno del gruppo B) in seguito a processi flogistici polmonari, diagnosticati come broncopolmonite mucopurulenta da *Pasteurella multocida*.

Al termine dell'esperimento, da ciascun coniglio, sono stati effettuati prelievi di sangue per eseguire opportune indagini ematochimiche. Successivamente i soggetti sono stati sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico, effettuando prelievi dei seguenti organi da sottoporre a valutazione istopatologica: polmone, cuore, fegato, rene, ghiandola surrenale, stomaco, intestino (duodeno, ileo e cieco), milza e pancreas. Sono stati prelevati anche frammenti di cervello, cervelletto, gonadi e porzioni di muscolo bicipite femorale, che sono stati oggetto di studio per un'ulteriore nota.

I frammenti di organi e/o tessuti prelevati sono stati prontamente fissati in formalina calcica al 10% per allestire successivamente sezioni istologiche, opportunamente colorate con ematossilina-eosina, Van Gieson e P.A.S. reazione. Sui campioni di sangue sono stati determinati alcuni parametri (proteine totali, albumine e globuline, glucosio, creatinina, lipidi totali, colesterolo totale e HDL, fosfolipidi, NEFA, trigliceridi, GOT e GPT, calcio, fosforo inorganico, sodio, potassio, ferro, rame, zinco e manganese) seguendo le tecniche indicate in precedenti esperienze dal Prof. Ubaldi dell'Istituto di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale Veterinaria dell'Università di Parma, che qui sentitamente ringraziamo per la disponibilità offerta (14).

## **RISULTATI**

### Rilievi clinici

Sul piano clinico-comportamentale gli animali trattati non hanno manifestato alcun segno particolare che desse adito all'interpretazione di processi morbosi in atto, né diversità di atteggiamento rispetto ai soggetti di controllo.

Poiché gli animali sono stati stabulati in gabbie singole, non è stato possibile osservare movimenti particolari di andatura e quindi rilevare eventuali alterazioni in proposito.

### Incrementi ponderali

Dai dati rilevati si è potuto constatare che i conigli del gruppo B hanno presentato un incremento ponderale medio inferiore rispetto ai conigli di controllo e più precisamente:

.Kg 1,70 incremento ponderale medio/135gg dei conigli trattati (gruppo B);

.Kg 1,82 incremento ponderale medio/135gg dei conigli di controllo (gruppo A).

### Consumi idrico e di mangime

Ad ognuno dei due gruppi (A e B) è stato messo a disposizione un contenitore per il rifornimento idrico che veniva riempito ogni tre giorni.

E' stato interessante considerare il dato relativo al consumo medio di acqua/capo/giorno pari a ml 420 nei conigli del gruppo B (5 mg/l di Mn nell'acqua), consumo risultato superiore a quello manifestato dai conigli del gruppo A, corrispondente a ml 380.

Sono stati infine calcolati i consumi di mangime espressi come consumo medio di mangime/capo/giorno:

. Gruppo A g 186,7

. Gruppo B g 194,15

Da notare il peggiore indice di conversione denunciato dai conigli trattati (gruppo B) rispetto ai soggetti di controllo.

#### Valutazioni ematochimiche

Per quanto attiene le valutazioni ematochimiche, i dati ottenuti, hanno rivelato un leggero decremento dei valori medi di proteine totali, albumine e globuline nei conigli trattati rispetto a quelli di controllo.

Sempre nell'ambito dei due gruppi, i livelli di glucosio come di creatinina, non hanno mostrato significative variazioni nei valori medi.

I parametri indicativi del metabolismo lipidico, hanno presentato un comportamento piuttosto omogeneo tra i conigli dei due gruppi per quanto attiene i livelli di NEFA e colesterolo (totale e HDL), mentre si è rinvenuta una certa tendenza, non statisticamente significativa, all'incremento dei livelli relativi a lipidi totali, fosfolipidi e trigliceridi, nei soggetti trattati con manganese, rispetto agli animali di controllo.

L'attività enzimatica saggiata di GOT e GPT, ha dato modesti incrementi nei soggetti del gruppo B rispetto a quelli del gruppo A.

Nell'ambito degli oligoelementi valutati, non si sono osservate variazioni significative nei livelli di calcemia, fosforemia, natriemia, potassiemia, sideremia, cupremia e zinchemia. Per contro, i livelli plasmatici di manganese, hanno manifestato un significativo incremento nei soggetti trattati (valore medio  $\mu\text{g/l}$  30,1), rispetto ai conigli di controllo (valore medio  $\mu\text{g/l}$  21,1).

#### **Valutazione necroscopica**

Alla valutazione macroscopica esterna, come in sezione di taglio, in nessuno dei conigli dei due gruppi si sono riscontrate alterazioni morfologiche degne di segnalazione a carico degli organi e dei tessuti esaminati.

#### *Valutazioni istologiche*

##### **Polmone**

Da una valutazione d'insieme dei vari preparati eseguiti su numerose sezioni a livello polmonare, tra conigli del gruppo di controllo e conigli trattati con manganese solfato, si sono rilevati reperti quanto mai interessanti.

Nel contesto di una fine e delicata struttura del parenchima polmonare, con setti e cavità alveolari senza alterazioni particolarmente dimostrative e sostanziali tra soggetti controllo e trattati, reperto saliente assai significativo nei soggetti del gruppo B è stato il riscontro di lesioni piuttosto marcate a carico della componente vasale arteriosa di medio e piccolo calibro; le lesioni sono state identificate come un fenomeno regressivo, ipertrofico e iperplastico, prevalentemente disposto in modo concentrico rispetto all'asse del vaso, responsabile di un aumento più che raddoppiato dello spessore della tonaca elastico muscolare delle piccole e medie arterie.

Da segnalare, infine, che i vasi venosi sono apparsi non interessati da processi di sofferenza vasale.

## ***Fegato***

Sotto l'aspetto istologico si sono rinvenute, nell'ambito dei soggetti trattati, in comparazione con i conigli di controllo, lievi alterazioni a livello della struttura epatica. Si è notata infatti, nei soggetti trattati, una maggior tendenza a processi di sofferenza cellulare caratterizzati da rigonfiamento torbido ed epatociti infarciti di microvacuoli citoplasmatici, sia alla periferia sia in prossimità del nucleo.

Le cellule di Kupffer, nell'ambito dei vari campioni esaminati, non hanno mai mostrato processi di ipertrofia, né di iperplasia; solo pochi di questi elementi sono apparsi impegnati da quadri di eritrofagia.

Anche le vie biliari intraepatiche, come i vasi sanguigni, sono risultati indenni da lesioni.

## ***Rene***

Sul piano istologico non si sono osservate, globalmente, significative difformità morfostrutturali tra gli animali dei due gruppi presi in considerazione. Nei conigli trattati si sono rinvenuti più frequentemente glomeruli aumentati di volume, non interessati da alterazioni flogistiche, con anse glomerulari spesso mal delimitabili; discreta è stata anche la degenerazione albuminoidea degli epitelii tubulari nei primi tratti del nefrone, associata a variazioni della tingibilità nucleare. In tutti i conigli in esame, la componente vascolare non è parsa coinvolta da processi reattivi o regressivi. Nei soggetti trattati la tonaca elastica delle arteriole afferenti non ha manifestato significativi segni di ipertrofia e iperplasia, rispetto a quella degli animali di controllo.

## ***Milza***

All'esame microscopico la milza ha presentato qualche differenza tra soggetti trattati e conigli di controllo, soprattutto a livello di polpa bianca.

I follicoli linfatici di Malpighi, in tutti i soggetti intossicati, sono parsi più numerosi ed aumentati di volume. Nella maggioranza di questi follicoli, attorno all'arteria centrofollicolare, si sono addensati linfociti maturi, nonché qualche elemento linfoblastico, mentre alla periferia si sono notate molte cellule in preda a fenomeni degenerativi ed anche necrotici di cariolisi e carioressi. In queste zone, quasi sempre, si sono associati riscontri di iperplasia delle cellule istiocitarie.

Nella polpa rossa, nell'ambito dei due gruppi di conigli, non si sono rilevate significative differenze morfostrutturali sia a livello di seni sia di cordoni pulpari. Nella norma si è rivelata l'attività emocateretica e contenuta la presenza di pigmento emosiderinico.

Qua e là si sono rinvenuti elementi eosinofili granulocitari, sparsi o raccolti in piccoli aggregati.

La capsula, al pari delle trabecole, non ha mostrato particolari modificazioni morfostrutturali tra soggetti esaminati sia di controllo sia intossicati.

Nell'ambito dei conigli trattati le arterie centrofollicolari, come quelle di calibro maggiore decorrenti dalle trabecole, non sono sembrate interessate da particolari variazioni dello spessore della loro componente elastico-muscolare, rispetto a quelle del gruppo controllo.

## ***Cuore***

I reperti istologici miocardici dei conigli dei due gruppi sperimentali, non hanno mostrato particolari alterazioni o significative variazioni morfostrutturali.

Solo in alcuni soggetti trattati, nell'ambito della normale struttura fibrillare, sono apparsi segni di sofferenza miocardica con maggior frammentazione, aspetto granulare, quadri di rigonfiamento, contorni irregolari e perdita del normale aspetto morfologico.

I capillari sanguigni sono parsi sempre nella piena normalità; non segni di congestione, né di dilatazione e ancor meno riscontri di ingrossamento perivascolare.

*Altri organi valutati*

Gli esami istopatologici condotti a carico di pancreas, surrene, stomaco, duodeno, ileo, cieco, gonadi e muscolo bicipite femorale, non hanno rivelato particolari modificazioni morfostrutturali nell'ambito dei due gruppi di conigli presi in considerazione.

### **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE**

Dall'insieme delle risultanze finora conseguite, aggiungendo l'acqua di bevanda di conigli con solfato di manganese monoidrato alla dose di 5 mg di metallo/l, acqua somministrata *ad libitum* per 135 giorni, è emerso, quanto meno nelle condizioni sperimentali in cui abbiamo operato, che l'elemento evoca, oltre ad un forte incremento della manganesemia, anche alterazioni dell'assetto morfostrutturale della componente arteriosa polmonare di medio e piccolo calibro, nei soggetti trattati rispetto agli animali di controllo (figure 1 e 2).

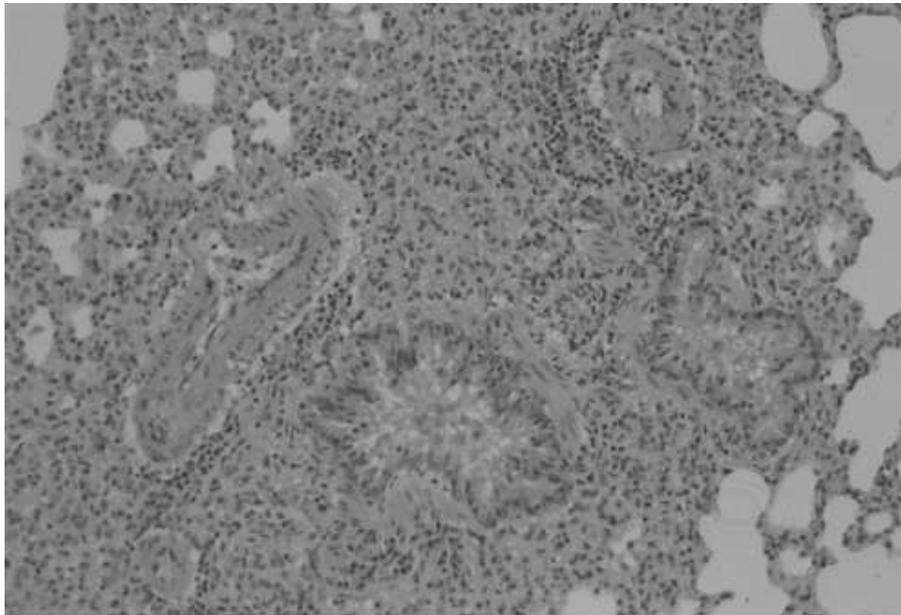


Figura n° 1. Sezione istologica di polmone di coniglio gruppo A (controllo). Si rileva normostruttura parenchimale, delle strutture broncoalveolari e vascoloematiche, (E-E, 200x).

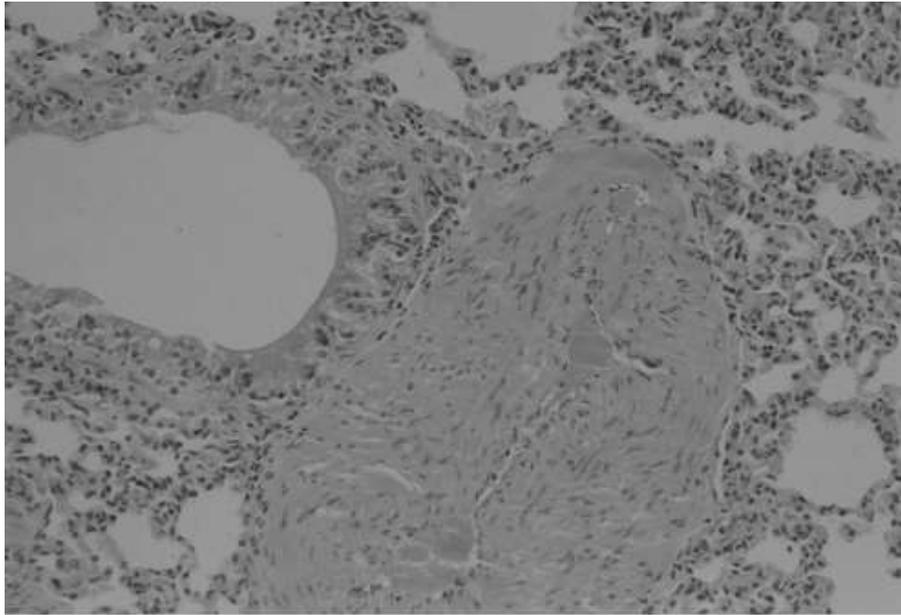


Figura n° 2. Sezione istologica di polmone di coniglio gruppo B (5 mg/l di Mn nell'acqua di bevanda). Si rileva ipertrofia della tonaca muscolare dei vasi arteriosi e conseguente riduzione del lume vasale, (E-E, 200X).

Il manganese inorganico, ritenuto finora di scarsa tossicità per l'organismo animale (6), è parso in grado, quindi, di provocare quadri lesivi se introdotto in eccesso.

Le modificazioni ematochimiche e le lesioni istologiche da noi rilevate, soprattutto a carico dei vasi arteriosi in ambito polmonare, conducono a conclusioni che mal si accordano con quelle formulate da altri ricercatori (6, 18) che escludono che il manganese, anche se somministrato in lieve eccesso nella razione quotidiana, possa evocare lesioni organico-funzionali (7, 9).

Non abbiamo informazioni precise sul meccanismo intimo dell'oligoelemento o attraverso quali mediazioni enzimatiche tali azioni siano particolarmente marcate a livello vasale nella compagine elastico-muscolare, anche perché, dalla bibliografia consultata, non esistono riscontri simili al riguardo.

L'aspetto più significativo della nostra osservazione, è indubbiamente rappresentato dal processo patologico che ha colpito i vasi arteriosi polmonari di medio e di piccolo calibro di tutti i conigli trattati con manganese solfato, processo rappresentato da alterazioni di tipo ipertrofico-iperplastico della tonaca elastico-muscolare, mentre nei soggetti di controllo, senza aggiunta supplementiva dell'elemento minerale nell'acqua da bere, siffatti riscontri non hanno avuto luogo. E' opportuno ricordare che tale affezione non ha determinato negli animali in vita alcun quadro sintomatologico appariscente, né si sono riscontrati in letteratura segnalazioni in merito.

L'inquadramento patogenetico derivante dalle indagini da noi esperite non appare pertanto agevole, anche perché il coinvolgimento arterioso è parso abbastanza diffuso a livello polmonare, mentre a livello dei vasi di altri organi (rene, milza, fegato, cuore, surrene, pancreas, ecc.) tali riscontri non

sono sembrati particolarmente evidenti.

Offrire un'interpretazione patogenetica del processo morboso ci sembra speculativo, tuttavia, considerato che si tratta di ipotesi, ad onore del vero suffragate da riscontri istopatologici, riguardanti i soli vasi arteriosi polmonari di medio e piccolo calibro, vorremmo prospettare:

1. il manganese inorganico, somministrato in eccesso per un periodo prolungato nell'acqua di bevanda di conigli, indurrebbe processi arteropatici, a livello polmonare, perché in grado di sostenere e predisporre in forma diretta o indiretta fenomeni ipertensivi con conseguente reazione iperplastica ed ipertrofica delle miocellule e delle fibre elastiche;
2. il manganese introdotto in eccesso nelle condizioni suddette svolgerebbe un'azione mirata a carico delle componenti tissutali della tonaca media dei vasi arteriosi;
3. il manganese in eccesso potrebbe interferire sui sistemi di controllo delle miocellule arteriolari, innervate dal sistema nervoso simpatico a sua volta governato dai centri vasomotori e predisporre la comparsa dei processi regressivi, da noi riscontrati a livello della tonaca media arteriolare.

Per concludere, sarebbe interessante proporre ulteriori indagini per verificare se queste ipotesi siano attendibili. Si potrebbe sospendere la somministrazione del metallo per 20 o 30 giorni prima del sacrificio dei conigli stessi, in modo da verificare se, somministrando il tossico per un certo periodo, si ottengono riduzioni minimali delle lesioni vasali neoformatesi. La qual cosa ci promettiamo di considerare.

Parole chiave: manganese, coniglio, arteriole, intossicazione.

Key words: manganese, rabbit, arterioles, intoxication.

RIASSUNTO - Gli autori hanno valutato le conseguenze della somministrazione prolungata di manganese solfato monoidrato alla concentrazione di 5 mg di elemento/l nell'acqua di bevanda di conigli, posti in comparazione con soggetti di controllo.

Dalla sperimentazione condotta, gli autori hanno osservato, nei soggetti trattati, processi di ipertrofia e iperplasia della tonaca media dei vasi di piccolo e medio calibro in ambito polmonare; conseguentemente alla osservazione dei quadri su citati, discutono le possibili ipotesi patogenetiche.

SUMMARY - **Introduction:** *manganese poisoning has rarely been reported in the last ten years. Addition of excessive doses of manganese in drinking water and/or feed rations has not been considered detrimental to the animals' health status, especially given the fact that the intestinal tract does not easily absorb manganese salts.*

Our study was aimed at verifying the clinical effects of excessive manganese sulfate supplementation in rabbits and to evaluate histopathological lesions of various organs compared with a group of control rabbits receiving no manganese supplementation.

Materials and methods: fifteen New Zealand White - Californian cross rabbits (7 females and 8 males) were used for the study. The rabbits were 50 days old at the start of the study and were allowed a week to adapt to their surroundings before being randomly divided into two groups:

.group A: 7 control rabbits given well water containing 0.037 mg/l of pure manganese;

.group B: 8 rabbits given the same water as control rabbits supplemented with 5 mg/l of elemental manganese as monohydrate manganese sulfate.

Water was given *ad libitum* and supplemented water was prepared every three days. A commercially prepared rabbit feed, containing 40 mg/kg of pure manganese, was also given *ad libitum*. The experiment lasted 135 days. Several parameters were considered during the experimental period:

.initial and final weight;

.average water intake for each subject in both groups;

.average food intake for each subject in both groups;

During the 135-day period, three rabbits (two controls and one treated) died of purulent pneumonia due to *Pasteurella multocida* infection.

At the end of the trial period, blood samples were taken, the rabbits were euthanized and necropsic examination was carried out. Several organ systems were sampled for histology and included: lungs, heart, liver, kidney, adrenal glands, stomach, small and large intestine, spleen and pancreas. Portions of the brain, gonads and striate muscle were also sampled for another study. Organ samples were immediately fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and sectioned at 6 micron-thickness for the following histological stainings: hematoxylin-eosin, Van Gieson and Periodic Acid Schiff. Blood samples were evaluated for several serum chemistry values (total proteins, albumin, globulins, glucose, creatinin, total lipids, total cholesterol, HDL, phospholipids, NEFA, triglycerides, GOT, GPT, calcium, inorganic phosphorous, sodium, potassium, iron, copper, zinc, manganese) according to protocols described by Prof. Antonio Ubaldi (14) whom the authors thank for his time and cooperation.

## **Results**

Clinical findings: non of the treated animals showed signs of clinical disease associated with manganese supplementation nor did they exhibit any behavioural abnormalities when compared to control rabbits. Due to the fact that the animals were kept in single cages, it was not possible to observe and evaluate any alterations in movement or gait.

Blood chemistry findings: blood samples revealed a slight decrease in total proteins, albumins and globulins in treated animals compared to control groups. Glucose and creatinin levels did not vary within the two groups. Those values associated with lipid metabolism showed no alterations in total cholesterol or NEFA levels, but did present a slight increase in total lipids, phospholipids and triglycerides in treated animals compared to controls. These increases, however, were not statistically significant. Treated animals had slightly higher GOT and GPT values. Non of the evaluated oligoelements showed alterations except for manganese, which was sharply increased in treated animals (30.1 ul/l) compared to control rabbits (21.1 ug/l).

Gross pathology: autopsy findings revealed no differences in gross pathology between the two groups.

## *Histology*

**Lungs:** numerous sections of the lungs of each subject from both groups were examined. Pulmonary parenchyma was comparable between the two groups and did not present any alterations. However, a most interesting finding regarded the small and medium arterioles in the treated group (Picture 2) compared to control (Picture 1). These were affected by a regressive, hypertrophic and hyperplastic phenomena, concentrically situated around the long axis of the vessel, resulting in a nearly doubled thickness of the tunica media. Venous vessels were not affected.

**Liver:** slight differences in hepatic structure were observed in the treated group. There was a greater tendency to find cellular alterations such as torbid swelling and intracellular vacillation both at the periphery and near the nucleus. Microvacuoles were round and transparent. The other components of the liver, such as Kupffer cells, blood vessels and bile ducts, were normal compared to control groups.

**Kidney:** no important differences were noted in the microscopic structure of the kidneys between the two groups. Some kidneys from treated animals showed slight enlargement of glomeruli and albuminoid degeneration of the tubular epithelium. Treated rabbits did not show lesions in vascular structure as well as hypertrophy or hyperplastic phenomena compared to control animals.

**Spleen:** the spleen of treated rabbits presented several alterations compared to control animals. The Malpighi lymphatic follicles were enlarged and

increased in number in the treated group. Around the central arteriole of each follicle, there was a marked lymphocyte infiltration with both mature and immature lymphocytes. Towards the periphery of the follicle, there were numerous degenerated cells, with karyolysis and karyorrhexis. Hyperplastic hystiocytes were also observed in these areas.

However, the red pulp and the capsule were not altered in any significant way in the treated animals compared to control rabbits, except the presence of eosinophilic granulocytes in red pulp in treated subjects.

Centrofollicular arteries and other vascular structures did not show morphological and morphometrical alterations at tunica media level in treated rabbits compared to control ones. **Heart:** histology of the myocardium did not reveal any significant structural modifications between the two groups. In a few of the treated animals, slight changes indicative of myocardial suffering were observed: fragmentation, granular appearance and swelling. Blood capillaries were normal and did not present signs of congestion, dilation or perivascular enlargement.

**Other organs:** histological examination of the other organs sampled at necropsy did not reveal any significant microscopic alteration between treated rabbits and control groups.

Conclusions: the study carried out consisted in administering *ad libitum* for 135 days manganese supplementation of 5 mg of pure manganese per litre of drinking water. We can conclude that the administration of manganese under these experimental conditions can provoke alterations especially in lung arteries and a strong increase in the levels of manganese in the blood.

Inorganic manganese, which has not been considered toxic (6), can cause damage to the organism if given in excess.

The blood chemistry alterations and the histopathological lesions of the arterial bed of the lungs would seem to contradict that which has been proposed by other authors (6, 18) who exclude the possibility that manganese, even in small doses, can provoke organic lesions (7, 9).

However, there is no available reference material with regards to which enzymes are involved in the metabolic activity of the tunica media.

The most interesting finding is undoubtedly the hyperplastic, hypertrophic lesions of the pulmonare arterioles. The tunica media was consistently enlarged in treated animals, while in control groups receiving no manganese supplementation, these lesions were not present. These lesions did not provoke clinical symptoms and there are no references to this effect.

It is not easy to interpret the potential pathogenicity of excessive manganese supplementation, given the lesions observed by us. In fact, the arterial alterations were diffuse in lung, yet were not obvious in other organ systems (kidney, spleen, liver, heart, adrenal gland, pancreas, ecc.). Several hypotheses, based on our results, could be:

1. inorganic manganese in excess could be directly or indirectly responsible for arteriopathies associated with hypertension with resulting hypertrophy/hyperplasia of the tunica media;
2. manganese could target specifically the tunica media and induce alterations ;
3. excessive manganese supplementation could interfere with neural control of arteriolar myocellular components, which are regulated by the sympathetic nervous system.

In conclusion, it would be worthwhile to further investigate these hypotheses. For example, it would be interesting to suspend manganese treatment 20-30 days before sacrificing the animals. In this way, it would be possible to evaluate if the effect of manganese is reversible and if the lesions regress. It is our intention to carry out such studies in the future.

## RINGRAZIAMENTI.

*Rivolgo uno speciale ringraziamento alla Dott.ssa Laura Kramer per il prezioso ed indispensabile aiuto nella traduzione.*

## BIBLIOGRAFIA

- 1 - ALESSIO L., LUCCHINI R., 1996. "Manganese e composti del manganese". Monografia, Università degli Studi di Brescia.
- 2 - BANKS W.J., 1986. "Istologia ed anatomia microscopica veterinaria". 5-7. Piccin.
- 3 - CHANDRA S. V., IMAM Z., 1974. "Effect of manganese on the morphology of the rabbit adrenal cortex", Arch. Hig. Rada, 26: 201-208.
- 4 - DONATI L., DONATI G., FUNARI E., BERETTA ANGISSOLA M., PAGLIASOTTO M., PALUMBO F., PIAZZA F., SALAMANA M., 1989. "Manganese nelle acque destinate al consumo umano in Italia". Acqua-aria, 9: 1047-1050.
- 5 - GUARDA F., MANDELLI G., 1996. "Trattato di anatomia patologica veterinaria", 119-122. UTET, Torino.
- 6 - HIDIROGLOU M., 1979. "Manganese in ruminant nutrition". Canadian journal of animal science, Vol. 59, n° 2: 217-236.
- 7 - KONDAKIS XG., MAKRIS N., LEOTSINIDIS M., PRINOU M., PAPAPETROPOULOS T., 1989. "Possible health effects of high manganese concentration in drinking water", Vol. 44: 175-178.
- 8 - KLAASSEN C.D., 1974. "Biliary excretion of manganese in rats, rabbits and dogs". Toxicology and applied pharmacology, 29: 458-468.
- 9 - LORANGER S., BIBEAU MC., ZAYED J., 1994. "Manganese in drinking water and its contribution to human exposure". Rev. Epidemiol. Sante Publique, Vol. 42: 315-321.
- 10 - NARDELLI M., 1991. "Introduzione alla chimica moderna". 732-737. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- 11 - PINOTTI GIANLUCA, 1999. "Sugli effetti della somministrazione prolungata di manganese solfato nell'acqua di bevanda di conigli. Rilievi ematochimici e riscontri istopatologici. Contributo sperimentale". Tesi di laurea, Università degli Studi di Parma.
- 12 - REILLY C., 1991. "Metal contamination of food", 216-220.
- 13 - SCHEUHAMMER A. M. and CHERIAN M.G., 1981. "The influence of manganese on the distribution of essential trace elements". Toxicology and applied pharmacology, 61: 227-233.
- 14 - UBALDI A., FUSARI A., LAZZARELLI S., MERLI E., BOCCHIA G.P., 1999. "Studio clinico laboratoristico degli effetti dell'avvelenamento idrico da Mn<sup>2+</sup> in conigli in allevamento intensivo". Congresso SISVET, Montecatini 16-18 settembre 1999.
- 15 - VETTORI M. V., 1997. "Modelli in vitro per la valutazione del rischio tossicologico: studio delle relazioni dose-effetto e dose-risposta per composti del manganese".
- 16 - VIEREGGE P., HEINZOW B., KORF G., TEICHERT HM., SCHLEIFENBAUM P., MOSSINGER H.U., 1995. "Long term exposure to manganese in rural well water has no neurological effects", Can. J. Neurol. Sci., Vol. 22: 286-289.
- 17 - WHO, 1984. "Guidelines for drinking water quality", vol. 2: 275-278. Geneva.
- 18 - WHO Working Group, 1981. "Manganese", Environmental Health Criteria, 17: 1-110.

# ISOLATION OF *SALMONELLA* *ENTERICA* SEROTYPE BRANCASTER FROM SLAUGHTERED RABBITS

Bonardi S.(1), Pizzin G.(1),  
Ridolfini R.(2) and Antignano  
G.(2)

(1) *Istituto di Ispezione degli Alimenti di origine animale - Faculty of Veterinary Medicine - University of Parma, Italy.*

(2) *Public Veterinary Service, Italy.*

## Introduction

*Salmonella enterica* infection is well known as one of the most important zoonoses both in industrialized and developing countries. Human outbreaks of salmonellosis due to consumption of meat and meat products are well known, and poultry is by far the most common vehicle of human infection (Tauxe, 1991 ; Varnam and Evans, 1991). Nevertheless, outbreaks of human salmonellosis due to beef, pork and fermented meats such as salami, are rather common (Tauxe, 1991 ; Pontello *et al.*, 1998).

Consumption of rabbit meat is estimated to be 4.5 Kg per person/ *per annum* in Italy (Rio, 1998), *i. e.* much lower if compared with other meats (pork, beef and poultry). Nevertheless the aim of this study was to evaluate the incidence of *Salmonella enterica* asymptomatic intestinal carriers among rabbits slaughtered in two abattoirs of Central Italy, in order to gain more information about the most common *Salmonella* serotypes carried by rabbits and, in case contamination at slaughter occurs, by their carcasses.

## Materials and methods

From March to May 1999, 160 intestinal packs of slaughtered rabbits were collected in two abattoirs of Central Italy (Marche region), which slaughter 70,000 and 300,000 rabbits/ *per annum*, respectively. The rabbits, Californian breed, came from 24 different farms located in the neighbouring regions of Toscana, Marche and Umbria.

The samples were stored at 4° C up to two days and transported to the laboratory at refrigeration temperature. At the laboratory the cecal material was aseptically separated from the intestinal packs and 5 g per sample were transferred in a sterile bag containing 45 ml of Buffered Peptoned Water (BPW, Oxoid Italiana, Garbagnate Milanese, Italy). The pre-enrichment broths were incubated at 37° C for 16 - 20 h. Thereafter a 1 ml-aliquot of the pre-enrichment broths was transferred in 10 ml of Selenite Cystine Broth (Oxoid), and a 0.1 ml-aliquot was transferred in 10 ml of Rappaport-Vassiliadis Broth. The enrichment broths were incubated at 37° C and 42° C for 20 - 24 h, respectively. Selenite Cystine broths were incubated for further 24 h. After incubation, the enrichment broths were streaked onto Brilliant Green Agar (BGA, Oxoid) and XLT-4 Agar (Remel). Solid media were incubated at 37° C for 24 h and examined for the presence of typical colonies resembling Salmonella that are pink on BGA and pink with or without a black centre on XLT-4 Agar. If no suspect colonies were present, the plates were re-incubated at 37° C for further 24 h.

A minimum of five characteristic colonies per plate were selected and streaked onto Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid) to obtain pure culture and well-isolated colonies. TSA plates were incubated at 37°C for 24 h and pure colonies were seeded in Triple Sugar Iron Agar (TSI, Oxoid). After incubation at 37° C overnight, typical Salmonella reactions on TSI are characterized by a yellow butt, a pink slant and blackening of the medium, due to hydrogen sulphide production. TSI suspect cultures were subjected to slide agglutination with a

polivalent Salmonella-antiserum (Biogenetics, Padua, Italy) and agglutinating isolates were further tested for urease activity, indole production and ONPG-activity. Urease, indole, and ONPG-negative cultures were finally tested with API 20 E (bioMérieux, Marcy l' Etoile, France) microsubstrate system for genus identification.

## Results and conclusions

*Salmonella enterica* serotype Brancaster (O somatic antigen : 1, 4, 12, 27; H1 flagellar antigen: z29; H2 flagellar antigen: -) was isolated from one (0.6%) out of 160 cecal material samples. The intestinal carrier was a Californian rabbit bred in Ascoli Piceno province, Marche region.

Another survey about *Salmonella enterica* healthy carriers among slaughtered rabbits in Italy failed to isolate Salmonella strains from the cecal content, although Salmonella Typhimurium and Salmonella Arizonae were isolated from samples of water dripped from washed carcasses (Catellani *et al.*, 1999).

Information about Salmonella Brancaster epidemiology are rather limited. It was isolated in Italy, Toscana region, in 1985 from one human faecal sample collected from food-handlers (Pacini *et al.*, 1994). In 1991 another strain of Salmonella Brancaster was isolated in Toscana region from human samples (Fortin *et al.*, 1994). The CDC annual report about Salmonella serotypes isolated from human samples from 1988 to 1998 in the USA related that only one strain of Salmonella Brancaster had been isolated during the decade, while on the contrary 94,261 strains of Salmonella Typhimurium and 90,128 strains of Salmonella Enteritidis had been isolated in the same period. Salmonella Brancaster is therefore uncommon in the USA. Data from the Danish Veterinary Laboratory of the Ministry of Agriculture, Food and Fisheries of Denmark report that Salmonella Brancaster has time to time been isolated both from pig and cattle herds and

from meat, in particular from beef and pork, but also from turkey meat (Lau Baggesen, 1999, personal communication).

No information about *Salmonella* Brancaster infection in rabbits are available. On the contrary, an outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection in a commercial rabbitry in the UK was reported by Harwood (1989); abortion in does, death of pregnant does, diarrhoea and mortality among fattening rabbits were recorded.

*Salmonella* Typhimurium was isolated from systemic sites of breeding does and fattening rabbits, and also from aborted material. Other *Salmonella* Typhimurium outbreaks in rabbitries occurred in 1992 (Lebastard *et al.*, 1995) and in 1995 (Zanon, 1998) in France and the micro-organism was isolated from the liver and the intestinal content of dead animals. Baloda *et al.* (1983) reported that *Salmonella* Thyphimurium and *Salmonella* Enteritidis produce enterotoxins in the intestinal lumen of rabbits, that lead to diarrhoea.

The isolation of *Salmonella* Brancaster from the intestinal content of a healthy slaughtered rabbit is therefore rather interesting, especially because of the limited data about this *Salmonella enterica* serotype in humans and animals. More information about the epidemiology and pathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Brancaster will be available if further surveys for *Salmonella* are implemented all over the world.

## Acknowledgements

The Authors gratefully acknowledge Mrs. Ida Poli and Mrs. Giuseppina Trentadue of the Istituto di Ispezione degli Alimenti di origine animale for technical support, and Dr. Franco Paterlini of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia - Italy, for *Salmonella* serotyping.

Key words: *Salmonella* Brancaster, rabbits,

slaughterhouse, Italy

Parole chiave: *Salmonella* Brancaster, conigli, macello, Italia

SUMMARY - From March to May 1999, 160 cecal material samples of slaughtered rabbits were examined for the presence of *Salmonella enterica*. The aim of the study was a survey for intestinal carriers which may contribute to meat contamination at slaughter. Sampled rabbits came from 24 farms located in Central Italy and were slaughtered in two different abattoirs. *Salmonella enterica* serotype Brancaster was isolated from one (0.6%) sample. The carrier was a Californian rabbit bred in Marche region (Ascoli Piceno province).

RIASSUNTO - Da Marzo a Maggio 1999 sono stati raccolti 160 pacchetti intestinali di conigli macellati da sottoporre alla ricerca di *Salmonella enterica* nel contenuto del cieco. L'indagine si prefiggeva l'individuazione di eventuali portatori intestinali che avrebbero potuto facilitare la contaminazione delle carni in fase di macellazione. I conigli esaminati, provenienti da 24 allevamenti dell'Italia centrale, sono stati macellati in due macelli diversi. Da un animale (0,6%) è stata isolata *Salmonella enterica* sierotipo Brancaster. L'animale portatore era un coniglio di razza Californiana allevato nelle Marche (provincia di Ascoli Piceno).

## References

- Baloda S.B., Farus A., Krovacek K., Wadstron T. (1983). Cytotoxic enterotoxins and cytotoxin factors produced by *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Toxicon*, 21, 785 - 796.
- Catellani P., Malocco C., Rasetti M. (1999). Possibile ruolo dei conigli allevati come portatori asintomatici di *Salmonella* spp. - Indagini in fase di macellazione. (Possible role of breed rabbits as asymptomatic carriers of *Salmonella* spp. at slaughterhouse). *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie*, LIII, 321-322.
- Fontin G., Sanavio G., Maini C., Giugliano I., Polli A.C. (1993). Isolamento di salmonelle nel triennio 1989-1991 da acque superficiali, coprocolture ed alimenti. *Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio*, 13, (2), 15-24.
- Harwood D. G. (1989). *Salmonella typhimurium* infection in a commercial rabbitry. *The Veterinary Record*, November 25, 554-555.
- Lebastard D., Morisset M.C., Michel F., Rubillard P.,

- Dupont P. (1995). *Salmonella typhimurium* in un allevamento cunicolo intensivo. *Summa*, 7, 55-59.
- Pacini R., Quagli E., Galassi R., Tozzi E., Malloggi L. (1994). Dieci anni di sorveglianza epidemiologica a Livorno (I parte) Studio epidemiologico sulle salmonelle isolate da portatori sani, nell'area livornese, dal 1984 al 1993. *Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio*, 14, (5-6), 9-14.
  - Pontello M., Sodano L., Nastasi A., Mammina C., Astuti M., Domenichini M., Belluzzi G., Soccini E., Silvestri M.G., Gatti M., Gerosa E., Montagna A. (1998). A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Italy. *Epidemiology and Infection*, 120, (3), 209 - 214.
  - Rio P. (1998). La lunga storia del coniglio. *La carne*, 4, 104 - 105.
  - Tauxe R.V. (1991). *Salmonella*: a postmodern pathogen. *Journal of Food Protection*, 54, (7), 563 - 568.
  - Varnam A. H. and Evans M. G. (1991). *Salmonella*. In : Foodborne pathogens. An illustrated text. Eds : Varnam A. H. and Evans M.G. Wolfe Publishing Ltd, Aylesbury, England.
  - Zanon F. (1998). Infection à *Salmonella typhimurium* dans un élevage de lapins. *Cuniculture*, 25, (2), 65-66.

## Presence of *Listeria* spp. in short-ripened cheeses

Bottarelli A.<sup>(1)</sup>, Bonardi S.<sup>(1)</sup>, Bentley S.<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> *Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma - Lavoro effettuato con contributo MURST 98/40%.*

*Listeria monocytogenes* is a potentially dangerous foodborne pathogen which has been isolated from different food products and it has been associated to several outbreaks of human listeriosis, sometimes involving large numbers of consumers, and in particular vulnerable people such as pregnant women, infants and elderly. In these groups, it can cause septicaemia and meningitis, also reaching high mortality rates, up to 30%.

Milk products surely play a major role in the epidemiology of this foodborne disease, since two of the largest outbreaks in the 80's have been traced back to consumption of contaminated cheese: in 1985, in the USA, 142 cases of listeriosis, with 48 deaths, were linked to Mexican-style cheese and two years later, in Switzerland, 122 cases, with 34 deaths, were reported (the contaminated product was the Vacherin Mont d'Or cheese).

Some properties of *L.monocytogenes*, such as tolerance to low pH values (up to 4.4) and high salt content can allow its survival even under adverse environmental conditions, such as those met during usual dairy production; the presence of *Listeria* in cheese can then be linked to other factors, such as unsatisfactory pasteurization treatments, contamination after heat treatment or in ripening rooms, resistance to improper sanitizing agents, or the ability to multiply during storage, even when conducted at refrigeration temperatures.

It's therefore important to achieve a satisfactory level of control and prevention of contamination in dairy plants, and this can be acknowledged by tightening hygiene control, both during milk production in farms, and in processing and distribution steps, up to retail stores.

In addition, proper technologies and particularly the use of lactic bacteria (starters) as natural acidifiers and bacteriocin producers has gained increasing attention as it represents a real obstacle to growth of *L.monocytogenes* (CARMINATI, 1992).

## Materials and methods

The survey was focused on pre-packaged market samples of soft, short-ripened cheeses (ca 200 g each); the analyses were performed on a total of 100 samples (40 gorgonzola-type, 15 taleggio-type, 15 feta-type, 15 brie-type and 15 crescenza-type). Internal temperatures were recorded soon after collecting and the samples, kept at refrigeration temperatures (4°C), were taken to the laboratory where pH and aW analysis were also performed on each sample.

Twenty-five grams were taken aseptically and added to 225 ml of *Listeria* Enrichment Broth (L.E.B.-U.V.M. I Formulation-OXOID) and homogenized for 1-2 min. After 24 h. incubation at 30°C, 0.1 ml was transferred into vials containing 10 ml of Secondary Enrichment Broth (L.E.B.-U.V.M. II Formulation-OXOID) which were incubated at 30°C for further 24 h.

Plating onto selective medium (*Listeria* Selective Agar - Oxford Formula-tion-OXOID) was then performed, the plates being incubated at 37°C for 48 h. Subsequent identification was achieved by plating presumptive colonies on Columbia Blood Agar Oxoid, supplemented with 5% sheep blood. After incubation at 37°C for 24 h., haemolytic colonies were tested with MICROBACT 12 L (MedVet) microsubstrate system in order to assess their biochemical properties.

After detection of *L.monocytogenes* isolates, positive samples were divided in two parts: one was immediately stored at -20°C and so kept for 4 weeks, while the other underwent 4 freezing-thawing cycles (one per week) in order to assess the bacterial resistance to this treatment.

## Results and conclusions

The temperatures recorded in the samples ranged from 6.5 up to 9.0°C; pH values ranged from 4.92 up to 6.85; the aW values ranged from 0.96 to 0.99.

We detected a total of four *Listeria* spp. isolates (4%) and more in detail two *L. monocytogenes* and two *L.innocua* strains, as shown in table 1:

Table 1

*Listeria* spp. in the cheeses sampled

Type of cheese	n° of samples	Positive samples ( <i>L.monocytogenes</i> )	Positive samples ( <i>L.innocua</i> )
Gorgonzola	40	2 (5%)	2 (5%)
Taleggio	15	0	0
Feta	15	0	0
Brie	15	0	0
Crescenza	15	0	0
TOTALE	100	2 (2%)	2 (2%)

The contamination always occurred in Gorgonzola, while the other sampled cheeses were negative; it can thus be concluded that 10% of Gorgonzola samples were positive for *Listeria* spp., and 5% (two out of 40 samples) were positive for *L.monocytogenes*. The temperatures, aW and pH values of the contaminated samples are summarized in table 2 and it can be easily seen that none of them could avoid further multiplication of the bacterium.

Table 2-

T, pH and aW values in samples positive for *Listeria* spp.

Sample	T	pH	aW
Sample 1 - <i>L.monocytogenes</i>	9°C	6,30	0,98
Sample 2 - <i>L.monocytogenes</i>	8,5°C	6,56	0,98
Sample 3 - <i>L.innocua</i>	9°C	6,22	0,98
Sample 4 - <i>L.innocua</i>	8°C	6,37	0,97

The *L.monocytogenes* MPN in the contaminated samples was 500/g and 290/g, thus presenting, according to major studies, a real hazard to health.

The percentage of *L.monocytogenes* contaminations in Gorgonzola-type of cheese (5%) was similar to the results of other studies (D'ERRICO et al., 1990; GELOSA et al., 1990), but significantly lower than the ratio recorded by CANTONI et al., (1990) , who confirmed the presence of the microorganism in 14% of the samples.

As for the other types of cheese evaluated, the results are much more encouraging when compared to other studies (CANTONI et al., 1988; CASERIO et al., 1991; FONTANELLI et al., 1994), due to the total absence of the microorganism, as previously seen.

Due to its ubiquitous nature, total eradication of *L.monocytogenes* from all foods is a hard task; however, as for other foodborne pathogens, strict application of GMP can considerably reduce contamination. Controlling proper pasteurization and temperatures during storage, distribution and selling of the products "at risk" are valid countermeasures to prevent its growth up to dangerous levels.

As previously said, contaminated samples were then divided in two parts; one was deep-frozen (-20°C) and stored at this temperature for four weeks, while the other underwent four freezing-thawing cycles, i.e.one per week. After each thawing, the sample was analysed to assess the MPN for *L.monocytogenes*. The results are shown in table 3;

Table 3-

*L.monocytogenes* counts through freezing-thawing cycles (MPN/g)

Sample	Initial <i>L.M.</i>	Count	Count	Count	Count
	count	after 1 <sup>st</sup> cycle	after 2 <sup>nd</sup> cycle	after 3 <sup>rd</sup> cycle	after 4 <sup>th</sup> cycle
1	500	150	14	3	<3
2	290	120	40	11	<3

The frozen samples showed a decrease from the initial values of 500/g and 290/g to 90/g and 70/g, respectively. The tests performed on the frozen-thawed samples indicated a sharp, steady decrease, resulting in non-detectable *L.monocytogenes* values after the last freezing-thawing cycle. These findings, confirming the conclusions of GOLDEN et. al (1988) suggest that a treatment based on repeated freezing-thawing cycles can be much more effective towards *L.monocytogenes* than a single, even prolonged exposure to low temperatures. Due to the possibility of sensory alterations observed in some foodstuffs, the application of such treatment could be useful in some steps of industrial food processing, taking into account the health benefits for the consumers.

Summary - A total of 100 pre-packaged market samples of soft, short-ripened cheeses (Taleggio, Gorgonzola, Feta, Brie and Crescenza-type) were examined for the presence of *Listeria* spp.; the percentage of contaminated samples was 4%, and on the cheeses found positive for *L. monocytogenes*, the MPN was also determined. The contaminated samples underwent two different freezing treatments, in order to assess the survival patterns of the microorganism.

Riassunto - Gli Autori hanno determinato la presenza di *Listeria* spp. in un centinaio di campioni di vari formaggi a breve stagionatura, reperiti nella grande distribuzione in provincia di Parma; nei campioni risultati positivi per *L.monocytogenes* (2%) è stato inoltre determinato il MPN. Tali campioni sono stati successivamente sottoposti a due diversi tipi di trattamento a basse temperature, al fine di valutare la resistenza del microorganismo.

## Bibliography

- Cantoni C., Comi G., Valenti M. (1988): Attualità su *Listeria monocytogenes* nei formaggi. *Industrie Alimentari*, 27, 266-268.
- Cantoni C., Valenti M., D'Aubert S. (1990): *Listeria* spp. in alcuni alimenti e problematiche relative alla sua presenza. *Industrie Alimentari*, 29, 22-23.
- Carminati D. (1992): Patogeni emergenti: *Listeria monocytogenes* e prodotti lattiero-caseari. *Il Latte*, Febbraio, 128-144.
- Caserio G., Garzaroli C., Villa C., Gronchi C. (1991): Diffusione di *Listeria monocytogenes* in prodotti alimentari e ambienti di lavoro. Nota II: ulteriori indagini conoscitive. *Industrie Alimentari*, 30, 129-132.
- D'Errico M.M., Villari P., Grasso G.M., Romano F. (1990): Isolamento di *Listeria* spp. da latte e formaggi. *La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione*, 1-2, 47-52.
- Fontanelli G., Biribicchi R., Sampieri C., Mari M. (1994): Formaggi prodotti nel Lazio: valutazioni microbiologiche con riferimento alla Direttiva CEE 92/46. *Atti del XLVIII Convegno Nazionale S.I.S.Vet. Naxos (ME)*, 30/9-1/10, 797-801.
- Gelosa L. (1990): La *Listeria monocytogenes* quale contaminante dei prodotti lattiero-caseari. *Industrie Alimentari*, 29, 137-139.
- Golden D.A., Beuchat L.R., Brackett R.E. (1988): Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol.*, Miami Beach, Abstr.P-45.

# AZIONE INIBITORIA DI ALCUNE SPEZIE VERSO *YERSINIA ENTEROCOLITICA* E *BACILLUS CEREUS* ISOLATI DA ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE\*

Brindani F\*\*, Bacci C.\*\*\*

\*\**: Istituto di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma. Tel. 0521-032764, Fax. 0521-032772, e-mail: [brindani@ipruniv.cce.unipr.it](mailto:brindani@ipruniv.cce.unipr.it).*

\*\*\**: Biologo.*

\*: Ricerca eseguita con contributo MURST 60%.

## Introduzione

Le spezie sono sostanze di origine vegetale che si distinguono per il loro caratteristico aroma e, grazie alle loro proprietà aromatiche, antiossidanti e conservanti, vengono ampiamente utilizzate nell'industria alimentare e farmaceutica. L'uso delle spezie è antichissimo: già i Romani erano soliti impiegarle, sfruttandone l'azione antif fermentante, nei succhi di frutta (18).

In questi ultimi tempi una serie di motivazioni ha attirato nuovamente l'interesse del consumatore nei confronti delle spezie. Tra queste va annoverata la particolare attenzione che si evidenzia nei confronti degli alimenti "genuini", accentuata dalla sfiducia verso conservanti ed additivi sintetici. La sostituzione di questi ultimi con le spezie determina, quindi, una maggiore propensione nei riguardi del prodotto. Ipertensione e necessità di diete ipocaloriche inducono, poi, alla limitazione dei quantitativi di sale e di zucchero da aggiungere agli alimenti. Infine, va ricordato che determinate spezie modificano la flora batterica intestinale con conseguente minore evenienza di fermentazioni indesiderate e, secondo taluni, anche con minore incidenza di neoplasie (25). Comunque, solo poco più di una decina, dei numerosi tipi di spezie conosciuti, è, attualmente, utilizzata con relativa frequenza.

I principi attivi delle spezie sono contenuti negli oli essenziali che si presentano come liquidi più o meno vischiosi e volatili, con composizione chimica variabile a seconda della spezia, e con una costante presenza di composti fenolici e dei loro esteri (21).

Le esperienze condotte in questo settore hanno evidenziato che gli oli essenziali delle spezie agiscono sui microrganismi durante le varie fasi dello sviluppo, anche se l'azione inibente risulta particolarmente intensa durante la fase di adattamento (fase LAG) e quella di crescita esponenziale, aumentando la durata della prima e riducendo quella della seconda (2, 4, 14).

Alla luce di queste considerazioni ci è parso interessante verificare la sensibilità di alcuni microrganismi patogeni (*Bacillus cereus* produttore di enterotossina e *Yesinia enterocolitica* sierotipo O:3) agli oli essenziali delle spezie, determinando, per alcune di esse, anche i dosaggi minimi inibenti (MCI) e minimi letali (MCL) nei confronti dei microrganismi considerati.

*B. cereus* è un batterio Gram positivo, aerobio, sporigeno, a diffusione ubiquitaria, presente nel terreno, sui vegetali e nell'intestino dell'uomo: più del 10% della popolazione adulta, in buona salute, ne risulta portatore a livello intestinale (15). Esso può essere in grado di indurre sia una sindrome emetica, di recente segnalazione (1975), sia una forma enterica, nota già da svariati decenni, ma ben documentata solo negli anni '70 (15, 23).

In questi ultimi anni si è assistito ad un incremento delle segnalazioni che vedono coinvolto tale batterio. Accanto ad un indubbio miglioramento delle metodiche di isolamento (11, 12, 19, 24), altri fattori paiono rivestire importanza nella accresciuta frequenza di questi episodi: l'abitudine di consumare alimenti già preparati e la diffusione della ristorazione collettiva, conseguenza dei moderni ritmi di lavoro (13).

*Y. enterocolitica*, riconosciuta come patogeno sin dal 1939, è un microrganismo Gram negativo, psicrofilo, di cui si conoscono una quarantina di sierotipi. Soltanto alcuni di essi (O:3, O:5, O:8, O:9, O:27) risultano patogeni per l'uomo. Il sierotipo O:3, di frequente segnalazione nel suino (7, 8), è, indubbiamente, uno di questi. Nell'ambito delle sindromi enteriche le yersiniosi occupano un posto di rilievo collocandosi tra le quattro più diffuse a livello mondiale (16). La sindrome indotta dal microrganismo, in seguito all'elaborazione di una tossina termostabile, è costituita da coliche violente, diarrea, talora emorragica, vomito e febbre.

## Materiali e Metodi

### Stipiti batterici

Lo stipite di *B. cereus* oggetto della presente indagine è stato isolato da una confezione di formaggio grattugiato, reperita nella normale rete distributiva, ed identificato tramite l'esecuzione dei consueti test biochimico-enzimatici (17, 20, 22). Di tale ceppo sono state accertate sia le attitudini psicrofile sia la capacità di elaborare enterotossina (> 2 ng/ml), mediante il metodo di agglutinazione passiva inversa al lattice (3, 10), fornito in kit dalla Unipath.

Lo stipite di *Y. enterocolitica* sierotipo O:3, isolato nel corso di controlli routinari da salsicce fresche di suino, proviene dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Sezione di Reggio Emilia.

### Test di sensibilità agli oli essenziali

E' stato innanzitutto eseguito un iniziale screening tendente a valutare, anche se con una certa approssimazione, l'azione antimicrobica esercitata nei confronti degli stipiti batterici dai vari oli essenziali (reperiti presso l'erboristeria Solimè di Reggio Emilia). Veniva seguita, a tal fine, la metodica già utilizzata in una precedente ricerca (5), impregnando con 20 µl di olio essenziale dischetti di carta del diametro di 6 mm che venivano posti su piastre di Brain Heart Infusion (BHI: Oxoid) agarizzato, in precedenza insemminate con quantitativi standardizzati dei ceppi in questione. Dopo incubazione a 30° C per 18-24 ore venivano rilevati gli aloni di inibizione; sulla base dell'estensione di questi è stato, quindi, possibile suddividere, sia pure arbitrariamente ed in modo approssimativo, gli oli come inibenti deboli, medi e forti.

Individuazione delle minime concentrazioni inibenti (MCI) e delle minime concentrazioni letali (MCL) negli stipiti prima e dopo il congelamento.

Si è proceduto alla determinazione della minima concentrazione inibente (MCI) e della minima concentrazione letale (MCL) di un olio per ognuna delle tre classi di sensibilità in precedenza individuate. Come inibente debole è stato scelto l'olio di noce moscata, come inibente di media intensità l'olio di coriandolo ed infine come forte quello di origano. Si è proceduto, poi, come consigliato da Davidson e Parisch (6), utilizzando la tecnica della diluizione scalare dei vari oli essenziali in volumi standard di etanolo (0,1 ml), aggiungendo ad essi le brodoculture degli stipiti da saggiare standardizzate alla concentrazione di  $5 \times 10^5$  ufc/tubo (5 ml). Come controllo venivano addizionati 0,1 ml di alcool etilico alla sospensione batterica standardizzata. Tali brodoculture erano poi incubate a 30° C per 48 ore.

Dai tubi nei quali, dopo aggiunta dell'inibente, non si evidenziava, mediante conta su piastra (BHI agarizzato a 30° C per 48 ore), ulteriore sviluppo batterico, veniva prelevato un quantitativo costante (0,5 ml) di coltura che era trasferita in un uguale mezzo colturale, privo di inibenti, ed incubata sempre a 30° C per 24, 48 o 72 ore. Si procedeva, in tal modo, ad un trattamento di rivitalizzazione avente lo scopo di favorire la riparazione dei sistemi enzimatici parzialmente danneggiati dal contatto con l'olio. Era così possibile valutare se l'azione dell'olio essenziale, a determinate concentrazioni, aveva esercitato, sui microrganismi in questione un effetto inibente o letale. Analogo procedimento veniva adottato per gli stessi stipiti sottoposti in precedenza a congelamento lento a -18° C per 30 giorni, al fine di individuare un'eventuale differente sensibilità agli oli essenziali attribuibile a qualche danno strutturale o metabolico provocato dal trattamento, tendente a simulare le condizioni in cui potrebbero trovarsi i microrganismi presenti in alimenti conservati nei freezer domestici. In effetti il congelamento lento si rivela per i microrganismi (in particolar modo per i Gram negativi) di gran lunga più lesivo di quello rapido (1).

## Risultati

Grazie all'esito del test iniziale (tabella n. 1) è stato possibile individuare differenti livelli di intensità dell'attività inibitoria esercitata dagli oli essenziali. Sulla base dell'estensione degli aloni di inibizione (da 0 a 20 mm) tali oli sono stati valutati come inibenti forti (>10-20 mm), di media intensità (>5-10 mm) e deboli (0-5 mm).

Premettendo che *Y. enterocolitica* si è rivelato, costantemente, più sensibile alle varie spezie rispetto a *B. cereus*, dall'esame della tabella prima ricordata, è possibile rilevare che basilico, salvia, zenzero e noce moscata appaiono deboli inibenti nei confronti di entrambi gli stipiti saggiati; coriandolo, finocchio e maggiorana possono considerarsi di media intensità, mentre cannella, origano e timo evidenziano un forte potere inibente; l'olio di chiodi di garofano, infine, si comporta come un inibente medio per *B. cereus* e di spiccata efficacia per *Y. enterocolitica*.

I risultati forniti dalla determinazione delle MCI e delle MCL, relative agli oli essenziali di origano, coriandolo e noce moscata, riportati nella tabella n. 2, consentono di confermare la diversa intensità di azione da parte degli oli considerati, diversità che risulta molto più marcata di quanto già evidenziatosi nello screening iniziale, nei confronti del ceppo Gram negativo.

Oli essenziali	Microorganismi	
	<i>B. cereus</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Basilico	1	5
Cannella	11	17
Chiodi di garofano	6	16
Coriandolo	6	8
Finocchio	1	5
Maggiorana	6	10
Noce moscata	1	2
Origano	13	20
Salvia	1	2
Timo	12	17
Zenzero	0	0

Tabella n. 1: Sensibilità agli oli essenziali di alcune spezie da parte di *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica* O:3. Aloni di inibizione in mm.

Microrganismi	Oli essenziali					
	Origano		Coriandolo		Noce moscata	
	MCI	MCL	MCI	MCL	MCI	MCL
<i>B. cereus</i>	250	25.000	1.300	60.000	2.500	>60.000
	250*	25.000*	1.000*	40.000*	1.500*	40.000*
<i>Y. enterocolitica</i>	50	250	300	1.500	1.100	10.500
	20*	100*	100*	1.000*	150*	1.000*

Tabella n. 2: Minime concentrazioni inibenti (MCI) e minime concentrazioni letali (MCL), espresse in µg/ml, degli oli essenziali saggati nei confronti di *B. cereus* e di *Y. enterocolitica*. I valori relativi ai ceppi sottoposti al trattamento di congelamento a -18° C sono contrassegnati da un asterisco.

Il confronto tra i valori delle MCI e delle MCL, relative agli stipiti congelati e non, evidenzia una generalizzata diminuzione dei quantitativi di olio essenziale necessari per determinare l'inibizione e la morte dei ceppi sottoposti a congelamento (figure nn. 1, 2, 3 e 4). Solamente per l'olio di origano, nei confronti di *B. cereus*, non si rilevano variazioni.

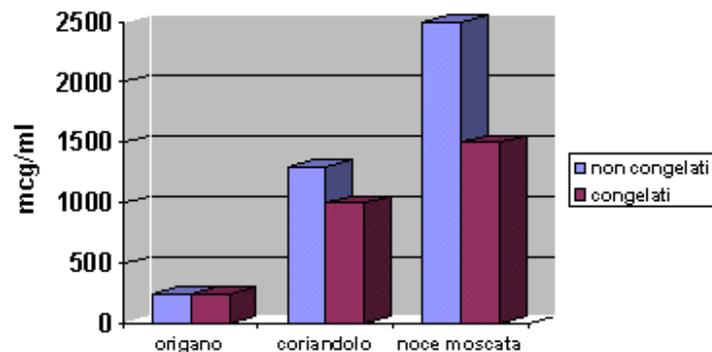
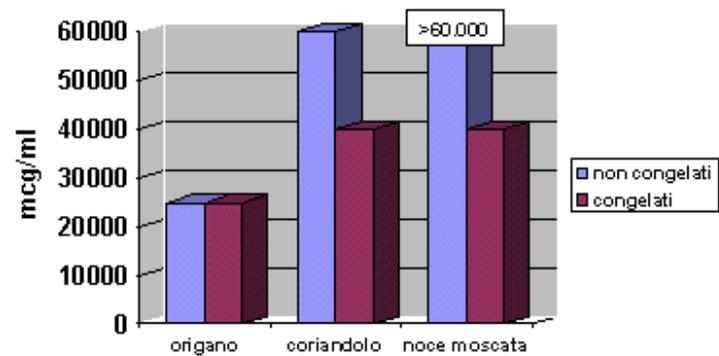
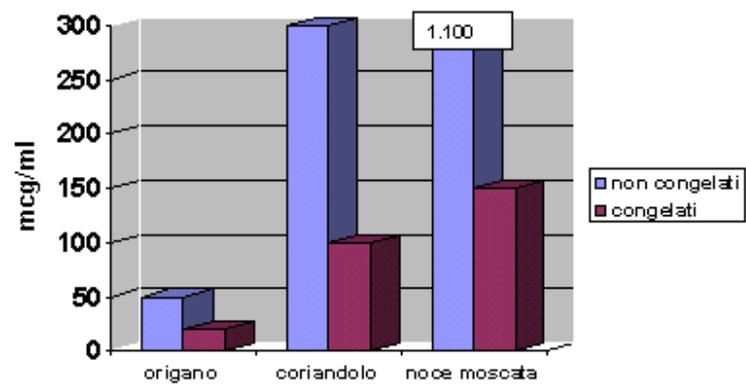


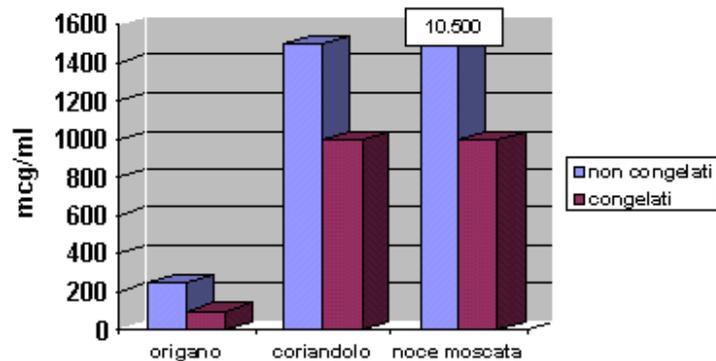
Figura n.1: Minima concentrazione inibente (MCI) degli oli essenziali saggati nei confronti di *Bacillus cereus* prima e dopo il congelamento a -18°C per 30 giorni.



**Figura n.2:** Minima concentrazione letale (MCL) degli oli essenziali saggiati nei confronti di *Bacillus cereus* prima e dopo il congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  per 30 giorni.



**Figura n.3:** Minima concentrazione inibente (MIC) degli oli essenziali saggiati nei confronti di *Yersinia enterocolitica* prima e dopo il congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  per 30 giorni.



**Figura n.4:** Minima concentrazione letale (MCL) degli oli essenziali saggiati nei confronti di *Yersinia enterocolitica* prima e dopo il congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  per 30 giorni.

Relativamente ai ceppi sottoposti a congelamento, risulta meno evidente la differenza dell'intensità di azione tra l'inibente considerato medio (coriandolo) e quello debole (noce moscata), risultando l'azione di quest'ultimo più marcata nei confronti di entrambi gli stipiti. *Y. enterocolitica*, inoltre, avendo subito rispetto a *B. cereus* un danneggiamento maggiore, probabilmente in relazione alla differente struttura degli involucri esterni, propria dei batteri Gram negativi, appare sensibile anche a dosaggi decisamente modesti di olio essenziale (MCI: 20-150  $\mu\text{g/ml}$ ; MCL: 100-1.000  $\mu\text{g/ml}$ ).

## Considerazioni e conclusioni

I risultati della nostra esperienza pongono in risalto la spiccata efficacia dell'olio essenziale di origano (inibente forte) verso *Y. enterocolitica*; i dosaggi rivelatisi inibitori e letali (50 e 250  $\mu\text{g/ml}$ ) sono sovrapponibili a quelli da noi rilevati in precedenti ricerche relative ad altri microrganismi, pure Gram negativi (5). Analoga corrispondenza con *Aeromonas* spp. è stata, inoltre, osservata relativamente ad un inibente debole, l'olio di noce moscata (1.100 e 10.500  $\mu\text{g/ml}$ ).

È stato possibile evidenziare, anche, una notevole differenza tra i dosaggi richiesti per inibire i microrganismi considerati e quelli necessari per eliminarli. Tale divario si accentua particolarmente per *B. cereus*. Questo microrganismo, la cui presenza è stata a volte segnalata in alcune spezie (9), si è dimostrato molto più resistente di *Y. enterocolitica* nei confronti degli oli saggiati: l'olio di origano, che è apparso come il più attivo, risulta letale solamente a una concentrazione di 25.000  $\mu\text{g/ml}$ .

Il congelamento, cui sono stati sottoposti i microrganismi, ha indubbiamente potenziato l'efficacia sia inibente sia letale di tutti i tipi di olio utilizzati. Ciò fa ritenere non inverosimile che l'aggiunta di determinate spezie, organoletticamente compatibili, possa inibire batteri, in particolare Gram negativi, presenti in alimenti utilizzati dopo scongelamento. Per ottenere, invece, un'azione letale, in particolare nei confronti di *B. cereus*, si rendono necessari, invece, dosaggi talmente elevati che potrebbero non essere tollerati da parte del

consumatore.

Parole chiave: *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, inibizione, spezie.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, inhibition, spices.

Schlüsselworte: *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, Hemmung, Gewuerze.

Riassunto - E' stata valutata la sensibilità agli oli essenziali di undici spezie da parte di *Yersinia enterocolitica* (sierotipo O:3) e di *Bacillus cereus* enterotossigeno, isolati rispettivamente da salsicce fresche di suino e da confezioni di formaggio grattugiato. Un primo screening ha consentito di individuare notevoli differenze nei livelli di attività inibitoria da parte degli oli considerati, nonché una costante maggior sensibilità a questi da parte di *Y. enterocolitica*. Successivamente venivano determinati i valori delle minime concentrazioni inibenti (MCI) e letali (MCL) di tre oli essenziali (origano, coriandolo e noce moscata) caratterizzati, rispettivamente, da un'azione inibente forte, media e debole. I valori ottenuti, per MCI e MCL, oscillavano da 250 a 2.500 µg/ml e da 25.000 a più di 60.000 µg/ml per *B. cereus*, mentre per *Y. enterocolitica* variavano da 50 a 1.100 e da 250 a 10.500 µg/ml. Tali determinazioni erano ripetute dopo aver sottoposto i ceppi a congelamento lento a -18° C per 30 giorni. In queste condizioni si evidenziava, con la sola eccezione dell'origano nei confronti di *B. cereus*, una generalizzata diminuzione delle MCI e delle MCL. *Y. enterocolitica*, inoltre, si rivelava particolarmente sensibile anche a dosaggi modesti (MCI: 20-150 µg/ml; MCL: 100-1.000 µg/ml) rispetto a *B. cereus* (MCI: 250-1500 µg/ml; MCL: 25.000-40.000 µg/ml).

SUMMARY - *Yersinia enterocolitica* (serotype O:3) and enterotoxigenic *Bacillus cereus* isolates from fresh pork sausages and ready-made grated cheese were assayed for susceptibility to the essential oils of eleven spices. Considerable differences in the levels of inhibitory activity of the oils taken into consideration were observed during the first screening. Moreover, a constantly higher susceptibility to these spices was shown by *Yersinia enterocolitica*. Subsequently, the values of the minimum inhibitory (MIC) and lethal (MLC) concentrations were determined for three essential oils (origan, coriander and nutmeg) characterised, respectively, by a strong, medium and weak inhibitory action. The values obtained for MIC and MLC varied from 250 to 2,500 µg/ml and from 25,000 to more than 60,000 µg/ml for *B. cereus*, while they ranged from 50 to 1,100 and from 250 to 10,500 µg/ml for *Y. enterocolitica*. The same procedure was repeated after freezing the strains slowly at -18° for 30 days. Under these circumstances the values for MIC and MLC generally decreased, with the only exception of *B. cereus* to origan. Moreover, *Y. enterocolitica* was particularly susceptible even to small quantities (MIC: 20 - 150 µg/ml; MLC: 100 - 1,000 µg/ml) unlike *B. cereus* (MIC: 250 - 1,500 µg/ml; MLC: 25,000 - 40,000 µg/ml).

ZUSAMMENFASSUNG - *Yersinia enterocolitica* (Serotypus O:3) und enterotoxisches *Bacillus cereus*, die aus frischer Schweinewurst und aus verpacktem geriebenem Kaese isoliert wurden, wurden fuer die Empfindlichkeit gegen aetherische Öele von 11 Gewuerze bewertet. Groeße Unterschiede in der Hemmungsaktivitaet der erwaegten Oele wurden waehrend des ersten Screenings beobachtet. Außerdem zeigte *Yersinia enterocolitica* eine staendig hoehere Empfindlichkeit gegen diese Gewuerze. Spaeter wurden die Werte von den mindesten hemmenden (MHK) und toedlichen (MTK) Konzentrationen fuer drei aetherische Oele (Origanum, Koriander und Muskatnuß) bestimmt. Bezeichnend fuer diese drei Oele ist eine beziehungsweise starke, mittlere und schwache Hemmungsaktivitaet. Die fuer MHK und MTK erreichten Werte schwankten zwischen 250 und 2,500 ig/ml und zwischen 25,000 und mehr als 60,000 ig/ml fuer *B. cereus* und fuer *Y. enterocolitica* von 50 zu 1,100 und von 250 zu 10,500 µg/ml. Dasselbe Verfahren wurde nach langsamem Gefrieren (- 18° Grad fuer 30 Tage) der Staemme wiederholt. Normalerweise verkleinerten sich die Werte fuer MHK und MTK unter diesen Bedingungen, mit der einzigen Ausnahme von *B. cereus* gegen Origanum. Außerdem war *Y. enterocolitica* besonders empfindlich sogar gegen kleine Mengen (MHK: 20 - 150 ig/ml; MTK: 100 - 1,000 ig/ml) anders als *B. cereus* (MHK: 250 - 1,500 µg/ml; MTK: 25,000 - 40,000 ig/ml).

Bibliografia

- 1) ADAMS M.R., MOSS M.O. (1995). The microbiology of food preservation. In: "Food Microbiology", p. 55-85, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- 2) BEUCHAT L. R., GOLDEN D. A. (1988). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, 43, 134-142.
- 3) BRINDANI F., OSSIPRANDI M.C. (1994). Isolamento e caratterizzazione di stiptiti di *Bacillus cereus* da prodotti a base di latte. *Ann. Fac. Med. Vet. Parma*, XIV, 267-280.
- 4) BRINDANI F. (1997). "Conservazione degli alimenti e tossinfezioni". p. 52-53. Centro Grafico dell'Università di Parma.
- 5) BRINDANI F., BACCI C., CECI F. (1999). *Aeromonas* spp. di provenienza alimentare: valutazione della sensibilità agli oli essenziali di alcune specie e conservabilità degli alimenti. In corso di stampa su *Tecnica Sanitaria, Igiene degli Alimenti e della Nutrizione*, XXXVI, (1), 16-21.
- 6) DAVIDSON P.M., PARISH M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, 1989; 52: 148-155.
- 7) DELIA S., DONIA D., FAZIO-GENTILE G., IMBESI D., MAURO A., ZACCONE R. (1981). Il maiale quale fonte di infezione nelle yersiniosi. *L'Igiene Moderna*, 76, 509-520.
- 8) D'ERRICO M.M., ANNINO I., SCHIOPPA F. (1986). Isolamento di *Yersinia* spp. da tamponi linguali e contenuto cecale di suini allevati in Campania. *L'Igiene Moderna*, 86, 210-215.
- 9) GIACCONE V., COLAVITA G., TORRIANI S., CIOCCA R.M., AUGELLI R. (1996). Occurrence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in spices. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 47, (2), 47-49.
- 10) GRIFFITH M.W. (1990). Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *J. Food Prot.*, 53, 790-792.
- 11) HARMON S. M. (1984). *Bacillus cereus*. In "Bacteriological analytical manual". 6th Ed., Cap. 16, p.1-8, Ass. Off. An. Chem. Arlington, Virginia.
- 12) HARMON S.M., KAUTTER D.A., McCCLURE F.D. (1984). Comparison of selective plating media for enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 315-324.
- 13) HARMON S.M., KAUTTER D.A. (1991). Incidence and potential growth of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *J. Food Prot.*, 54, 372-374.
- 14) ISMAEL A.A., PIERSON M.D. (1990). Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *J. Food Prot.*, 53, 958-960.
- 15) JAY J.M. (1992). Food poisoning caused by Gram-positive sporeforming bacteria. In "Modern food microbiology" 4th Ed., p. 479-503., Van Nostrand Reinhold, New York.
- 16) KNAPP W., WEBER A. (1982). Zur epidemiologischen und suchenhygienischen Bedeutung von *Yersinia pestis* und *Yersinia enterocolitica*. *Oeff. Gesundh. Wes.*, 44, 352-356.
- 17) KONEMAN E. W., ALLEN S. D., DOWELL W. R. Jr., JANDA W. M., SOMMERS H. M., WINN W. C. Jr. (1993). The aerobic Gram positive bacilli. In "Color atlas and textbook of diagnostic microbiology", 3rd Ed., p. 355-391. J. B. Lippincot Company, Philadelphia.
- 18) PARRY J.W. (1953). "The story of spices"., Chem. Publ. Co., New York.
- 19) PETERZ M., WIBERG C., NORBERG P. (1985). Comparison of media for isolation of *Bacillus cereus* from foods. *J. Food Prot.*, 48, 11, 969-970.
- 20) RHODEHAMEL E. J., HARMON S. M. (1998). *Bacillus cereus*. In "FDA Bacteriological Analytical Manual", 8h Ed., 14, I. Londra.
- 21) SHELF L. A. (1993). Antimicrobial effects of spice. *J. Food Saf.*, 6, 29-44.
- 22) SNEATH P. H. A. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1972. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", (Buttles J. P., Vaughn V. M.- Eds.), p. 1104-1139. Williams and Wilkins, Baltimore.
- 23) SZABO R. A., JODD E. C. D., RAYMAN M. K. (1984). Twenty-four hours isolation and confirmation of *Bacillus cereus* in foods. *J. Food Prot.*, 47, 856-860.
- 24) TROLLER J.A., (1986). Water relations of foodborne bacterial pathogens. An updated review. *J. Food Prot.*, 48, 8, 656-670.
- 25) WYLIE-ROSSET J. (1982). Spices to the rescue. *The Professional Nutritionist*, 14, 4-6.

# RESIDUI DI FARMACI AD ATTIVITÀ ANTIMICROBICA NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Ghidini S.

*Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti, Università di Parma*

## Premessa

I farmaci ad attività antimicrobica hanno iniziato ad essere impiegati in medicina veterinaria subito dopo la loro scoperta: le prime applicazioni terapeutiche nella cura degli animali si ebbero nel trattamento delle mastiti 3, 8, 32, 36. Negli anni cinquanta poi, la scoperta della capacità di tali farmaci di incrementare gli accrescimenti ponderali degli animali, determinò un impiego sempre crescente di antimicrobici come additivi alimentari 20. La vastità di tale impiego in alimentazione animale spinse persino alcuni ad affermare che le produzioni zootecniche non sarebbero state possibili, o quantomeno sarebbero risultate antieconomiche, senza l'impiego di tali additivi 1, 22. In effetti, questo uso degli antimicrobici è arrivato ad assumere dimensioni imponenti: è stato riportato che nel 1992 il 42 % dei farmaci veterinari erano impiegati a tale scopo ed è anche stato stimato che gli antimicrobici rappresentavano la più cospicua categoria di farmaci impiegati in medicina veterinaria, sia in termini di quantità assolute che in termini economici 21. Recentemente sono state poste limitazioni legislative all'impiego di antimicrobici come additivi alimentari 30 per cui, nel breve e medio periodo, l'impiego di tali medicinali dovrebbe ridursi.

## Residui negli alimenti

È ovvio che un impiego di farmaci antimicrobici su così larga scala abbia determinato e determini la presenza di residui di farmaci negli alimenti. È riportato in letteratura che nel 1962 negli U.S.A. il 12 % circa dei campioni di latte risultava positivo per la presenza di antimicrobici 13. Risultati simili si ebbero in Gran Bretagna ove nel 1963 l'11 % dei campioni di latte denunciò la presenza di residui di penicillina 10. Uno studio del 1969 condotto, in macelli dell'Illinois, su tessuti, urine e feci di suini, bovini, ovini e pollame rivelò la presenza di residui di antibiotici rispettivamente nel 27 %, 9 %, 21 %, 20 % dei casi 13. In Danimarca Kampelmacher nel 1962 trovò che il 12 % dei bovini adulti, il 58 % dei vitelli ed il 23 % dei suini avevano residui di antibiotici 16. Uno studio successivo, sempre in Danimarca, trovò residui di antimicrobici nel 77 % dei bovini e nell'1 % dei suini 35. Nel 1963 in Francia si trovarono residui nel 4.1 % dei campioni di carne testati 27. Come si vede i dati sono piuttosto eterogenei e variabili e dipendono molto dal tipo di campionamento e soprattutto dalla sensibilità della metodica di indagine impiegata. Studi non da tutti condivisi, condotti con metodiche di analisi più sensibili delle precedenti, rivelarono, in campioni di latte prelevati dal commercio, la presenza di residui di tetracicline, Sulfametazina e di altri antimicrobici nel 75 % dei casi 2, 5, 7, 17, 19. Tuttavia, stime più attendibili valutano intorno all'1 % la percentuale di campioni contenenti residui di antimicrobici 28.

Diverse possono le cause della presenza di residui negli alimenti: tra le più frequenti si possono citare il mancato rispetto dei tempi di sospensione previsti per il farmaco, la mancata od erronea individuazione degli animali trattati ed usi impropri dei farmaci, cioè a dosaggi troppo elevati ovvero con la somministrazione a categorie per le quali il farmaco non è registrato.

## Rischi per la salute pubblica

Al contrario di quanto ci si sarebbe aspettato, le prime preoccupazioni inerenti la presenza di residui di antimicrobici negli alimenti non furono espresse da ambienti sanitari, ma dalle industrie di trasformazione del latte che verificavano come tali residui fossero in grado di inibire le colture di starter impiegati nella produzione di lattici fermentati 14, 34.

Le prime attenzioni sanitarie verso il problema furono dovute soprattutto al timore di reazioni allergiche in individui precedentemente sensibilizzati con antibiotici betalattamici 9, 18. Altre preoccupazioni vennero dalla dimostrazione della tossicità selettiva di alcune molecole per il midollo osseo (cloramfenicolo). Al giorno d'oggi i maggiori timori derivano dall'impiego di antimicrobici nelle produzioni zootecniche vengono dalla possibilità che questo impiego, soprattutto se effettuato a dosaggi sub-terapeutici, determini una pressione selettiva in grado di selezionare ceppi di batteri antibiotico-resistenti non patogeni per gli animali, ma potenziali agenti di episodi tossinfettivi nell'uomo. Tale meccanismo di pressione selettiva desta preoccupazioni anche perché potrebbe agire sulla flora intestinale del consumatore: si teme cioè che gli antimicrobici presenti negli alimenti possano depauperare la microflora intestinale dell'individuo esposto, favorendo così l'eventuale adesione di batteri patogeni 26.

## Limiti massimi di residui (L.M.R.)

La consapevolezza dei potenziali rischi per la salute del consumatore ha indotto i governi dei vari paesi ad introdurre nelle proprie legislazioni concentrazioni massime di residui tollerate negli alimenti. Tali concentrazioni vengono chiamate Limiti Massimi di Residui (L.M.R.) sia nella Unione Europea che in Canada, mentre negli U.S.A. vengono denominate

semplicemente tolleranze; i termini, tuttavia, si possono considerare sinonimi. Il termine L.M.R. si può definire come la massima concentrazione del residuo indice (ad es. la molecola di origine o suoi metaboliti) derivante dall'uso di medicinali veterinari, espresso in parti per milione (ppm) o in parti per bilione (ppb) di sostanza fresca, legalmente tollerato. I L.M.R. per una molecola vengono fissati a partire dalla Dose Giornaliera Accettabile (D.G.A). La D.G.A. è una stima della quantità di un farmaco veterinario, espressa in rapporto alla massa corporea che può essere assunta da un individuo per tutta la vita senza correre significativi rischi tossicologici. Per fissare la D.G.A. di una data molecola si determina la minima concentrazione in grado di causare effetti tossicologici nella specie da laboratorio più sensibile e si moltiplica poi tale concentrazione per un fattore di sicurezza (solitamente 100 o 1000). Nota la D.G.A. i limiti massimi di residui si calcolano conoscendo i consumi medi dei vari alimenti di origine animale. In tabella 1, prendendo come esempio la matrice latte, vediamo riassunte le tolleranze ammesse per le molecole di antimicrobici maggiormente impiegate in medicina veterinaria.

MOLECOLA	CANADA	U. E.	U.S.A.
Ampicillina	10	4	10
Ceftiofur	1000 *(A)	100	50 **(S)
Cefapirina	20		20
Cloxacillina	30 (A)	30	10
Diidrostreptomicina	125	200	125 (S)
Entromicina	50	40	50 (S)
Neomicina	250 (A)	500	150
Novobiocina	125 (A)		100
Ossitetraciclina	150 (A)	100	30 (S)
Penicillina G	6	4	5 (S)
Streptomicina	125	125	125 (S)
Sulfadimetossina	10	100	10
Sulfadossina	10 (A)	100	
Sulfametazina	10 (A)	100	10 (S)

Tabella 1(da Mitchell J. L. et al., 1998, modificato)- Limiti massimi di residui o livelli di tolleranza nel latte, espressi in ppb <sup>6</sup> <sup>11</sup> <sup>79</sup>. A= L.M.R. amministrativi, non pubblicati sul Canada's Food and Drug Act and Regulations, tuttavia potrebbero essere usati per applicazioni legislative. S= livelli di sicurezza, non pubblicati sul U.S. Food, Drugs and Cosmetics Act, tuttavia potrebbero essere usati per applicazioni legislative. \*, molecola d'origine e metaboliti. \*\* molecola d'origine.

Come visto, la determinazione dei L.M.R. si basa su studi tossicologici, non tenendo conto della capacità delle molecole di antimicrobici di attuare una pressione selettiva sulla flora batterica dell'intestino umano, anche a concentrazioni inferiori a quelle sicure dal punto di vista tossicologico <sup>37</sup>: proprio per questo recentemente è stato proposto di andare oltre l'approccio tossicologico nella determinazione dei L.M.R., effettuando anche test microbiologici per stabilire le concentrazioni delle varie molecole antimicrobiche non in grado di influenzare la flora microbica dell'intestino umano <sup>4</sup>.

Nell'ambito delle contaminazioni chimiche degli alimenti è stato recentemente proposto un approccio alternativo a quello dei L.M.R.: si pensa di introdurre dei valori soglia oltre i quali debba scattare un allarme tossicologico. Tali valori limite verrebbero chiamati soglie di allarme tossicologico (in inglese Threshold of Toxicological Concern, rappresentate dall'acronimo T.T.C.). Il principio su cui tali soglie vengono fissate dovrebbe essere di natura probabilistica: la T.T.C. dovrebbe essere una concentrazione che se assunta per tutta la vita provoca effetti in un individuo su un milione. Una T.T.C. non dà, quindi, una certezza di sicurezza dal punto di vista tossicologico: in definitiva ciò che si fa è tollerare il rischio derivante dall'assunzione di contaminanti tramite la dieta, ma si vuole che tale rischio rimanga entro limiti accettabili.

## Metodi di ricerca

Al giorno d'oggi si conoscono e vengono normalmente impiegate diverse metodiche per la ricerca di residui di farmaci ad azione antimicrobica negli alimenti; cercando di raggrupparle in base ai loro principi ispiratori queste possono essere raccolte in sei diversi gruppi: si conoscono test basati sull'inibizione della crescita microbica, test del recettore microbico, test enzimatico-colorimetrici, test del legame recettoriale, metodiche cromatografiche e test immuno-enzimatici.

Alcune delle metodiche citate forniscono risposte di tipo qualitativo, altre di tipo semi-quantitativo, mentre altre danno risposte di tipo quantitativo. I test qualitativi richiedono che sia stabilito un valore soglia per classificare i campioni in positivi e negativi (ovviamente questo valore dovrà essere settato tenendo conto dei L.M.R.). Per avere risposte quantitative da un

test è necessario testare un campione e paragonarlo a valori di riferimento certificati con cui costruire una curva di calibrazione: tali metodiche solitamente richiedono strumenti molto sofisticati (e costosi) per misurare con precisione ed accuratezza la risposta del test. I test semi-quantitativi sono simili a quelli quantitativi, ma le risposte non sono espresse come precisi valori di concentrazione, ma come range di concentrazione (ad es. campioni negativi, debolmente positivi, positivi, molto positivi).

Non esistono metodiche migliori e peggiori, le metodiche hanno solo caratteristiche diverse. Tali diversità devono essere sfruttate impiegando correttamente i diversi test disponibili in momenti diversi di uno stesso piano di ricerca di residui di antimicrobici. Ad esempio si potrà suddividere una ricerca in due o tre livelli 33, 34:

1. Analisi con una metodica che permetta di saggiare in breve tempo un gran numero di campioni, dando un basso numero di falsi negativi e, possibilmente, un numero accettabile di falsi positivi (metodica di screening). A questo livello è spesso impiegato il test di inibizione della crescita microbica.
2. Eventuale analisi intermedia con una metodica in grado di svelare il tipo di residuo presente (ad es. test immuno-enzimatici, test recettoriali).
3. Conferma della positività e quantificazione del residuo con metodiche quantitative (soprattutto con tecniche cromatografiche, possibilmente associate alla spettrometria di massa per una conferma di certezza).

## Stabilità delle molecole

Gran parte delle informazioni disponibili riguardo i residui di antimicrobici si riferiscono a prodotti alimentari non trattati. I L.M.R. stessi sono fissati per alimenti non trattati. La stragrande maggioranza degli alimenti di origine animale subiscono vari trattamenti prima di essere consumati.

Queste affermazioni permettono di capire come, anche conoscendo i livelli di residui negli alimenti, manchino delle informazioni per stabilire con precisione il rischio a cui il consumatore è esposto. I trattamenti subiti dall'alimento prima di essere consumato, infatti, possono indurre modificazioni nelle molecole ad attività farmacologica. Queste modificazioni possono ridurre, lasciare invariata o aumentare la pericolosità di una molecola. Ancora la pericolosità di tali modificazioni va studiata sotto diversi punti di vista: vanno valutate le variazioni dell'efficacia antimicrobica delle molecole, ma non va sottovalutata la possibilità che si formino metaboliti che potrebbero avere attività tossicologiche diverse (allergeniche, teratogene, mutagene). Gli studi in materia sono ancora pochi e spesso si limitano ad osservare le variazioni della attività antimicrobica delle molecole. Molto poco, invece, è stato fatto nel campo della ricerca di possibili metaboliti prodotto della degradazione delle molecole o frutto di interazioni con la matrice. Inoltre, spesso viene studiata solo la stabilità delle molecole al calore, meno considerate sono le variazioni di altri fattori che si verificano durante la preparazione degli alimenti come ad esempio il pH, o come si distribuiscono i residui durante la cottura. La grande varietà dei processi di preparazione degli alimenti che fa la ricchezza delle più grandi tradizioni culinarie permette di intuire la potenziale vastità di questo campo di ricerca.

Faremo ora una breve rassegna sui dati disponibili riguardo la stabilità delle varie classi di farmaci ad azione antimicrobica.

Sulfamidici: i sulfamidici sono una categoria di farmaci molto termostabili, tuttavia è stata dimostrata una riduzione della loro attività antimicrobica in carcasse mantenute a lungo a temperature di congelamento. È ormai appurato che i sulfamidici vengono inattivati dall'esposizione alla luce solare, proprio per questo i campioni destinati alla ricerca di tali chemioterapici andrebbero conservati in contenitori scuri. La cottura non è assolutamente in grado di determinare una significativa diminuzione dell'attività antimicrobica dei sulfamidici; la stagionatura degli insaccati fermentati ne riduce l'attività antimicrobica (dopo un solo mese di stagionatura si ha un'attività residua del 20 %) 12.

Nitrofurani: i residui di furazolidone e di furaltadone si degradano rapidamente nei tessuti animali post mortem. Già due ore dopo l'abbattimento si possono trovare solo tracce di tali residui. Anche congelando rapidamente le carcasse e poi conservandole, sempre a temperature di congelamento, i residui di nitrofurani vengono inattivati, mentre l'inattivazione non avviene se la carne viene trattata termicamente e poi addizionata di tali antimicrobici: ciò suggerisce che i nitrofurani vengano inattivati da sistemi enzimatici propri del muscolo 12.

Penicilline: le penicilline sono molecole piuttosto termosensibili, la cottura (specie se non accurata) ha dimostrato di essere in grado di ridurre l'attività antimicrobica di tali antibiotici. Completa inattivazione delle penicilline è stata dimostrata durante il periodo di stagionatura di insaccati fermentati, probabilmente a causa della produzione di penicillinasi da parte di alcuni ceppi batterici. Per lo stesso motivo le penicilline vengono inattivate nel latte crudo, ma non in quello trattato termicamente 12, 31.

Tetracicline: la categoria delle tetracicline è probabilmente quella che mostra le minori caratteristiche di stabilità. Le tetracicline tendono a formare chelati con ioni metallici bivalenti, per questo tendono ad accumularsi nelle ossa. Il rilascio di tetracicline durante i processi di cottura in presenza di osso sembrano essere trascurabili; inoltre il calore della cottura inattiva rapidamente tali composti. La stagionatura degli insaccati fermentati non inattiva le tetracicline 12.

Cloramfenicolo: residui di CAF vengono rapidamente inattivati nel tessuto epatico a causa del metabolismo del citocromo P-450. La presenza di residui di tale molecola dipende essenzialmente dalla presenza o meno di tale complesso enzimatico e dalla sua attività 24, 25.

Amminoglicosidi: residui di neomicina e streptomina nel tessuto muscolare e nelle uova hanno dimostrato una notevole resistenza ai trattamenti termici. Il periodo di stagionatura degli insaccati che è in grado di inattivare completamente le penicilline è sostanzialmente inefficace nel ridurre l'attività antimicrobica dei residui di amminoglicosidi 12.

Macrolidi: la termostabilità della spiramicina e della oleandomicina è considerevole, ma molto minore di quella degli amminoglicosidi. La presenza di latte sembra aumentare le perdite di attività dell'oleandomicina 12.

## Conclusioni

Oggi i maggiori timori concernenti la presenza di molecole ad attività antimicrobica negli alimenti di origine animale a concentrazioni di residui riguardano la possibile azione di depauperamento che tali residui sarebbero in grado di esercitare sulla flora microbica intestinale del consumatore. I limiti massimi di residui negli alimenti, però, sono tuttora fissati in base a criteri meramente tossicologici. Non sono ancora disponibili metodiche in grado di valutare con precisione la pressione selettiva di molecole ad azione antimicrobica sulla microflora intestinale a concentrazioni di residui, per cui un approccio di questo al problema non è ancora possibile, pur essendo auspicabile. Da un primo studio sulle ricerche inerenti la stabilità delle molecole si può affermare che la loro attività antimicrobica tende a diminuire durante i processi di preparazione dell'alimento (pur con un'ampia variabilità tra le varie classi di farmaci e tra i diversi tipi di trattamenti subiti); rimangono tuttavia da valutare tutte le modificazioni che le molecole di antimicrobici possono subire in seguito a tali processi, per escludere la possibile formazione di metaboliti di rilevante attività tossicologica.

Parole-chiave: antimicrobici, alimenti, residui

Keywords: antimicrobials, food, residues

Riassunto - Farmaci ad azione antimicrobica sono vastamente impiegati sia nella terapia sia come additivi dell'alimentazione degli animali da reddito. La vastità di tale impiego è causa inevitabile della presenza di residui negli alimenti. La presenza di residui di farmaci ad azione antimicrobica negli alimenti desta preoccupazioni per la salute del consumatore. I principali timori riguardano: la possibile sensibilizzazione allergica degli individui esposti, l'eventualità che si selezionino ceppi di batteri antibiotico-resistenti, e la pressione selettiva che i residui di farmaci ad azione antimicrobica possono esercitare sulla microflora intestinale dell'uomo, anche a concentrazioni inferiori ai L.M.R. Per una corretta valutazione del rischio cui il consumatore è esposto sarebbe necessario conoscere ciò che accade alle molecole dei residui durante tutti i processi di preparazione dell'alimento.

Summary - Antimicrobial drugs are widely employed in therapy of food producing animals and as nutrition additives. This massive use inevitably causes residues in food. The presence of antimicrobial drug residues causes concerns for consumer's health. The main concerns are: the possible allergic sensitization of exposed individuals, the possibility of selecting antibiotic resistant bacteria, and the selective pressure that antimicrobial drug residues may exert over human gut microflora, even at concentrations lower than M.R.L. For an accurate risk assessment involved in eating food containing antimicrobial drug residues it would be necessary to know what happens to molecule residues during every step of food processing.

## Bibliografia

- 1) BOOTH N. H. (1988) Toxicology of drug and chemical residues, p 1149-1205. In Booth N. H., and L. E. McDonald (ed.), Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 2) Brady M. S., Kats S. E. (1988) Antibiotic/antimicrobial residues in milk. J. Food Prot. 5: 8-11.
- 3) Brock T. D., Madigan M. J., Mortinko M. J., Parker J. (1994) Growth and its control, p 321-360. In Biology of Microorganisms, 7th edition Prentice-Hall of Canada Ltd., Toronto, Ontario.
- 4) CERNIGLIA C.E., KOTARSKI S. (1999) Evaluation of Veterinary drug residues in food and their potential to affect human intestinal microflora. Regul. Toxicol. Pharmacol. Jun; 29(3): 238-261.
- 5) Charm S. E., Chi R. (1988) Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71. 304-316.
- 6) Code of Federal Regulations (1994) 21 CFR 1, part 556(1 April). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.
- 7) COLLINS-THOMPSON D. L., WOOD D. S., THOMPSON I. Q. (1988) Detection of antibiotic residues in consumer milk supplies in North America using the Charm II procedure. J. Food Prot. 51:632-633.
- 8) FOLEY E., LEE W. S., EPSTEIN G. A. (1946) The effect of penicillin on staphylococci streptococci commonly associated with bovine mastitis. J. Milk Food Technol. 8:129-133.
- 9) FREEMAN T. R. (1953) Milk quality. J. Milk Food Technol. 15: 162-166.
- 10) GARROD L. P. (1964) Hazards of antibiotics in milk and other food products. Proc. R. Soc. Med. 57: 1087-1088
- 11) Government of Canada (1994) Food and Drug Act and Regulations, Supply and Services Canada.
- 12) HAAGSMA N. (1993) Stability of veterinary drug residues during storage, preparation and processing. Proceedings of the EuroResidue II conference, Veldhoven, The Netherlands, 3-5 May.
- 13) HUBER W. G. (1971) The impact of antibiotic drugs and their residues. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 15:101-132.
- 14) HUNTER G. J. E. (1949) The effect of penicillin in milk on the manufacture of Cheddar cheese. J. Dairy Res. 16:235-241.
- 15) Jukes T. H., Williams W. L. (1953) Nutritional effects of antibiotics. Pharmacol. Rev. 5:381-420.
- 16) KAMPELMACHER E. H., GUINEE P. A. M., VAN NOORLE JANSEN L. M. (1962) Simple determination of antibiotics in slaughter animals which had therapeutic antibiotic treatment during life. Tijdschr. Diergeneesk. 87: 16-29.
- 17) KIMBRELL W. (1990) Milk on trial. Dairy Foods 1990 (March): 12-25.
- 18) KINDRED T. P., HUBBERT W. T. (1993) Residue prevention strategies in the U.S.A. J. Am. Vet. Med. Assoc. 202: 46-49.
- 19) LAROCQUE L., CARIGNAN G., SVED S. (1990) Sulfamethazine (sulfadimine) residues in Canadian consumer milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 365-367.

- 20) LASSITER C. A. (1955) Antibiotics as growth stimulants for dairy cattle: a review. *J. Dairy Sci.* 38: 1102-1138.
- 21) MILLER D. J. (1993) Present state and trends in the use of veterinary drugs. Proceedings of the EuroResidue II conference, Veldhoven, The Netherlands, 3-5 May.
- 22) MITCHELL J. M., YEE A. J. (1995) Antibiotic use and transfer of drug resistance: does it mean we should stop treating animals with these drugs? *Dairy Food Environ. Sanit.* 15: 484-487.
- 23) MITCHELL J. L., GRIFFITHS M. W., McEWEN S. A., McNAB W. B., YEE A. J. (1998) Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *J. Food Prot.* 61(6): 742-756.
- 24) MOATS W. A. (1988) Inactivation of antibiotics by heating in foods and other substrates: a review. *J. Food Prot.* 51(6): 491-497.
- 25) O'BRIEN J. J., CAMPBELL N., CONAGHAN T. (1981) Effect of cooking and cold storage on biologically active antibiotic residues in meat. *J. Hyg., Camb.* 87: 511-523.
- 26) PAIGE J. C., TOLLEFSON L., MILLER M. (1997) Public health impact on drug residues in animal tissues. *Vet. Hum. Toxicol.* June; 39(3):162-169.
- 27) PITRE J. (1963) Gel diffusion test for antibiotic in meat and organs of slaughtered animals. *Bull. Acad. Vet. Fr.* 36: 175-182.
- 28) PRESCOTT J. F., BAGGOT J. D. (1988) Antibiotic Residues, p 341-346. In *Antimicrobial Therapy in veterinary medicine*. Blackwell Scientific Publications, Inc., Boston.
- 29) Regolamento U.E. 2377/90. *Off. J. Eur. Communities L 224*: 1-8.
- 30) Regolamento C.E. 1436/98 *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* 191: 15 del 07/07/98
- 31) ROSE M. D., SHEARER G., FEARRINGTON W. HH. () The thermal stability and effect of cooking on veterinary drug residues in food. Proceedings of the EuroResidue III conference
- 32) SPENCER G. R. (1950) Recent progress in mastitis control. *J. Milk Food Technol.* 13: 44-49.
- 33) STEPHANY R. W. (1990) Quality criteria in veterinary drug residue analysis. Proceedings of the EuroResidue Conference, Noordwijkerhout, The Netherlands, 21-23 May.
- 34) STOLTZ E. I., HANKINSON D. J. (1953) Antibiotics and lactic acid starter cultures. *Appl. Microbiol.* 1: 21-29.
- 35) VAN SCHOTHORST M. (1965) Study about the occurrence of antibiotic residues in normal slaughter animals. *Tijdschr. Diergeneesk.* 90: 579-582.
- 36) WILSON C. D. (1964) The use of antibiotics in the control of mastitis. *Proc. R. Soc. Med.* 57: 1088-1090.
- 37) WOODWARD K. N. (1998) The use of microbiological end-points in the safety evaluation and elaboration of maximum residue limits for veterinary drugs intended for use in producing animals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* Feb.; 21(1): 47-53.

## LOW-FAT MORTADELLA: EXPERIMENTAL FORMULATIONS WITH SOME FAT SUBSTITUTES

Zanardi E.<sup>\*</sup>, Novelli E.<sup>\*\*</sup>, Campaninni G.<sup>\*</sup>, Madarena G.<sup>\*</sup>, Chizzolini R.<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> *Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma, via del Taglio 8, 43100 Parma, Italy.*

<sup>\*\*</sup> *Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Agripolis, 35020 Legnaro, Padova, Italy.*

The research has been financed by the European Commission (Contract AIR-CT93-1691).  
Thanks are due to Mrs E. Campesato and Mr C. Damaschi for their technical support.

### Introduction

Mortadella is a finely minced cooked pork product obtained from lean cuts, such as shoulders and trimmings, mixed with emulsified fat, fat cubes obtained from the subcutaneous layer of the cheek and the neck (streaky bacon) and other additives. With the name of Mortadella Bologna it has been recognised as a D.O.P. product and it has been defined in a standard regulation (UNI, 1996).

Its fat content ranges from 25% to 30% according to type and quality level. With such a fat content it has raised the concerns of nutritionally minded consumers and, therefore, the interest towards changes in composition, and the possible adaptations in production technology, has increased in latest years.

As mentioned in a previous paper dealing with fat reduction in salame Milano (Zanardi et al., 1998a), according to international medical institutions dietary fat intake should be controlled both as quantity of calories and as type of fatty acids introduced. Nutritional guidelines suggest that dietary fat should provide between 15 and 30% of total calories and that saturated fats should be limited between 0 and 10% of caloric intake (WHO, 1990). Limitation in fat intake is thought to play a preventive role against various chronic disorders, such as obesity and coronary heart diseases, and some types of cancers (Flatt, 1993; Reddy, 1995).

Fat imparts a wide range of characteristics to foods, including desirable appearance, flavour, aroma, texture and mouthfeel and, therefore, reducing fat is not simply a matter of using less of it in the formulation. The production of low-fat meat products follows two main approaches: use of leaner raw materials or reduction of fat and calories by adding water and other ingredients with little or no calorie content. The first choice depends on the availability of suitable raw materials in term of composition and functionality. The reduction of fat levels in meat raw materials can be obtained through genetic and dietary modifications and/or through a number of physical techniques. Most of the currently available fat substitutes can be divided in three categories: protein-based (soy, surimi, dairy proteins, gluten, etc), carbohydrate-based (gums or hydrocolloids like carrageenans, alginates, starches, dextrans, cellulose derivatives) and fat-based substances (structured lipids, sucrose polyesters). Each of the fat mimetics has different functional properties that provide both advantages and limitations for specific applications.

On the lines of the previous study on salame Milano (Zanardi et al., 1998a), an investigation has been planned to test the possibility of producing mortadella with a fat content of about half the level of standard products. Mortadella can be considered representative of minced cooked ready to eat pork foods, e.g. frankfurter-type products, both as fat content and as production technology. For all of them the main problem is to maintain their typical quality attributes, otherwise low-fat items will not be accepted by the consumers.

The study included the measurement of peroxide number, TBARs and cholesterol oxidation products, due to the importance presently attributed to lipid oxidation for quality and human health reasons.

### Materials and methods

The technology that has been adopted to produce the different batches of mortadella has been described by Novelli et al. (1998). In detail, mortadella of normal fat content was produced in batches of 100kg each by mincing deboned shoulders (40%), porcine stomachs (25%) and 10% of fat emulsion (ice/fat/caseinate, 5/5/1). The minced raw materials were mixed with lard cubes from the streaky bacon (25%), salt (2.15%), saccharose (1.28%), sodium caseinate (1.00%), polyphosphates (0.3%), sodium nitrite 50% in NaCl (0.2%), sodium ascorbate (0.1%), black pepper (0.1%), white pepper (0.04%), garlic (0.03%), nutmeg (0.02%) and mace (0.025%). The final batter was stuffed in 15cm diameter artificial casings (Viscosa) (15kg approximately per piece). Cooking took place in dry ovens, set at 85°C, up to 72°C core temperature and was followed by cooling under water sprays and refrigeration in cold rooms at 4°C. Such a recipe was considered as representative of standard production for mortadella with a fat content of about 25%.

The recipe of a standard product was modified in various ways to test the possibility of different substances to reduce fat content below 20% and down to about 15%.

Standard lard cubes quota (i.e. 25%) was reduced to values ranging from 15% to 10%. The aim was that of preserving as much as possible the traditional aspect of cut surfaces while, at the same time, reducing the total amount of fat present. In such a way, though, fat content could only be reduced of a maximum value of about 5% since lard cubes provide approximately 10% fat to the final product.

A bigger amount of fat comes from the fat emulsion and the fat carried by shoulders. This type of fat, dispersed in the batter, was reduced by using ham trimmings as lean cuts instead of shoulders and by eliminating the fat emulsion. Ham trimmings were cleaned from visible fat and used in combination with porcine stomachs (rich in connective tissue and with a fat content of about 1%). Since the formulations based on ham trimmings and porcine stomachs tended to be paler than average, pig tongue was introduced in two formulations to improve the colour due to its high pigment content. In other formulations sandalwood extract was added to the batter for the same purpose.

Fat substitutes, such as gelatinised rind, carrageenans (Sanofi, RP 15), starch (Tapiak, Tapiocaline CR 521), soya (Protein Technology International 545) and milk proteins, were used in various percentages in the formulations to improve the organoleptic quality of low fat mortadella.

Low fat formulations were mixed with the same additives and cooked to the same core temperature as the standard formulation. The only difference has been the introduction of sandal wood extract as mentioned above. The general plan of the formulations is presented in Table 1.

TABLE 1. Formulations of low-fat mortadella

INGREDIENTS	FORMULATIONS						
	1	2	3	4	5	6	7
Shoulder lean	40	20	30	20	20	25	20
Ham trimmings		20	20	20			
Pig stomachs	25	20	25	25	25	20	20
Lard cubes	25	10	10	10	15	15	12
Fat emulsion	10						
Pig tongue		10			15		
Gelatin emulsion		10	15	15			10
Caseinate		2		2	2	2	
Skimmed milk						2	4
Carrageenans					2		
Starch						9	6
Soya proteins						2	4
Ice							9
Water		8		8	21	25	15
Sandalwood extract			0.1	0.1		0.1	0.1

All types of mortadella were subjected to standard analyses, such as chemical composition, NaCl, pH, colour measurement (Chizzolini et al., 1996), lipid oxidation (peroxide value, TBARS, cholesterol oxides) (Zanardi et al., 1998b) and sensory evaluation (Table 2).

TABLE 2. Sensory evaluation form

CHARACTERS	SCORES
Fat Pockets	(1= absent; 5= very many)
Gelatin Pockets	(1= absent; 5= very many)
Small Holes	(1= absent; 5= very many)
Lard Cubes Adhesion	(1= absent; 5= very good)
Lard Cubes Distribution	(1= not uniform; 5=very uniform)
Smoothness	(1= wrinkled; 5= smooth)
Fat Smear	(1= absent; 5= excessive)
Brightness	(1= opaque; 5= shiny)
Colour	(1= very light pink; 5= hazel-brown)
Firmness (by chewing)	(1= very low; 5= very high)
Flavour	(1= very bland; 5= intense)
Objectionable Flavour	(1= absent; 5= intense)
Cohesiveness	(1= very low; 5= very high)
Overall Acceptability	(1= not acceptable; 5= very acceptable)

## Results and discussion

The trials for low fat mortadella were based on a standard formulation that was kept as a reference point especially for sensory quality parameters. The tests aimed not only at reducing fat content but were planned also to evaluate the possibility of producing formulations which could maintain the commercial name of mortadella. Only in some formulations, therefore, unconventional ingredients were tested. In two cases (formulations 2 and 5), the tongue has been employed to test its ability to improve the colour of experimental mortadella. Caseinate was introduced in some formulations (2, 4, 5 and 6) for its emulsifying and water binding properties. Of the various trials carried out those which gave acceptable products are reported in Table 3.

TABLE 3. Chemical parameters of low-fat mortadella

Formulation	Moisture %	Protein %	Fat %	Ash %	NaCl %	pH
1	53.09	16.12	25.33	3.76	2.98	6.42
2	61.20	16.47	16.58	3.94	2.92	5.90
3	57.73	17.79	19.41	3.98	3.28	5.73
4	61.09	16.29	17.18	3.90	2.98	5.98
5	58.87	14.90	20.24	4.26	3.34	6.45
6	53.27	15.93	16.31	4.19	3.16	5.92
7	56.47	16.21	13.84	4.25	3.10	6.00

The formulations 2, 3 and 4 have been based on the use of lean trimmings of fresh hams as partial substitute for shoulders, the latter having a fat content around 15% compared with about 5% of the former. A significant amount of gelatin emulsion obtained from rind was also employed to preserve the smoothness and the right level of cohesiveness and firmness of good quality mortadella that could be impaired by the decrease of fat content.

With such formulations it has been possible to produce technologically viable mortadella with a fat content ranging from 16.58% to 19.41%, without employing ingredients not allowed in normal products. In formulations 2 and 4 (with sodium caseinate) water content was above 60% and, correspondingly, protein and fat content were lower than in formulation 3. Sodium chloride was also higher in formulation 3 whereas the pH value was lower. All three formulations had pH values significantly lower than standard formulation 1.

Compositional changes had some effects on colour measurements (Table 4). Formulation 4 (sodium caseinate without tongue) had the highest L\* values (of all formulations reported), the lowest a\* and highest b\* values (among formulations 2, 3 and 4). Consequently in the same formulation, Saturation was lowest of all seven formulations and Hue higher than formulations 1, 2 and 3. The results clearly indicate that the colour was light and had a yellow/brown shade. Sensory evaluations confirmed such measurements as can be seen from Table 5. Formulation 4 had the highest brightness and the lowest colour scores. Formulation 2 had a colour score higher than formulation 1, a proof that the use of tongue had positive effects on such a quality parameter. The presence of sandal wood extract, instead, did not appear to be sufficient to improve colour scores.

TABLE 4. Colour measurements of low-fat mortadella.

Formulation	L*	a*	b*	Saturation	Hue angle
1	63.95±0.36	14.82±0.24	13.49±0.20	20.04±0.15	0.74±0.01
2	63.48±1.29	15.33±0.71	10.63±0.47	18.66±0.49	0.61±0.04
3	64.83±0.67	12.08±0.23	10.97±0.58	16.31±0.47	0.74±0.03
4	67.73±0.42	9.37±0.30	12.37±0.38	15.52±0.44	0.92±0.01
5	58.43±1.49	15.95±0.61	14.29±0.49	21.41±0.74	0.73±0.01
6	58.64±1.28	11.68±0.43	18.48±0.23	21.86±0.34	1.01±0.02
7	62.43±0.32	10.10±0.18	17.18±0.44	19.93±0.37	1.04±0.02

TABLE 5. Sensory evaluation scores of low-fat mortadella (Mean±S. D.)

	1	2	3	4	5	6	7
Fat Pockets	1.38±0.64	1.12±0.33	1.71±1.06	1.33±0.58	1.13±0.46	1.62±0.67	1.81±0.87
Gelatin Pockets	1.12±0.33	1.35±0.63	1.33±0.66	1.38±0.74	1.70±1.02	1.14±0.36	1.19±0.40
Small Holes	1.73±0.78	1.23±0.51	1.43±0.87	2.14±0.65	1.87±0.97	1.90±0.83	2.76±1.00
Lard Cubes Adhesion	3.81±0.85	4.00±0.80	3.90±1.09	3.86±0.91	3.30±1.15	3.38±1.12	3.38±0.86
Lard Cubes Distribution	3.42±0.81	2.35±1.06	2.62±0.86	2.14±1.06	2.91±1.08	3.33±1.20	2.29±0.72
Smoothness	3.35±0.69	2.81±1.10	3.62±0.59	3.90±0.77	2.30±0.88	2.62±0.80	2.43±0.81
Fat Smear	2.35±1.02	2.04±1.00	2.48±0.93	1.86±0.85	1.70±0.70	1.95±0.74	2.33±0.66
Brightness	3.38±0.63	1.88±0.82	3.00±0.77	3.00±0.89	2.65±0.88	2.05±0.74	2.05±0.67
Colour	3.65±0.69	3.96±0.72	2.38±0.67	1.52±0.68	3.04±0.56	3.52±0.51	3.05±0.38
Firmness (by chewing)	3.19±0.90	2.77±0.82	2.86±0.65	1.95±0.74	3.35±0.49	2.81±0.68	3.33±0.58
Flavour	3.23±1.21	3.85±0.78	2.52±0.51	1.81±0.75	2.96±0.71	4.19±0.51	3.71±0.72
Objectionable Flavour	1.42±0.50	1.77±1.24	1.67±0.86	1.43±0.60	1.48±0.67	4.05±0.74	2.95±1.02
Cohesiveness	3.62±0.90	3.72±0.89	3.43±0.81	2.86±0.96	3.43±0.90	3.14±1.01	3.62±0.86
Overall Acceptability	3.65±0.85	1.92±0.48	3.19±0.60	2.71±0.85	2.74±0.69	1.81±0.81	1.86±0.79

Sensory evaluations of formulations 2, 3 and 4 did not show many other significant differences among such formulations, neither did they differ significantly for important parameters from formulation 1. Some of these deserve mentioning. Small holes increased, fat smears, firmness and flavour decreased in formulation 4 (sodium caseinate without tongue). Overall acceptability was lower in formulation 2, probably due to low flavour scores.

The formulations 5, 6 and 7 represent the trials aimed at testing new ingredients and the possibility of lowering fat content below 15%. Such formulations, therefore, besides milk proteins, made use of carrageenans, starch and soya proteins. Ham trimmings were left out as other fat-less protein based ingredients were used.

Compositional data varied among the three formulations 6, 7 and 8. Water content was lower in formulation 6 in which the highest amount of starch had been used. The lowest fat content (13.84%) was found in formulation 7 in which gelatin emulsion, skimmed milk, starch and soya proteins had been introduced. Sodium chloride values were above 3% in all three formulations and higher than any of the previous four formulations. Colour measurements (Table 4) have shown that L\* values were lower than those of formulations 1-4, especially in the case of formulations 6 and 7. The lowest a\* and highest b\* values have been found in formulations 7 and 6, saturation and hue were high because of the high b\*, a clear indication of a colour of a yellow/brown type. Both such formulations had been added with sandal wood extract but not with tongue. Formulation 5 (with tongue), on the other hand, had colour parameters (a\*, b\*, saturation and hue) very similar to those of formulation 1.

Sensory evaluations of formulations 5, 6 and 7 pointed out, in particular, the high levels of small holes in formulation 7, the lower levels of smoothness in all three formulations compared with the other four ones and problems of flavour in formulations 6 and 7. The peculiar characters of formulation 6 were the high scores for flavour and objectionable flavour, probably a consequence of the use of high doses of starch and soya proteins. As a result, the acceptability came out to be rather low. Formulation 7 has been the leanest among the formulations tested. The addition of gelatin emulsion and the lower amount of starch were probably the reason for better scores for flavour and objectionable flavour but acceptability was not optimal.

Lipid oxidation measurements were carried out to verify that new ingredients would not, at least, have negative effects on lipid stability. Peroxide and TBARS values of low-fat formulations (Table 6) were rather variable but the range of the data obtained was in line with the results previously reported in commercial full fat samples or other types produced for experimental reasons (Ghiretti et al., 1997; Novelli et al., 1998).

TABLE 6. Peroxide (P.V.) (meq O<sub>2</sub>/kg fat) and TBARS (mg MDA/kg fresh tissue) values of low-fat mortadella (mean values of two samples).

Formulation	P.V.	TBARS
1	0.96	0.18
2	3.12	0.25
3	2.40	0.43
4	2.20	0.42
5	2.21	0.21
6	4.35	0.32
7	3.67	0.15

Similar considerations can be made for cholesterol oxidation products (Table 7). The only oxide observed in all samples was 7-ketocholesterol. 25-hydroxycholesterol has been found in just one sample, 5,6 $\alpha$ -epoxycholesterol was observed in two samples and the remaining oxides (7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol) in about half the samples. The maximum value observed has been 6.77  $\mu$ g/g of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol in formulation 4. Total cholesterol oxidation was below 0.2% in all samples but one, and only in formulation 4 such parameter reached a value near 1%. The range of cholesterol oxidation was

in line with the results obtained in other investigations both of mortadella and of other fresh and processed meats (Ghiretti et al., 1997; Novelli et al., 1998; Zanardi et al., 1998b; Zanardi et al., 1999).

TABLE 7. Cholesterol (mg/100g of sample) and cholesterol oxides content ( $\mu\text{g/g}$ ) of low-fat mortadella (mean values of two samples) (N.D.= lower than the detection limit).

Formulation	Cholesterol	7 $\beta$ -OH-	5,6 $\alpha$ -epoxy-	20 $\alpha$ -OH-	7-keto-	25-OH-	Total COFS	Cholesterol oxidation %
1	0.28	N.D.	N.D.	0.78	0.54	N.D.	1.60	0.12
2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.14	N.D.	0.14	0.01
3	0.33	N.D.	N.D.	0.85	0.29	N.D.	1.47	0.11
4	6.77	0.38	0.48	2.82	1.14	N.D.	11.59	0.94
5	0.23	N.D.	N.D.	0.79	0.38	N.D.	1.39	0.10
6	0.82	N.D.	N.D.	N.D.	0.43	N.D.	1.25	0.13
7	N.D.	0.27	1.05	0.12	N.D.	N.D.	1.44	0.12

Total cholesterol content varied from a minimum of 98mg/100g (formulation 6) to a maximum of 134mg/100g (formulation 5). The formulations with the lowest cholesterol content were number 2 and 6 followed by formulation 7, those in which pig stomachs content was 20% compared with a standard value of 25%. Such an ingredient has high cholesterol content (about 140mg/100g) compared with the tongue (about 87mg/100g), the backfat (about 54mg/100g), the streaky bacon (about 60mg/100g) and pork lean (between 50 and 60mg/100g) (Chizzolini et al., 1999).

In conclusion, the technological feasibility of producing mortadella with a low fat content has been proved. Most formulations were found to be acceptable at the sensory evaluation, but some characters, like colour or flavour, appeared to specifically need attention to avoid falling below normal levels.

Key words: mortadella, low-fat, quality, technology.

Parole chiave: mortadella, riduzione grasso, qualità, tecnologia.

SUMMARY - An investigation has been conducted to test the feasibility of producing mortadella with a low fat content. The research has shown that it is possible to produce mortadella with a fat content down to about 16% without using substances not normally employed for such a cooked pork product. With the help of fat substitutes, such as milk proteins, carrageenans and soya proteins, a fat content just lower than 14% has been obtained. Quality characteristics, for instance colour and flavour, were negatively affected in some cases but, overall, it appeared that satisfactory formulations can be made. The determination of peroxide value, TBARS and cholesterol oxides has shown that there is no oxidation risk.

RIASSUNTO - È stata studiata la possibilità di produrre mortadelle a basso contenuto di grasso sia variando la quantità relativa di ingredienti normalmente utilizzati sia introducendo nelle formulazioni materie prime non convenzionali. Le prove fatte hanno dimostrato che è possibile raggiungere un contenuto di grasso di circa il 16% senza utilizzare ingredienti non consentiti nella produzione della mortadella. Una ulteriore riduzione, fino a poco meno del 14% è possibile con l'uso di proteine del latte, della soia e polisaccaridi gelificanti (carragenine). Le caratteristiche organolettiche in alcuni casi hanno presentato delle carenze, specie per quanto concerne il colore e l'aroma, ma in generale i risultati possono essere considerati soddisfacenti. Le misure relative alla ossidazione dei lipidi hanno dimostrato che non vi sono problemi in questo ambito.

## Bibliografia

- Chizzolini R., Novelli E., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Zanardi E., Pacchioli M.T., Rossi A. (1996) Lean colour of green and mature Parma hams: comparative evaluation and technological relevance of sensory and objective data. *Meat Science*, 44, 159-172.
- Chizzolini R., Zanardi E., Dorigoni V., Ghidini S. (1999) Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 119-128.
- Flatt J.P. (1993) The impact of dietary fat and carbohydrates on body weight maintenance, in *Low-Calorie Foods Handbook* (ed. A.M. Altschul). Marcel Dekker, New York, pp. 441-477.
- Ghiretti G.P., Zanardi E., Novelli E., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R. (1997) Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadella production. *Meat Science*, 47, 167-176.
- Novelli E., Zanardi E., Ghiretti G.P., Campanini G., Madarena G., Chizzolini R. (1998) Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella. *Meat Science*, 48, 29-40.
- Reddy B. S. (1995) Nutritional factors and colon cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 175-190.
- UNI (1996) Ente Italiano di Unificazione, Norma 10438.
- WHO (World Health Organization) Study Group (1990). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. *WHO Technical Report Ser. 797*.
- Zanardi E., Novelli E., Dorigoni V., Ghiretti G.P., Barbuti S., Chizzolini R. (1998a) Low-fat salame Milano: experimental formulations with some fat substitutes. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Parma*, 18, 173-183.
- Zanardi E., Novelli E., Nanni N., Ghiretti G.P., Del Bono G., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R. (1998b) Oxidative stability and dietary treatment with vitamin E, oleic acid and copper of fresh and cooked pork chops. *Meat Science*, 49, 309-320
- Zanardi E., Novelli E., Ghiretti G. P., Chizzolini R. (1999) Lipids and cholesterol oxidative stability in salame Milano, coppa and Parma Ham: dietary supplementation with vitamin E and oleic acid. *Meat Science*, 55, 169-175.

## EFFETTO ANTIOSSIDANTE DELLA VITAMINA E NEL SALAME MILANO

Zanardi E.\* , Novelli E.\*\* , Dazzi G.\* , Chizzolini R.\*

\* *Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma, via del Taglio 8, 43100 Parma, Italy.*

\*\* *Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Agripolis, 35020 Legnaro, Padova, Italy.*

Ricerca effettuata con il contributo finanziario del Ministero della Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (Cofinanziamento Ric. Ril. Int. Naz. 1997, Progetto Nazionale: Sistemi di allevamento sostenibili e qualità delle produzioni animali).

Si ringraziano i Sigg. E. Campesato e C. Damaschi per la collaborazione prestata.

### Introduzione

Le tecnologie di lavorazione dei prodotti carnei possono attivare i fenomeni ossidativi dei grassi attraverso vari meccanismi. In particolare le operazioni di macinatura, miscelazione con sale ed additivi, cottura e/o stagionatura prolungata comportano un aumento dell'esposizione all'ossigeno atmosferico e all'azione di catalizzatori della ossidazione (Gray et al., 1996). Il cloruro di sodio svolge una azione pro ossidante soprattutto, sembra, tramite la liberazione degli atomi di ferro dal gruppo prostetico della mioglobina (Kanner, 1994). I nitriti agiscono come antiossidanti in seguito alla formazione dell'ossido di azoto che stabilizza il ferro della mioglobina e, per via indiretta, previene l'ossidazione dei lipidi polinsaturi di membrana (Freybler et al., 1993; Kanner, 1994; Skibsted, 1992).

I fenomeni ossidativi interessano principalmente gli acidi grassi polinsaturi, componenti strutturali delle membrane, con possibili effetti sia negativi (rancidità) che positivi (aroma) sulla qualità dei prodotti finiti (Gray et al., 1996). L'ossidazione degli acidi grassi insaturi e del colesterolo può avere ripercussioni importanti sulle caratteristiche nutrizionali dei prodotti di carne non solo per la diminuzione del contenuto di vitamine ad attività antiossidante quali la vitamina E, A e C, ma anche per la possibile formazione di molecole tossiche come alcune aldeidi e alcuni ossidi del colesterolo (Kubow, 1990; Paniangvait et al., 1995).

Da qualche tempo viene proposto di potenziare le riserve antiossidanti dei tessuti muscolari degli animali da carne tramite l'integrazione alimentare con vitamina E (Buckley et al., 1995; Morrissey et al., 1998).

La sperimentazione che è stata condotta aveva lo scopo di valutare gli effetti di un aumento del contenuto di vitamina E nelle carni sulla stabilità ossidativa dei prodotti fermentati. A questo fine è stato scelto il salame Milano come rappresentativo dei prodotti di salumeria macinati, fermentati e sottoposti a stagionatura prolungata.

### Materiali e metodi

Sono stati prodotti tre lotti di salame Milano utilizzando le materie prime ottenute dai suini allevati e macellati come descritto da Zanardi et al. (1998). Si trattava, in breve, di 72 suini femmina, di razza Large White, equamente suddivisi in tre trattamenti dietetici differenti per contenuto di vitamina E, vale a dire un gruppo di controllo (dieta 1), un gruppo in cui la dieta base è stata integrata con 100 ppm di tocoferolo acetato (dieta 2) e un terzo gruppo in cui la dieta base è stata integrata con 200 ppm di tocoferolo acetato (dieta 3).

Il salame Milano è stato prodotto utilizzando le spalle, le rifilature di prosciutto e la pancetta secondo la seguente formulazione. I tagli magri (70%) e grassi (30%) sono stati macinati ad una grana di 3,5 mm, mescolati con sale (2,8%), latte scremato in polvere (1,8%), destrosio (0,5%), ascorbato (0,05%), nitrito (150 ppm), nitrito (50 ppm) e aromi e successivamente insaccati in budelli Fibran di 6,5 cm di diametro. La fase di asciugatura dei salami è stata condotta per 12 ore a 23 °C senza controllo dell'umidità relativa (UR) e per 18 ore a 20 °C e UR media del 60%. Nei successivi 10 giorni la temperatura della cella è stata gradualmente diminuita a 11-12 °C e l'umidità relativa aumentata fino a 85%. Queste ultime condizioni di temperatura e UR sono state mantenute fino alla fine della stagionatura (4 mesi).

La composizione centesimale e il contenuto di cloruro di sodio sono stati determinati secondo le metodiche pubblicate dall'A.O.A.C. (1990). L'azoto non proteico è stato determinato secondo la procedura descritta da Bellatti et al. (1983). Il pH è stato misurato su omogenati costituiti da 3 g di campione e 30 ml di acqua distillata. I nitriti residui sono stati determinati secondo la procedura proposta da Slack (1987).

La metodica utilizzata per la determinazione della vitamina E è quella descritta da Buttriss e Diplock (1984) modificata per la parte relativa all'estrazione a causa di problemi legati al maggior contenuto di grasso. Per questi prodotti, 2,5g di campione macinato sono stati addizionati di 100 ml di una soluzione di pirogallolo 0,5% in alcool etilico assoluto e sottoposti ad agitazione magnetica per 30 minuti. La saponificazione è stata condotta con 20 ml di KOH acquoso al 50% lasciando i palloni al buio ed in agitazione tutta la notte. L'estrazione della vitamina E è stata effettuata in imbuto separatore con 40 ml di esano per due volte. La fase esanica è stata lavata con 30 ml di acqua distillata, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed evaporata non completamente in rotavapor. Il residuo della fase esanica, trasferito in una fiala da 10 ml con tappo a vite è stato evaporato completamente in corrente di azoto e ripreso con 5 ml di alcool etilico per HPLC.

Il numero di perossidi e le TBARS (thiobarbituric reactive substances) sono stati determinati come descritto da Novelli et al. (1998).

Il colesterolo totale è stato determinato secondo la procedura di Adams et al. (1986) mentre la procedura di analisi degli ossidi del colesterolo ha richiesto l'estrazione dei lipidi totali (Marmer e Maxwell, 1981), il frazionamento e l'estrazione in fase solida degli ossisteroli (Park e Addis, 1985), la derivatizzazione e la successiva analisi mediante gas-cromatografia e spettrometria di massa (Zanardi et al., 1998).

La determinazione delle aldeidi è stata effettuata seguendo la metodica di Reindl e Stan (1982) basata sulla reazione tra aldeidi e 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNP) per formare i 2,4-dinitrofenilidrazoni che sono determinati mediante HPLC.

## Risultati

I dati della composizione centesimale del salame Milano sono in linea con quanto noto per questo tipo di prodotto e non mostrano differenze apprezzabili tra i gruppi a diversa alimentazione (Tab.1). Le variazioni riscontrate nel contenuto d'acqua, proteine e grasso rientrano nell'intervallo previsto dalle norme di unificazione (UNI, 1993) e non sono comunque in relazione alle diete. E' stata osservata una sostanziale uguaglianza tra i gruppi anche per pH, contenuto di sale, azoto non proteico e nitriti residui (Tab. 2).

Tabella 1. Composizione centesimale del salame Milano.

Dieta	Umidità %	Proteine %	Grasso %	Ceneri %
1	34,61±1,46	29,64±1,20	30,09±0,86	5,69±0,27
2	36,77±1,69	28,30±1,39	29,69±0,70	5,58±0,13
3	36,38±2,94	28,47±1,46	29,32±2,27	5,42±0,23

I valori sono espressi come Media±Dev.Stand.

Tabella 2. Contenuto di NaCl (%), pH, azoto non proteico (A.N.P.= % azoto totale) e nitriti residui (ppm) del salame Milano.

Dieta	NaCl	pH	A.N.P	Nitriti residui
1	4,41±0,25	5,63±0,45	13,06±2,13	4,13±0,75
2	4,24±0,26	5,67±0,30	14,14±1,07	5,44±1,46
3	4,19±0,51	5,65±0,32	14,90±1,43	4,91±1,58

I valori sono espressi come Media±Dev.Stand.

La determinazione della vitamina E nel salame stagionato (Tab. 3) ha confermato le differenze significative tra i gruppi, differenze che permangono anche se i valori sono espressi sul tessuto secco e senza il sale, anche se in quest'ultimo caso i gruppi due e tre si avvicinano e portano i valori assoluti a livelli simili a quelli osservati nelle bracirole sottoposte a cottura.

Tabella 3. Contenuto di vitamina E del salame Milano.

Dieta	Vitamina E	
	mg/kg tessuto tal quale	mg/kg tessuto secco senza NaCl
1	3,91±0,29 <sup>c</sup>	6,45±0,71 <sup>c</sup>
2	9,73±1,15 <sup>b</sup>	16,73±2,23 <sup>ab</sup>
3	11,46±0,97 <sup>a</sup>	19,65±2,06 <sup>a</sup>

I valori sono espressi come Media±Dev.Stand.

<sup>a,b,c</sup> valori medi con apice diverso differiscono significativamente al test di Scheffè (P≤0.05)

I livelli di vitamina E del salame, se confrontati con quelli del muscolo fresco o cotto (Zanardi et al., 1998), sembrano essere bassi se riferiti al diverso contenuto di grasso (30% nel salame e 3% nel muscolo fresco) e in considerazione delle caratteristiche di liposolubilità della vitamina. La mancanza di misure sugli impasti freschi non consente di dare una risposta precisa a tale dubbio. Si può avanzare l'ipotesi, tuttavia, di un consumo della vitamina conseguente allo stress ossidativo causato dal processo tecnologico.

I valori del numero di perossidi (N.P.) e delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) sono presentati in Tabella 4. I perossidi, espressione del livello d'ossidazione primaria, si attestano su valori molto simili a quelli precedentemente osservati in salami Milano prelevati dal commercio (Novelli et al., 1998), indicano un grado di ossidazione contenuto e non mostrano differenze significative tra i trattamenti. I valori delle TBARS si pongono ai livelli più bassi osservati nella sperimentazione appena citata (Novelli et al., 1998) e, diversamente dal numero di perossidi, sembrano suggerire la possibilità di un maggiore controllo dell'ossidazione nei salami dei gruppi ad integrazione alimentare con vitamina E, anche se le differenze non sono significative. Merita di essere sottolineato, tuttavia, che i valori di TBARS delle bracirole fresche e cotte (Zanardi et al., 1998) sono significativamente inferiori a quelli riscontrati nel salame, un dato che dimostra chiaramente il rischio ossidativo legato al processo tecnologico di produzione del salame stagionato. Nonostante l'esistenza di tale rischio i risultati ottenuti mostrano livelli d'ossidazione inferiori a quelli considerati necessari per la comparsa di odori sgradevoli di tipo rancido nella carne fresca (0.5mg MDA/kg) (Lanari et al., 1995) o cotta (1.0mg MDA/kg) (Igene et al., 1979). L'impiego di additivi ad attività antiossidante, come i nitriti, ha certamente contribuito a controllare l'ossidazione lipidica (Skibsted, 1992; Freybler et al., 1993).

TAB. 4. Valori del numero di perossidi (N.P.) (meqO<sub>2</sub>/kg grasso) e di TBARS (mg MDA/kg) del salame Milano.

Dieta	N.P.	TBARS
1	3,2±2,3	0.40±0.12
2	5,1±4,3	0.27±0.13
3	4,4±3,9	0.24±0.07

I valori sono espressi come Media±Dev.Stand.

Il contenuto delle aldeidi (Tab. 5) è più elevato rispetto alla carne cotta (Zanardi et al., 1998) ma, ancora una volta, la variabilità dei campioni non consente di rilevare differenze significative tra i diversi trattamenti dietetici riuniti in base all'integrazione vitaminica. Si delinea, in ogni modo, la tendenza a valori più bassi nel gruppo di controllo rispetto ai trattati per il pentanale, l'esanale, l'eptanale, il 2-ottenale, l'ottanale, il nonanale ed il decanale. Nel salame Milano è stato identificato e quantificato il pentanale, un'aldeide a catena molto corta, che non è stata rilevata nel Longissimus dorsi. Il lungo periodo di stagionatura del salame fa sì che l'attività idrolitica degli enzimi endogeni e microbici (lipasi e fosfolipasi) dia origine ad una vasta gamma di acidi grassi liberi, provenienti da trigliceridi e fosfolipidi, che fungono da substrato per l'ossidazione e dai quali hanno origine molecole carboniliche di vario genere. L'aldeide presente in maggior quantità, anche nel salame, è l'esanale, un composto considerato significativo indicatore dello stato di ossidazione generale dei lipidi. Tale risultato è in accordo con uno studio sulla composizione dell'aroma del salame Milano, effettuato mediante la tecnica analitica dello spazio di testa dinamico, in cui è stato osservato che l'esanale è il composto prevalente nella classe delle aldeidi (Meynier et al., 1999).

Tabella 5. Contenuto di aldeidi (nmol/kg tessuto) del salame Milano.

Aldeidi	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Pentanale	774,2±121,7	972,6±421,0	827,2±378,5
Esanale	3169,2±653,7	3840,3±2672,0	4435,1±3711,3
Eptanale	299,5±87,0	467,1±305,0	488,9±381,4
2-ottanale	218,3±73,7	374,8±261,1	246,8±189,7
Ottanale	209,0±78,9	382,0±359,8	448,5±344,4
2-nonanale	263,5±47,6	283,0±187,4	221,7±152,2
2,4-decadienale	532,2±117,1	362,2±342,3	286,9±288,5
Nonanale	325,4±161,1	624,1±569,0	761,7±642,9
Decanale	137,0±6,7	182,7±160,7	221,2±175,5

I valori sono espressi come Media±Dev.Stand.

La determinazione degli ossidi del colesterolo (Tab. 6) ha messo in evidenza il 7 $\beta$ -idrossicolesterolo, il 5,6 $\alpha$ -epossicolesterolo e il 7-chetocolesterolo mentre non sono stati rilevati i prodotti di ossidazione della catena laterale idrocarburica del colesterolo. Il gruppo di ossidi identificato non differisce da quello di 14 salami Milano commerciali nei quali, solo in tre casi, è stata rilevata la presenza anche del 25-idrossicolesterolo (Novelli et al., 1998). I valori assoluti non raggiungono in nessun caso 1 ppm e sono compresi negli intervalli 0,10-0,56  $\mu$ g/g tessuto per il 7 $\beta$ -idrossicolesterolo, 0,07-0,26  $\mu$ g/g tessuto per il 5,6 $\alpha$ -epossicolesterolo e 0,08-0,52  $\mu$ g/g tessuto per il 7-chetocolesterolo. I valori assoluti più elevati si registrano nei salami del gruppo di controllo che, in ogni caso, non differisce in modo significativo dagli altri a causa dell'elevata variabilità. La percentuale di ossidazione globalmente considerata varia da un massimo dello 0,12 % nel gruppo di controllo allo 0,04 % dei gruppi ad integrazione vitaminica.

TABLE 6. Contenuto di colesterolo (mg/100g) e ossidi del colesterolo ( $\mu$ g/g tessuto) del salame Milano.

Dieta	Colesterolo	7 $\beta$ -idrossicol.	5,6 $\alpha$ -epossicol.	7-chetocol.	% Colester. ossidato
1	110.5± 8.9	0.56±0.84	0.23± 0.21	0.52± 0.71	0.12± 0.10
2	96.8± 4.6	0.10±0.08	0.10± 0.09	0.19± 0.23	0.04± 0.02
3	94.8± 4.7	0.11±0.06	0.19± 0.17	0.12± 0.08	0.04± 0.02

I valori sono espressi come Media±Dev.Stand.

Concentrazioni di ossisteroli di tale entità si avvicinano alle dosi minime che hanno manifestato tossicità su colture cellulari e sono almeno 100 volte inferiori alle dosi utilizzate in esperimenti in vivo per indurre fenomeni aterosclerotici. Böisinger et al. (1993) hanno riferito che soluzioni di ossidi del colesterolo 10-6M sono in grado di alterare il metabolismo cellulare e le funzioni di membrana inibendo la sintesi del colesterolo e del DNA in colture cellulari. Le dosi utilizzate per verificare l'aterogenicità degli ossisteroli in vivo sono molto superiori alle concentrazioni che si trovano negli alimenti. In conigli di razza New Zealand White l'iniezione endovenosa di 40 mg/kg dell'animale/giorno di tridrossicolesterolo, 25-idrossicolesterolo e 5,6 $\alpha$ -epossicolesterolo per tre giorni consecutivi provoca l'incremento della necrosi delle cellule muscolari lisce dell'aorta e, prolungando il trattamento per due settimane, si nota la formazione di vere e proprie placche fibrose. Anche somministrazioni orali di ossisteroli nelle concentrazioni sopra citate inducono lesioni dell'aorta in seguito a proliferazione di cellule muscolari lisce e agglomerazione delle fibre di collagene nel tessuto subendoteliale (Böisinger et al., 1993).

In conclusione, i livelli di ossidazione osservati, se da un lato non debbono destare ingiustificati allarmismi, dall'altro non possono essere sottovalutati. Una riduzione del pur basso grado di ossidazione del colesterolo sarebbe auspicabile, qualora fosse fattibile, in quanto consentirebbe di aumentare il grado di sicurezza dei prodotti carni. Lo scopo può essere perseguito solamente spostando l'equilibrio ossidazione/riduzione tramite interventi sul contenuto di antiossidanti delle carni e sulle tecnologie di lavorazione.

Parole chiave: vitamina E, ossidazione, lipidi, colesterolo, salame Milano

Key words: vitamin E, oxidation, lipids, cholesterol, salame Milano

RIASSUNTO - Sono stati allevati 72 suini suddivisi in 3 trattamenti dietetici differenti per contenuto di vitamina E (un gruppo di controllo, un gruppo con 100 ppm e un terzo gruppo con 200 ppm di tocoferolo acetato). Con le spalle, le rifilature di prosciutto e la pancetta sono stati prodotti tre lotti di salame Milano corrispondenti alle tre integrazioni con vitamina E. Sui salami stagionati sono stati determinati: composizione centesimale, cloruro di sodio, azoto non proteico, nitriti residui, pH, contenuto di vitamina E, numero di perossidi, TBARS, colesterolo totale, ossidi del colesterolo (COPs) e aldeidi.

I gruppi si sono dimostrati sostanzialmente uniformi per quanto concerne i parametri compositivi e per i valori di pH. La dieta ha comportato un aumento significativo del contenuto di vitamina E in funzione della integrazione alimentare.

Il livello di ossidazione è risultato basso sulla base delle misure relative ai perossidi, TBARS, aldeidi e ossidi del colesterolo. Relativamente alle TBARS è stata osservata una diminuzione non significativa nei gruppi 2 e 3 che hanno ricevuto l'integrazione con vitamina. Le quantità relative delle singole aldeidi non hanno messo in evidenza effetti significativi della integrazione vitaminica in seguito alla variabilità osservata tra i campioni.

L'effetto antiossidante della vitamina E sembra essere più evidente nei confronti del colesterolo. La percentuale del colesterolo ossidato varia da 0,04 a 0,12 % e sembrerebbe essere in relazione inversa al contenuto di vitamina E ma, anche in questo caso, la variabilità tra gruppi ha impedito che venissero messe in evidenza differenze significative.

SUMMARY - An investigation has been conducted on pigs supplemented with vitamin E at 100 and 200 ppm. Shoulders, ham trimmings and bellies have been used to produce salame Milano. Matured sausages have been subjected to the determination of proximate composition, sodium chloride, non protein nitrogen, residual nitrites, pH, vitamin E content, peroxide number, TBARS values, aldehydes, total cholesterol and cholesterol oxides.

The groups were homogeneous for compositional values and pH values whereas the diet induced significant changes in vitamin E content of matured sausages.

Oxidation was rather limited from the results of peroxide number, TBARS, aldehydes and cholesterol oxides. TBARS values suggested the possibility of an antioxidant effect of vitamin E supplementation but the differences were not significant. No variations have been observed in aldehydes content.

The antioxidant effect of vitamin E was more evident with cholesterol oxidation. The percentage of oxidised cholesterol varied from 0.12% to 0.04% and there was a tendency for oxidation decreasing with increasing vitamin E content but the low oxidation level and the variation among groups and samples did not allow significant differences to be observed.

## Bibliografia

- Adams M.L., Sullivan D.M., Smith R.L., Richter E.F.(1986) Evaluation of direct saponification method for determination of cholesterol in meats. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry*, 69, n. 5, 844-846.
- A.O.A.C.(1990) Meat and meat products, in *Official Methods of Analysis*, 15th Ed., Association of Official Analytical Chemists, vol.2, Washington DC, U.S.A, 931-948.
- Bellatti M., Dazzi G., Chizzolini R., Palmia F., Parolari G.(1983) Modificazioni fisiche e chimiche delle proteine durante la maturazione del prosciutto di Parma. I-Trasformazioni biochimiche e funzionali. *Industria Conserve*, 58, 143-146.
- Bösinger S., Luf W., Brandl E. (1993) Oxysterols : their occurrence and biological effects. *International Dairy Journal*, 3, 1-33.
- Buckley D.J., Morrissey P.A., Gray J.I.(1995) Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science*, 73, 3122-3130.
- Buttriss J.L., Diplock A.T.(1984) High performances liquid chromatographic methods for vitamin E in tissue. *Methods of Enzymology*, 105, 131-138.
- Freybler L.A., Gray J.I., Asghar A., Boreen A.M., Pearson A.M. and Buckley D.J. (1993) Nitrite stabilization of lipids in cured pork. *Meat Science*, 33, 85-96.
- Gray J.I., Gomaa E.A. and Buckley D.J. (1996) Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, S111-S123.
- Igene J.O., Pearson A.M., Merkel R.A., Coleman T.H.(1979) Effect of frozen storage time, cooking and holding temperature upon extractable lipids and TBA values of beef and chicken. *Journal of Animal Science*, 49, n. 3, 701-707.
- Kanner J. (1994) Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, 36, 169-189.
- Kubow S. (1990) Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Science and Technology*, 1, Sept., 67-71.
- Lanari M.C., Schaefer D.M., Scheller K.K.(1995) Dietary vitamin E supplementation and discoloration of pork bone and muscle following modified atmosphere packaging. *Meat Science*, 41, n. 3, 237-250.
- Marmer W.N., Maxwell R.J.(1981) Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. *Lipids*, 16, n. 5, 365-371.
- Meynier A., Novelli E., Chizzolini R., Zanardi E. and Gandemer G. (1999) Volatile compounds of commercial salami. *Meat Science*, 51, 175-183.
- Morrissey P.A., Sheehy P.J.A., Kalvin K., Kerry J.P. and Buckley D.J. (1998) Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73-S86.
- Novelli E., Zanardi E., Ghirelli G.P., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R. (1998) Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella. *Meat Science*, 48, 29-40.
- Paniangvait P., King A.J., Jones A.D., German B.G.(1995) Cholesterol oxides in foods of animal origin. *Journal of Food Science*, 60, n. 6, 1159-1174.
- Park S.W., Addis P.B.(1985) HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods. *Journal of Food Science*, 50, 1437-1441.
- Reindl B., Stan H.J.(1982) Determination of volatile aldehydes in meat as 2,4-dinitrophenylhydrazones using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 30, n. 5, 849-854.
- Skibsted L.H. (1992) Cured meat products and their oxidative stability. In *"The chemistry of muscle-based foods"* (Johnston D.E., Knight M.K., Ledward D.A.), 266-286.
- Slack P.T.(1987) Determination of nitrate and nitrite - Method 1: determination of nitrite in the presence or absence of ascorbate, in *Analytical Methods Manual*, 2nd Ed., Leathered Food Research Association, London, Great Britain, 2-8.
- Zanardi E., Novelli E., Dorigoni V., Dazzi G., Chizzolini R. (1998) Effetto antiossidante della vitamina E nel Longissimus dorsi fresco e cotto di suino. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Parma*, 18, 163-171.

## METALLI PESANTI NEL MIELE PRODOTTO IN emilia

Delbono G., Ghidini S., Campanini G.

*Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti, Università di Parma*

### Introduzione

Il miele, impiegato come dolcificante già dall'antichità, ha conservato importanza anche ai giorni nostri ed ha assunto altre specifiche caratteristiche dietetiche. In Italia il consumo di quest'alimento, che risulta piuttosto basso rispetto a quello degli altri paesi europei, manifesta una certa tendenza all'incremento. La crescita dei consumi ha richiesto un'espansione produttiva e dei flussi d'importazione.

Il mercato del miele consta di due segmenti ben distinti rivolti a specifiche utilizzazioni: il miele da tavola ed il miele destinato alle industrie alimentari, farmaceutiche e della cosmesi.

In Italia il mercato del miele da tavola vede una forte presenza di produzione per l'autoconsumo ed anche della vendita diretta apicoltore-consumatore finale. Una parte considerevole dell'offerta, quindi, non transita per i consueti canali commerciali e non è sottoposta ad un rigoroso controllo igienico e qualitativo.

Il miele per le sue caratteristiche di elevata digeribilità ed appetibilità, viene spesso destinato all'alimentazione di bambini ed anziani, pertanto è necessario garantirne una più accurata sicurezza igienico-sanitaria.

Nel nostro paese, non esistendo una solida tradizione di consumo di miele, i controlli non sono numerosi e soltanto negli ultimi tempi sono stati effettuati sforzi in questo senso. Si sta comunque manifestando sempre più un diffuso interesse per la valorizzazione di questo alimento, che si concretizza nel miglioramento delle tecniche produttive ed in un generale orientamento a perseguire la qualità attraverso la tipizzazione del prodotto. Quest'ultimo aspetto corrisponde anche alla richiesta da parte del consumatore di prodotti alimentari di elevata qualità.

La qualità del miele viene valutata tramite la determinazione di alcuni parametri merceologici e viene completata, sia con la ricerca di alcuni antiparassitari utilizzati nella conduzione apistica per il controllo dei parassiti, sia con quella di alcuni metalli pesanti. Tra i requisiti che, infatti, possono identificare dal punto di vista tecnico un miele di qualità, una certa importanza è da attribuire all'assenza di residui contaminanti. E' necessario inoltre caratterizzare la qualità dell'ambiente di produzione. Ciò è direttamente collegato anche all'esigenza dei produttori di salvaguardare l'attività apistica attraverso la valorizzazione e la promozione dei prodotti migliori e più tipici. In questo quadro generale si inserisce l'istituzione dei marchi di qualità e di origine relativa al miele avviata in diverse zone d'Italia, generalmente per iniziativa di associazioni di apicoltori.

La presente ricerca, condotta nell'ambito dei controlli sui metalli pesanti naturali ed indesiderati presenti negli alimenti di origine animale, si prefigge di raccogliere dati sui contenuti metallici della matrice miele e di iniziare a studiare i fattori che ne possono influenzare i contenuti.

Nel 1996 abbiamo iniziato una collaborazione con l'Associazione Apicoltori della Provincia di Parma e di Reggio Emilia, allo scopo di raccogliere mieli da produttori artigianali e di effettuare analisi sulla qualità del prodotto, soprattutto per quanto concerne i metalli pesanti tossici. Tra questi particolare rilevanza assume il piombo per il quale, pur in assenza nel nostro paese di limiti legislativi, esistono precise indicazioni dell'O.M.S. sulla Provisional Tolerable Weekly Intake (P.T.W.I.), corrispondente per un adulto a 3 mg; tale valore viene limitato di 10 volte per gli infanti, i bambini e gli anziani. Considerato che il miele, per le sue specifiche proprietà, viene indicato come coadiuvante nella terapia di alcune malattie, è intuitivo pensare che il maggior consumo provenga proprio da queste categorie.

Un alveare è un potenziale accumulatore naturale dei contaminanti che l'ape raccoglie dal territorio che tiene sotto controllo. Questo accade poiché questo insetto pronubo, oltre a suggerire il nettare dai fiori, preleva il propoli dalle gemme, raccoglie il polline e beve l'acqua presente nell'ambiente. L'ape è poi esposta alla contaminazione delle particelle sospese nell'aria che si depositano su fiori, erbe e foglie o che raccoglie con il corpo peloso.

L'influenza della contaminazione ambientale sullo stato di salute delle api è nota da qualche tempo, infatti, a quanto riporta Crane<sup>1</sup>, già dal 1935 si sono osservati i primi effetti negativi di contaminazioni industriali sulle api. Svariati autori hanno poi studiato la possibilità di impiegare questo insetto per monitorare i livelli di inquinamento ambientale<sup>2,3,4,5</sup>. Nel caso della contaminazione da metalli pesanti, tuttavia, i parametri riguardanti lo stato di salute degli animali, quali ad esempio il tasso di mortalità delle api, non possono essere impiegati quale indice di contaminazione ambientale. Tali insetti, infatti, non vengono uccisi né dal piombo, né dagli altri metalli, almeno a concentrazioni già preoccupanti dal punto di vista ecologico-ambientale. Pertanto il dato della mortalità negli apiari si dimostra del tutto irrilevante, a differenza di ciò che accade nel caso dei pesticidi<sup>6,7,8</sup>. E' quindi da ritenere che, per i metalli tossici, il segnale più sensibile di inquinamento ambientale sia la presenza di residui rinvenuti nei prodotti dell'alveare e che tra essi il miele sia l'indicatore più sensibile, nonché il più facilmente reperibile.

### Materiali e metodi

Il miele è stato reperito direttamente presso produttori artigianali nelle annate del 1996, del 1997 e del 1998. Il campionamento ha riguardato le provincie di Piacenza, di Parma e di Reggio Emilia.

I campioni di miele sono stati omogeneizzati con riscaldamento a 60 C° e sottoposti a mineralizzazione per via umida tramite riscaldamento a microonde in pressione (Milestone 1200 Mega). Un'aliquota di circa 0,7 g di miele è stata pesata direttamente nel tubo di mineralizzazione; sono stati aggiunti 3 ml di HNO<sub>3</sub> Suprapur® (Merck) e 0,5 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (soluzione 30%, 110 volumi). Il programma di mineralizzazione prevedeva sei step a potenze crescenti della durata complessiva di 20'; dopo raffreddamento il campione è stato portato al volume di 10 ml con acqua bidistillata e conservato in vial fino all'analisi.

La preparazione del campione per la determinazione di Pb è stata effettuata pesando circa 1 g di miele e portandolo al volume di 10 ml con una soluzione acquosa acidificata con 0,5% di HNO<sub>3</sub>.

Per la determinazione analitica è stata utilizzata la tecnica della Spettrofotometria di Assorbimento Atomico (AAS), con sistema di atomizzazione in fiamma per Cu, Zn e Mn, elettrotermico per Pb e Cd ed a vapori freddi per Hg.

I dati sono stati elaborati e rappresentati statisticamente tramite il programma SPSS 9. Sono stati utilizzati valori parametrici per la visualizzazione dei risultati analitici e per il confronto bibliografico. Il confronto tra campioni raggruppati per provincia e per zona altimetrica è stato effettuato utilizzando valori non parametrici, rappresentati graficamente tramite box-plot. E' stata anche eseguita l'analisi della varianza con il test post hoc di Sheffe.

## Risultati

Nella Tabella 1 sono indicati la media, la deviazione standard, il valore minimo ed il valore massimo dei risultati delle determinazioni analitiche.

	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>	<b>Mn</b>	<b>Pb</b>	<b>Cd</b>	<b>Hg</b>
Media	1,88	1,06	0,93	0,150	0,004	<0,010
Dev. st.	1,67	0,93	0,63	0,091	0,003	
Max	11,10	4,01	2,79	0,424	0,013	
Min	0,47	0,20	0,34	0,018	<0,003	

**Tabella 1 - Dati relativi alle concentrazioni degli elementi nei campioni di miele espressi in mg/kg.**

Nella Figura 1 vengono visualizzati attraverso box-plot i confronti in funzione della provincia di provenienza dei mieli relativi ai dati delle concentrazioni degli elementi essenziali Cu, Zn e Mn.

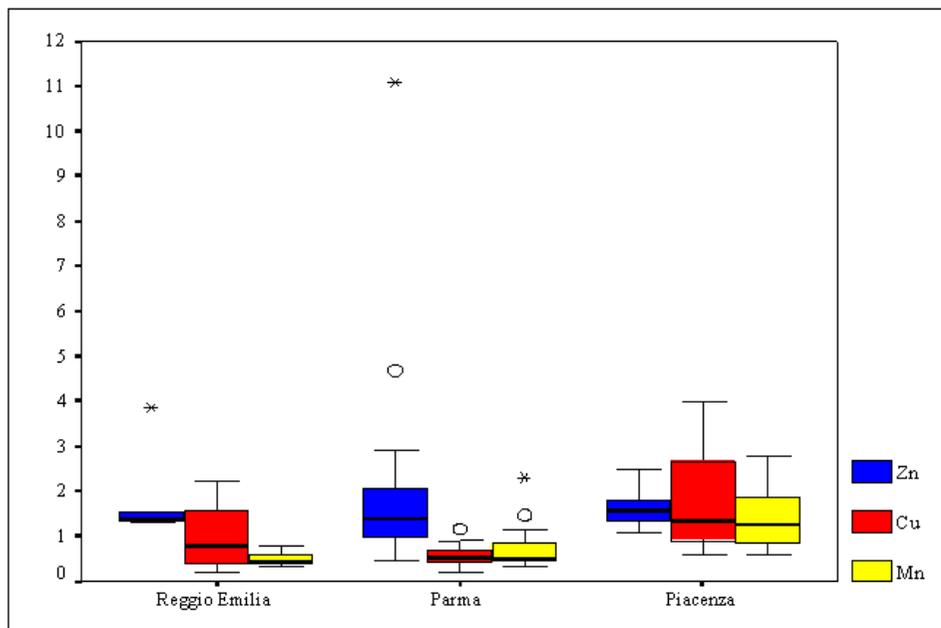
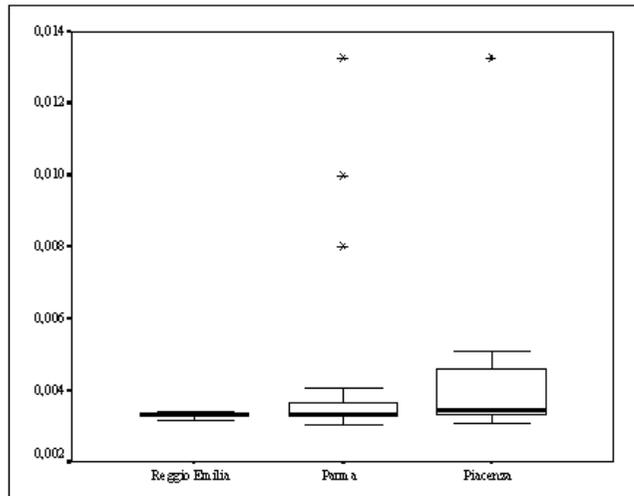


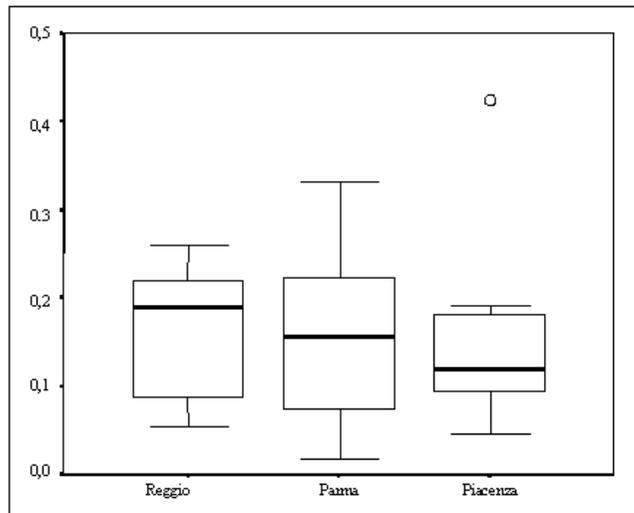
Figura 1 - Grafico box-plot relativo alle concentrazioni in mg/kg di Cu, Zn e Mn nelle tre province di provenienza dei campioni di miele. I lati del box rappresentano il 1° ed il 3° quartile, mentre il segmento all'interno del box è la mediana. Il cerchio rappresenta un valore anomalo (compreso tra 1.5 e 3 lunghezze del box a partire dall'estremità del box), mentre l'asterisco rappresenta un valore estremo (a più di 3 lunghezze dall'estremità del box).

Nella Figura 2 vengono rappresentati i confronti per provincia relativi ai dati delle concentrazioni del Cd.



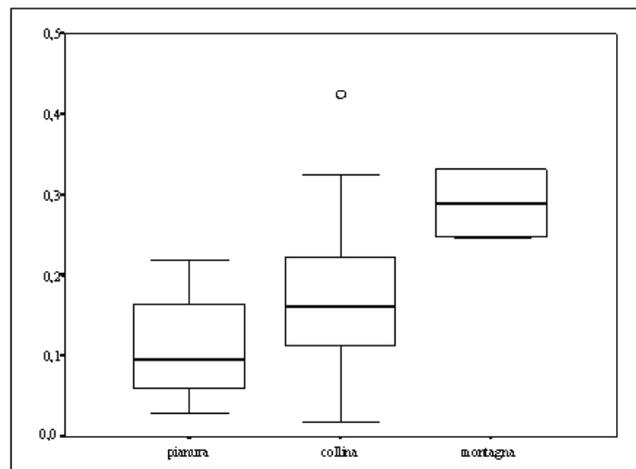
**Figura 2 - Grafico box-plot relativo alle concentrazioni in mg/kg di Cd nelle tre province di provenienza dei campioni di miele.**

Nella Figura 3 vengono rappresentati i confronti per provincia relativi ai dati delle concentrazioni del Pb.



**Figura 3 - Grafico box-plot relativo alle concentrazioni in mg/kg di Pb nelle tre province di provenienza dei campioni di miele.**

Nella Figura 4 vengono rappresentati i confronti in base alla zona altimetrica dei dati relativi alle concentrazioni di Pb.



**Figura 4 - Grafico box-plot relativo alle concentrazioni in mg/kg di Pb nei campioni di miele provenienti dalle diverse zone altimetriche.**

Per quanto riguarda le concentrazioni di piombo, il test Sheffe (Tabella 2) ha evidenziato che i campioni provenienti dalla montagna manifestano concentrazioni significativamente più elevate rispetto a quelli della pianura; quelli della collina sono caratterizzati da concentrazioni intermedie. Le concentrazioni degli altri metalli, invece, non manifestano nei confronti delle zone altimetriche differenze significative. Il test di Sheffe è stato eseguito anche per verificare la distribuzione delle concentrazioni di metalli in funzione della provincia di origine dei campioni (Tabella 3).

ZONA ALTIMETRICA	n	Mn	Cd	Pb	Cu	Zn
Pianura	18	0,824 *	0,003 *	0,114*	0,255*	1,016*
Collina	21	0,988 *	0,004*	0,168* <sup>b</sup>	1,080*	1,834*
Montagna	2	1,319*	0,003*	0,289 <sup>b</sup>	1,122*	2,009*

**Tabella 2 - Media delle concentrazioni in mg/kg per zona altimetrica con suddivisione per gruppi di sottoinsiemi omogenei secondo Sheffe (alfa = 0,05).**

PROVINCIA	n.	Mn	Cd	Pb	Cu	Zn
RE	6	0,503 *	0,003 *	0,166*	0,993*	1,806*
PR	21	0,742*	0,004*	0,151*	0,560*	2,066*
PC	14	1,401 <sup>b</sup>	0,004*	0,142*	1,833 <sup>b</sup>	1,644*

**Tabella 3 - Media delle concentrazioni in mg/kg per provincia con suddivisione per gruppi di sottoinsiemi omogenei secondo Sheffe (alfa = 0,05).**

Si può osservare come le concentrazioni di Mn e Cu siano più alte nei campioni provenienti dalla provincia di Piacenza e che queste differenze risultano significative.

## Discussione

Le ricerche riguardanti le concentrazioni di metalli pesanti nella matrice miele non sono molto numerose. La maggior parte degli autori, che nel nostro paese si sono occupati dell'argomento, ha eseguito l'analisi del tenore di piombo e questo ci consente di effettuare alcune considerazioni comparative e di indagare sui fenomeni che possono influenzare la distribuzione dell'elemento.

Nella Tabella 4 i dati della presente ricerca, vengono confrontati con quelli di altri autori che in Italia hanno svolto indagini sui residui di questo metallo in mieli prodotti in aree extraurbane. La media dei tenori di piombo nei nostri campioni è relativamente alta e questo è dovuto soprattutto alla presenza di alcuni mieli con concentrazioni piuttosto elevate; bisogna, infatti, anche considerare che molti campioni hanno tenori trascurabili e che i valori minimi di questa ricerca sono tra i più bassi tra quelli riportati in letteratura.

RIFERIMENTI	ANNO	PROVENIENZA CAMPIONI	METODO	N	MEDIA	MAX	MIN
Oddi e Bertani <sup>10</sup>	1987	Veneto	PSA	50	0,230	1,100	0,010
Pinzauti et al. <sup>11</sup>	1989	Toscana	AAS	90	0,172	0,380	0,070
Galeno et al. <sup>12</sup>	1992	Liguria	AAS	55	0,075	0,237	<0,008
Sangiorgi e Ferretti <sup>13</sup>	1993	Lombardia, Emilia-Romagna	AAS	163	0,037	0,220	
Abete e Voghera <sup>14</sup>	1996-1997	Provincia di Torino	AAS	40	0,065	0,162	0,028
<b>Questa ricerca</b>	<b>1996-1998</b>	<b>Emilia</b>	<b>AAS</b>	<b>41</b>	<b>0,150</b>	<b>0,424</b>	<b>0,018</b>

**Tabella 4 - Dati relativi alle concentrazioni di Pb espresse in mg/kg sul prodotto tal quale rilevate dai vari autori in Italia. PSA=Potenzimetria di Strippaggio Anodico; AAS=Spettrofotometria di Assorbimento Atomico.**

Alcuni campioni presentano tenori piuttosto elevati e si osserva che sono quasi sempre di provenienza montana e collinare.

Si ricorda, a questo proposito, che Otto e Jekat, fin dal 1977, avevano proposto un limite massimo di Pb nel miele di 0,215 mg/kg e sulla base di ciò 9 campioni superano il valore<sup>15</sup>. Indagare sulle cause presumibilmente all'origine dei livelli anomali di piombo, come le condizioni ambientali ed il traffico automobilistico, è difficile. In alcuni casi i tenori più elevati sono associati a zone vicine a strade ad intenso traffico, mentre in altri casi questa non può essere la spiegazione più plausibile. Analisi effettuate in mieli prodotti in aree urbane nel decennio scorso hanno rilevato spesso tenori di piombo superiori a 1 mg/kg<sup>15,16,17</sup>. Ciò è confermato da ricerche effettuate in Italia con il proposito di studiare l'inquinamento da piombo attraverso il posizionamento delle arnie in stazioni prossime ad arterie stradali ad alta densità di traffico. Pinzauti et al. hanno rilevato tenori medi di piombo prossimi a 0,500 mg/kg<sup>18</sup> e hanno ipotizzato che le infrastrutture urbane (insediamenti edilizi, vie di comunicazione) influenzino la mortalità delle api in quanto provocano nell'insetto una condizione generale di stress, sinergizzata dalla diffusa e persistente contaminazione ambientale anche se di media gravità.

In alcune ricerche è stato evidenziato che l'origine botanica influenza il tenore di piombo, anche se i dati a supporto di queste ipotesi appaiono in contraddizione<sup>10, 11, 17</sup>. Dai nostri dati queste differenze non emergono, probabilmente perché i mieli sono in prevalenza di tipo millefiori. Riteniamo, pertanto, che ad influenzare i tenori di piombo siano fattori ambientali, come la vicinanza a grandi arterie stradali, piuttosto che l'origine botanica del miele.

I tenori di cadmio sono piuttosto bassi e soltanto in due casi superano 0,010 mg/kg, valore da ritenere rassicurante sotto il profilo igienico-sanitario. Altri autori hanno trovato valori simili a quelli di questa ricerca<sup>10, 12</sup>.

I livelli di zinco non mostrano differenze significative secondo la provincia e la zona altimetrica; la presenza di valori eccezionalmente elevati potrebbe imputarsi all'impiego da parte dei produttori di recipienti o attrezzature zincate (anziché di acciaio inox) che possono cedere al miele, a causa della sua natura piuttosto acida, metalli come lo zinco.

I tenori di rame e di manganese sono significativamente più elevati nei mieli della provincia di Piacenza. Tra le possibili cause di questo fenomeno, oltre alla differente natura pedologica, si può annoverare la diffusa presenza in quei territori della coltura viticola, che può comportare l'utilizzo di anticrittogamici a base soprattutto di rame. In una recente indagine effettuata su mieli della provincia di Torino, i tenori medi di Cu sono in linea con quelli rilevati nei nostri campioni, ad eccezione di quelli provenienti dalla provincia di Piacenza.

Per quanto riguarda il mercurio, tutti i campioni denunciano valori al di sotto del limite di rilevabilità, pari a 0.010 mg/kg. I dati su questo metallo tossico nel miele reperibili in letteratura per un confronto sono pochi. Tong<sup>19</sup> ha trovato valori inferiori a 0.1 mg/kg in tutti i campioni analizzati; Toporcak<sup>20</sup> ha trovato valori compresi tra 0.05 e 0.212 mg/kg, per campioni provenienti da aree inquinate e valori tra 0.001 e 0.003 mg/kg, per campioni provenienti da aree non inquinate. Il confronto tra tali dati e quelli da noi riscontrati, ci permette di affermare che la contaminazione ambientale da mercurio, per le aree di provenienza dei nostri campioni, è trascurabile. La presenza di questo metallo nel miele in Emilia, quindi, non deve destare particolare preoccupazione.

## Conclusioni

I risultati di questa ricerca danno una conferma di come il miele possa essere un sensibile indicatore della contaminazione ambientale da metalli pesanti. I livelli di piombo, in alcuni casi, rivelano che la contaminazione ambientale non è diminuita particolarmente e che il piombo è un tossico piuttosto persistente. I tenori più elevati sono stati riscontrati in campioni provenienti dalle zone collinari e montane, mentre non sono state riscontrate differenze considerando l'origine botanica del miele. L'ampia variabilità dei dati fa ritenere che in Emilia la contaminazione da piombo delle aree di pascolo apistico sia molto variabile. Non esistendo limiti legislativi per il piombo nel miele, si ritiene comunque che il valore di 0,100 mg/kg sia da considerare come livello di attenzione e che valori sopra questa soglia siano da attribuire alla vicinanza degli apiari a fonti inquinanti.

Sottolineiamo come, per la sanità del miele sotto l'aspetto contaminazione saturnina, l'ambiente circostante le arnie sia molto importante: è quindi necessario produrre miele in luoghi poco contaminati.

I tenori di cadmio e mercurio risultano invece piuttosto bassi, quindi non esiste nessuna preoccupazione dal punto di vista sanitario.

Con questa ricerca preliminare si vogliono gettare le basi per ulteriori indagini riguardanti i residui contaminanti nel miele. Si coglie l'occasione per auspicare che i risultati emersi possano essere considerati dalle associazioni dei produttori per favorire l'attività apistica in ambienti idonei che possano garantire la minor contaminazione possibile del miele.

La promozione della sanità igienico-sanitaria del miele italiano può incrementare il mercato di un alimento importante dal punto di vista nutrizionale e potenzialmente interessante dal punto di vista del reddito che può fornire ai produttori artigianali.

Parole-chiave: miele, metalli pesanti, alimenti.

Keywords: honey, heavy metals, food.

RIASSUNTO - Sono state determinate tramite Spettrofotometria di Assorbimento Atomico le concentrazioni di rame, zinco, manganese, piombo, cadmio, e mercurio nel miele. I campioni sono stati raccolti direttamente presso i produttori e provengono dalle province di Piacenza, Parma e Reggio Emilia. Il miele può essere considerato un indice della contaminazione ambientale e può essere utilizzato per monitorare il livello di contaminazione del territorio da metalli pesanti. I risultati sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura ed elaborati statisticamente. I livelli di Hg e di Cd sono molto bassi, mentre quelli di Pb non si possono considerare trascurabili, in particolare nei campioni provenienti dalle località collinari e montane. La vicinanza a grandi arterie di traffico stradale può influenzare il contenuto di questo tossico nel miele. Il posizionamento degli apiari in luoghi poco contaminati è un fattore importante per la qualità del prodotto.

SUMMARY - Copper, zinc, manganese, lead, cadmium and mercury concentrations in honey were determined by atomic absorption spectrophotometry. Samples were collected directly from the producers and came from the province of Piacenza, Parma and Reggio Emilia. Honey can be considered as an index of environmental pollution and can be used to monitor heavy metals contamination of the environment. Results were compared with those presents in literature and statistically processed. Hg and Cd levels are very low, while Pb levels can't be considered negligible, particularly considering samples from hills and mountains. The nearness to high traffic-congested routes can affect honey lead content. The location of apiaries in slightly contaminated places is an important factor of quality for the product.

## Bibliografia

- 1) Crane E. (1984) Bees, honey and pollen as indicator of metals in the environment. *Bee World*, 55, 47-49.
- 2) Accorti M., Persano-Oddo L. (1986) Un servizio di monitoraggio ambientale urbano: "Apicoltura". *Informatore agrario*, 42, 39-41.
- 3) Celli G. (1981) Stato di salute del territorio. *Atti Convegno "Insetticidi Agricoltura Ecologica"*, Forlì, 12 Marzo 1982, 7-26.
- 4) Celli G. (1983) L'ape come insetto test della salute di un territorio. *Atti del XIII Congresso Nazionale Entomologia, Sestriere, 27 Giugno-1 Luglio 1983*, 637-644.
- 5) Wallwork-Barber M.K., Ferenbaugh R.W., Gladney E.S. (1982) The use of honey bees as monitors of environmental monitors. *Am. Bee J.*, 122, 770-772.
- 6) Atkins E.L., Kellum D., Atkins K.W. (1981) Reducing pesticide hazards to honey bees: mortality prediction techniques and integrated management strategies. *Div. Agr. Sci., Univ. California, Leaf.*, 2883-3006.
- 7) Celli G., Porrini C., Toraferri S. (1985) Rapporti tra apicoltura e ambiente. L'ape come indicatore biologico dei pesticidi (con particolare riferimento alla provincia di Forlì). *Boll. Ist. Ent. "Guido Grandi"*, Univ. Bologna, 39, 231-241.
- 8) Celli G., Porrini C. (1986) L'ape come insetto-test dell'inquinamento da pesticidi. Considerazioni su alcuni apicidi catastrofici che si sono verificati nel 1985. *Atti Giorn. Fitopat.*, Riva del Garda, 3, 537-542.
- 9) SPSS 9.0.1 per Windows (11/03/1999).
- 10) Oddi P., Bertani P. (1987) Contaminanti nel miele. Nota 1: residui di Pb e Cd. *Atti S.I.S.Vet.*, Vol. XLI, 998-1000.
- 11) Pinzauti M., Biondi C., Panizzi L. (1989) Residui contaminanti nel miele. *Atti S.I.S.Vet.*, Vol. XLIII, 743-747.
- 12) Galeno N., Rocca L., Ferrari A., Molinelli E., Arossa C. (1992) Il miele di produzione ligure. Caratteristiche organolettiche e residui di metalli pesanti. *Atti S.I.S.Vet.*, Vol. XLVI, 657-660.
- 13) Sangiorgi E., Ferretti E. (1996) Controlli del laboratorio chimico per la tutela del consumatore: analisi effettuate e risultati ottenuti su miele nel 1993. *La Selezione Veterinaria*, 11, 755-761.
- 14) Abete M.C., Voghera M. (1999) Indagine sulla presenza di metalli pesanti nel miele prodotto nella Provincia di Torino (anni 1996-1997). *Atti S.I.S.Vet.*, Vol. LIII, 369-370.
- 15) Otto K., Jekat F. (1977) Experimentelle Untersuchungen über die Belastung eines Nahrungsmittels mit Rückständen von Blei, Zink, Cadmium. *Ernährungs Umschau*, 24(4), 107.
- 16) Stein K., Umland F. (1986) *Zeit schrift fuer Analytische Chemie*, 323(2), 176-177.
- 17) Celli G., Porrini C., Balestra V., Menozzi R. (1988) Monitoraggio di inquinanti atmosferici urbani mediante api. *Giornata di studio su salute e ambiente, Cagliari*, 27-28 Maggio 1988.
- 18) Pinzauti M., Gianfaldoni D., Lazzeri M. (1989) Ape e volpe: utili indicatori biologici. *Convegno Internazionale "Inquinamento ambientale e popolazioni animali"*, 3-4 Ottobre 1989, Pisa, 581-587.
- 19) Tong S.S.C., Morse R.A., Bache C.A., Lisk D.J. (1975) Elemental analysis of honey as an indicator of pollution. *Arch. Environ. Health*, Vol 30, July 1975.
- 20) Toporcak J., Legath J., Kul'kova J. (1992) Levels of mercury in samples of bees and honey from areas with and without industrial contamination. *Vet. Med. Praha*, 37(7), 405-412, July 1992.

# Aeromonas INFECTIONS: AN UPDATE <sup>1</sup>

E. Bottarelli <sup>2</sup>, M.C. Ossiprandi <sup>2</sup>

(<sup>1</sup>) From a paper presented at the Course "La nuova cultura delle produzioni animali nel contesto dell'Unione Europea", University of Parma, Faculty of Veterinary Medicine, Parma, 1999.

(<sup>2</sup>) *Università degli Studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria, Istituto di Microbiologia, Via del Taglio 8, 43100 Parma. Direttore: Prof. F. Cattabiani. Corresponding author: E. Bottarelli, bottarel@www.unipr.it.*

## 1. Introduction

Among the species belonging to *Aeromonas* genus, one of the most important in veterinary medicine is *A. salmonicida*, a fish pathogen which causes a common disease among salmonids, named "forunculosis" or "ulcerative forunculosis". Other *Aeromonas* species are pathogenic for fish and several cold-blooded animals (Altwegg and Giess, 1989); among them, *Aeromonas hydrophila* has been widely studied, being responsible for a variety of fish pathological conditions, altogether named "aeromonosis" (Ghittino, 1985), which occur in nature or in artificial environment (fish breeding ponds, tropical aquaria, etc.).

Over the last few years, the interest in *Aeromonas* spp. has gone beyond the boundaries of fish pathology; this is due to the increase of diseases in man which are caused by these agents, as they can often act as opportunistic agents in immunocompromised individuals, or in patients with chronic and weakening diseases (Janda, 1991). In addition to this role of "secondary pathogens", aeromonads can also play a role as primary pathogens, (Janda 1991; Palumbo 1992), being responsible for enteric or, less often, extra-enteric infections (Janda and Duffey, 1988). Due to increasing reports of acute diarrhoea caused by these bacteria, *Aeromonas* spp. can now be considered a relatively common enteropathogen.

Most of the studies on the causes of human gastroenteritis cases have focused on the transmission by contaminated water. On the other hand, information about the possibility that food may play a significant role in the epidemiology of human infections is scarce (Majeed et al., 1989a), although this should not be excluded.

This paper focuses on the biology of *A. hydrophila*, a species which has been increasingly causing diseases in man.

## 2. Taxonomy

Bacteria of *Aeromonas* Genus belong to the Vibrionaceae Family. They are short rods with rounded ends, 1-3.5 µm in length, Gram-negative, aerobe-anaerobe facultative; they are motile by a single polar flagellum, with the exception of *A. salmonicida* which is non-motile.

This Genus is characterized by broad phenotypic variations; therefore, the taxonomy is constantly evolving to such an extent that it has been defined by Carnahan (1993) "a sea of change". In fact, this Genus seems phylogenetically so complex that the creation of a new, specific Family has been suggested (Colwell et al., 1986).

The classical taxonomic scheme (Popoff, 1984) can be divided into two main groups. The first group includes psychrophilic strains growing at 22-28°C (*A. salmonicida*); the second one includes mesophilic strains growing at 36-37°C.

Abbot (1992) has proposed a new classification scheme based on the classic biochemical tests, but also on results of DNA hybridization tests. This scheme includes 13 genospecies (Table 1) ordered in 4 complexes or phenospecies.

It must be stressed that the identification at species level of aeromonads isolated from food is very difficult because of the wide variability of these strains; thus, Abbot's scheme, in which the first identification level is based on biochemical tests, is reliable in clinical microbiology (where the strain variability is modest), but is not completely satisfactory when applied to strains isolated from food (Ottaviani et al., 1998).

Table 1. Hybridization groups in *Aeromonas* genus

Hybridization group	Genospecies	Phenospecies or 'complex'
1	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>
2	not classified	
3	<i>salmonicida</i>	
4	<i>caviae</i>	<i>caviae</i>
5A, 5B	<i>media</i>	
6	<i>eucrenophila</i>	
7	<i>sobria</i>	<i>sobria</i>
8	<i>veronii</i> biotype <i>sobria</i>	
9	<i>jandaei</i>	
10	<i>veronii</i> biotype <i>veronii</i>	
11	not classified	
12	<i>schubertii</i>	<i>schubertii-trota</i>
13	<i>trota</i>	

Four new species were subsequently introduced: *allosaccharophila* (Martinez-Murcia et al., 1992), *encheleia* (Esteve et al., 1995), *bestiarum* (Ali et al., 1996), and *popoffii* (Huys et al., 1997); two additional species, (*ichthiosmia* e *enteropelogenes*) appear to be subjective synonyms of previously published species (Janda and Abbott, 1998).

Thus, fifteen species are considered in the most recent classification (Janda and Abbott, 1998); among them, six are considered pathogen for man, while nine are non pathogen or "environmental" (Table 2).

Table 2. Current taxonomy of the species belonging to *Aeromonas* genus, grouped according to the pathogenicity for man (modified after Janda and Abbott, 1998).

Species associated to disease in man		Environmental species
major pathogens*	minor pathogens*	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. hydrophila</i></li> <li>• <i>A. caviae</i></li> <li>• <i>A. veronii</i> biotype <i>sobria</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. veronii</i> biotype <i>veronii</i></li> <li>• <i>A. jandaei</i></li> <li>• <i>A. schubertii</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. salmonicida</i></li> <li>• <i>A. sobria</i></li> <li>• <i>A. media</i></li> <li>• <i>A. eucrenophila</i></li> <li>• <i>A. trota</i></li> <li>• <i>A. allosaccharophila</i></li> <li>• <i>A. encheleia</i></li> <li>• <i>A. bestiarum</i></li> <li>• <i>A. popoffii</i></li> </ul>

\*: based on frequency rather than on the severity of the disease.

### 3. Virulence factors

Over the years much work has been carried out in order to identify the virulence factors or the pathogenetic mechanisms in man and animals; however, at present, only a

single factor - the 'S' layer of *A. salmonicida*, can be related to the virulence of this species (Kay et al., 1981). Most of the other factors have been related to pathogenicity by induction, since the same factors play an important role in the pathogenesis of infections caused by other bacterial species (as *E. coli*). Moreover, there is no reliable model for the mesophilic species, to reproduce all the different clinical presentations (and particularly the gastroenteric disease). Obviously, this represents an additional obstacle to the characterization of the mechanisms of pathogenicity and enteropathogenesis (Schiavano et al., 1998).

As for all enteropathogenic bacteria, also in *Aeromonas* spp. the pathogenicity is mainly related to two mechanisms: (i) tissue adherence and (ii) toxin production.

Tissue adherence is mediated by the S-layers, which can be found in *A. salmonicida* (Ingham, 1990), in *A. hydrophila*, and in *A. veronii* biotype *sobria* (Dooley and Trust, 1988; Janda et al., 1987). The S-layers support the adherence and colonization of bacteria on the intestinal mucosa. These events are supported also by filamentous (fimbriae) or membranous (adhesins) structures, with haemagglutinating activity, mainly found in mesophilic strains (Ho et al., 1992; Hokama and Inagawa, 1991).

The toxins of *Aeromonas* can be classified as *exo-* and *endo-*toxins. Cytotoxins and enterotoxins (including those with haemolytic activity) are the most important for their pathogenicity; the latter act through the classic cytotoxic mechanism, typical of *V. cholerae* (Merino et al., 1992; 1995). *Aeromonas* can also produce other extracellular substances, with significance of diffusion factors: 4 (or 5) proteases, amylase, chitinase, lipase, nuclease (Janda, 1991) and others with unknown pathogenic role (Merino et al., 1995).

So far, no virulence plasmids have been demonstrated in *Aeromonas* spp. (Brown et al., 1997).

## 4. The disease in man and animals

### 4.1. Man

The most common syndrome is confined to the gastro-enteric tract (Varone et al., 1998); sometimes it runs a course identical to the condition known as "traveller's diarrhoea" (Yamada et al., 1997). The clinical findings are similar, although less dramatic, to the ones of cholera: watery diarrhoea, fever and vomit; occasionally the disease can be more severe, with mucus and/or blood in the faeces. In compromised patients, the gastroenteric form can develop into a severe abdominal or septicemic infection (Saito and Schick, 1973).

Recently the occurrence of a haemolytic-uremic syndrome following an *Aeromonas* gastroenteric disease has been described. This syndrome is very similar to the one brought on by *E. coli* O157:H7 and is caused by an *Aeromonas* cytotoxin which is genetically and antigenically different from the *E. coli* cytotoxin.

*Aeromonas hydrophila* can also be responsible for infections localized on the skin and soft tissues. The condition is characterized by myositis or necrotizing myositis, and it is often associated with wounds contaminated by water or soil; usually it involves the lower limbs (Khardori and Fainstein, 1988), owing to the high diffusion ability of *Aeromonas*.

Other localized forms, usually arising from a septicemic status, are far less frequent: meningitis, corneal ulcerations, endophthalmitis, osteomyelitis, septic arthritis, endocarditis, peritonitis, biliar obstruction and colecistitis, intra-abdominal abscesses, urinary infections, otitis media (Khardori and Fainstein, 1988). The prevalence of respiratory infections, evolving into pneumonia, lung abscess or empyema is increasing (Janda and Abbott, 1998). Some Authors have reported the occurrence of *Aeromonas* infections as burn complication in hospitalized patients.

### 4.2. Animals

Besides the above mentioned fish diseases, pathological findings in frogs ("red leg disease") (Carlton and Hunt, 1978), snakes and other reptiles have been described (Carlton and Hunt, 1978; Marcus, 1981). In snakes, *A. hydrophila* infections can occur as:

- 1. acute septicemia, with lethargy and convulsions, associated with lung and epicardial hemorrhages and hemorrhagic enteritis;
- 2. severe pneumonia, sometimes highly contagious within colonies of animals, with high mortality;
- 3. ulcerative stomatitis, with presence of foamy exudate in the mouth and impairment of food ingestion.

Regarding mammals, the following clinical pictures have been sporadically observed: sepsis in dogs (Pierce et al., 1973); pneumonia and dermatitis in dolphins (Cusick and Bullock, 1973); septicemia in seals (Krovacek et al., 1998); abortion (Wohlegemuth et al., 1972) and vesiculitis in cattle (Moro et al., 1999); diarrhoea in piglets (Dobrescu, 1978); septicemia in rabbits (Paniagua et al., 1998).

## 5. Sources of infection for man

The aeromonads are bacteria with aquatic habitat and belong to the autochthonous flora of fishes and amphibians. In the strict sense, they are not part of the enteric flora of man, although Araujo et al. (1991) have demonstrated that about 1% of healthy adults are carriers. The sources of infection for man can be grouped into two major categories: the first one refers to the environment-water-animals complex, the second one to the ingestion of contaminated food.

### 5.1. Environment and animals

*A. hydrophila* is frequently isolated from fresh water (springs, wells, rivers, lakes), as well as from brackish or sea water; probably it is not indigenous to the latter, but it can be found anyway as consequence of waste waters or rivers flowing into the sea (Di Girolamo and Volterra, 1993).

The bacterial count of surface fresh water is directly related to the contamination from urban waste water and to temperature, and rises during eutrophic periods (Varnam and Evans, 1991). However, according to other Authors, in waters with considerable faecal contamination, the most common species is *A. caviae*, which is the species most frequently isolated in human faeces (Araujo et al., 1991). Di Girolamo et al. (1993) have found that *A. hydrophila*, the species having the best survival/replication attitude in low polluted environment, is more common in clean water, while in those with high faecal pollution *A. caviae* is the more frequent one.

The isolation of *A. hydrophila* from chlorinated water has also been reported; actually, this organism seems less sensible to chlorine compared to coliforms (Chamorey et al., 1999; Knochel and Jeppesen, 1990), although this has not been confirmed in studies recently carried out on strains isolated in Italy (Sisti et al., 1998).

As regards public health, the presence of a waterborne disease agent such as *A. hydrophila* in commercial mineral waters could be alarming. The Italian Ministry of Health has proposed that the concentration of this species should be <10 cfu (colony forming units)/100ml when measured at the source, and <100 cfu in the final container. However, according to a recent opinion of the Scientific Committee on Food of the European Commission, the presence of *A. hydrophila* and *A. caviae* in mineral water does not represent a potential risk, as there are no reports of human infection involving mineral water and attempts to demonstrate what virulence factors are responsible for human infections have led to inconclusive results. Thus, no precautional measures are necessary (Anon., 1998b).

*Aeromonas* spp. are to be considered as non-pathogenic for animals, with the exception of fish, amphibians and reptiles. However, several species can act as carriers and faecal shedders, although their prevalence seems low. This has been demonstrated in cattle, horses, pigs, sheep and turkeys (Gray, 1984; Stern et al., 1987). Isolated cases of positivity have been recorded in swine and lambs at slaughter (Varnam and Evans, 1991; Majeed et al., 1989b).

### 5.2 Food

It is well known that *A. hydrophila* can be isolated, with variable frequency, from different foods (raw, refrigerated or frozen) of animal origin. Comprehensive reviews on the presence of this microorganism in food have been recently published by Carlomagno (1993) and Ventura et al. (1998).

*A. hydrophila* occurs mainly in fish products. An important reservoir is represented by mussels and, particularly, by oysters (Abeyta et al., 1986; Tsai and Chen, 1996). This bacterial species has been isolated also from raw bovine, suine and lamb meat (Ibrahim and Mac Rae, 1991; Borch et al., 1996; Majeed et al., 1989b), poultry (Hanninen and Siitonen, 1995; Akan et al., 1998), offal, sausage (Singh, 1997) and other products of animal origin (Comi et al., 1984).

Some preservation techniques seem ineffective in inhibiting the replication of *A. hydrophila*, which can multiply - although at a slow rate - in products which are refrigerated and vacuum-packed or packaged in modified atmosphere. The microorganism can also replicate at low pH values, or at high (5%) NaCl concentration. Thus, the presence of this bacterial species in food could represent an additional factor of concern in the control of foodborne diseases.

The isolation of *Aeromonas* from raw milk (Khalil, 1997) and dairy products (Addante et al., 1998; Khalil, 1997; Montagna et al., 1998) has been reported. Finally, the

microorganism has been found with high frequency in different vegetables (Callister and Agger, 1987; Garcia-Gimeno et al., 1996).

## 6. Conclusion

The role of aeromonads, and particularly of *A. hydrophila*, as human pathogen and their transmission have been revised during the past few years. According to some Authors, the isolation of highly virulent strains is increasing; thus, these bacteria can no longer be classified among the "opportunistic" agents, as they were in the past. Moreover, the epidemiological and ecological relationships between *Aeromonas*, man, environment, and animals have aroused increasing interest in this bacterial Genus, both in the human and veterinary field. The opinion of public health experts is currently focusing on the following critical points:

1. report of human cases possibly associated with the consumption of food of animal origin;
2. identification of farm animals as enteric carriers; this is obviously a hazard factor regarding a potential faecal contamination of animal products. This condition is similar to the one observed for other agents, such as enterotoxigenic *E. coli*; however, its importance should be regarded as secondary, in respect of the low frequency of *Aeromonas* carriers;
3. isolation of pathogenic strains from the environmental waters of rivers, lakes, wells, etc., and potential presence of these bacteria in drinking water or in water used in the food industry;
4. ability of some strains to multiply at low temperature and/or in modified atmosphere; this could be a problem for refrigerated and non heat-treated products;
5. low sensitivity to chlorine, generally used for the disinfection of water.

Focusing on public health, the problems so far exposed could be regarded as severe enough to give rise to a sort of *Aeromonas* emergency. However, it must be stressed that several aspects of the ecology of aeromonads are still waiting to be clarified; among them, the most important one is the role of *Aeromonas* spp. as casual agent of enteric disease in man (Abeyta et al., 1986; Janda and Abbott, 1998; Schiavano et al., 1998). This hypothesis is supported by some case-control studies, in which a mechanism of enteropathogenicity, mediated by an enterotoxin, has been demonstrated. On the other hand, several epidemiological studies have failed to demonstrate a relationship between diarrhoea in man and the presence of the bacterium. Moreover, the relatively high frequency of intestinal healthy *Aeromonas* carriers could be considered as indirect evidence for the absence of virulence.

According to Janda and Abbot (1998), the observations of some authors (George et al, 1985; Morgan et al., 1985), together with the severity of some clinical pictures, could suggest that enteric disease can occur only in selected individuals infected with very high inocula of virulent strains. If this is the case, the conditions which cause *Aeromonas* foodborne outbreaks (highly virulent strain, high concentrations in food, highly susceptible individuals) are unlikely to be met.

At the present, bacteria of *Aeromonas* group are on the list of F.D.A. (Food and Drugs Administration) "Foodborne Pathogen Microorganisms" (Anon., 1998a). According to some Authors (Merino et al., 1995), they should be considered as "emerging pathogens" in the group of foodborne diseases. However, this point of view is rather controversial. So far *Aeromonas* infection in man has been sporadic and has had low prevalence, and it has not reached an emergency threshold similar to that attained recently by other foodborne pathogens, namely enterovirulent *E. coli* (Bottarelli, 1998) or *Salmonella enteritidis* (Bottarelli, 1997).

KEYWORDS: *Aeromonas hydrophila*, food, environment, man, animals.

PAROLE CHIAVE: *Aeromonas hydrophila*, alimenti, uomo, animali, ambiente.

SUMMARY - The main characteristics of bacteria belonging to *Aeromonas* genus are reviewed, with special reference to *Aeromonas hydrophila*. This agent can be considered one of the most interesting among the "emerging pathogens" in the group of foodborne diseases, due to increasing reports of acute diarrhoea or other conditions in man and to the isolation of highly virulent strains. *Aeromonas* spp., and particularly the *hydrophila* species, have been isolated from a variety of food, and mainly from fish products. Moreover, several animal species can act as carriers and faecal shedders. Thus, the veterinary surveillance for the presence of this microorganism in food of animal origin should not be overlooked although it must be stressed that, at the present, information about the possibility that food play an important role in the epidemiology of human infections is scarce.

RIASSUNTO - Gli Autori passano in rassegna le più recenti acquisizioni riguardo ai batteri appartenenti al Genere *Aeromonas*, ed in particolare *Aeromonas hydrophila*.

Quest'ultimo può venire annoverato fra i "patogeni emergenti" nel gruppo delle malattie trasmesse attraverso gli alimenti. Infatti, sono in aumento le segnalazioni di casi di diarrea acuta nell'uomo e di altre condizioni patologiche, nonché dell'isolamento di ceppi da ritenere altamente virulenti. *Aeromonas hydrophila* è stata isolata ripetutamente da acque di varia provenienza e da numerosi alimenti sia vegetali che di origine animale; inoltre, in alcune specie animali è stata evidenziata la presenza di portatori ed escretori fecali, sebbene con bassa prevalenza. Le correlazioni epidemiologiche ambiente-animali-uomo hanno fatto sì che il problema sia sentito anche nel settore della sanità pubblica veterinaria. Tuttavia, a mitigare le preoccupazioni, occorre ricordare che molti aspetti dell'eco-patologia delle aeromonadi restano in attesa di chiarimento; fra essi, quello più importante riguarda l'esatto ruolo degli agenti in questione nell'eziopatogenesi degli episodi di malattia enterica nell'uomo.

## References

- 1. Abeyta C., Kaysner C.A., Wekell M.M., Sullivan J.J., Stelma G.N. (1986). Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oyster implicated in an outbreak of foodborne illness. J. Food Prot., 49, 643.
- 2. Abbott S.L., Cheung W.K.W., Kroske-Bystrom S., Malekzadeh T., Janda J.M. (1992). Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. J. Clin. Microb., 30, 1262.
- 3. Addante N., Bianco I., Derobertis A.M., Montagna C.O., Semeraro A.M. (1998). Diffusione dell'*Aeromonas hydrophila* nei formaggi a "pasta filata". Arch. Vet. Ital., 50, 111.
- 4. Akan M., Eyigor A., Diker K.S. (1998). Motile aeromonads in the feces and carcasses of broiler chickens in Turkey. J. Food Prot., 61, 113.
- 5. Ali A., Carnahan A.M., Altwegg M., Lüthy-Hottenstein J., Joseph S.W. (1996). *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genospecies DNA group 2 A. *hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. Med. Microbiol. Lett., 5, 156.
- 6. Altwegg M., Geiss H.K. (1989). *Aeromonas* as a human pathogen. CRC Crit. Rev. Microb., 16, 253.
- 7. Anastasio A., Carlomagno L. (1993). Tossinfezione alimentare da *Aeromonas hydrophila*. Obiett. Doc. Vet., 10, 19.
- 8. Anon (1998a). U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>
- 9. Anon (1998b). The European Commission, Directorate General, Consumer Policy and Consumer Health Protection, Scientific Committee on Food. Opinion on *Aeromonas* in natural mineral water (adopted by SFC on 13/3/98). [http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/sct/out07\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/sct/out07_en.html).
- 10. Araujo R.M., Arribas R.M., Lucena F., Pares R. (1989). Distribution of mesophilic aeromonads in temperate habitats. Relationship with fecal indicator. Wat. Sci. Tech., 21, 247.
- 11. Araujo R.M., Arribas R.M., Pares R. (1991). Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. J. Appl. Bact., 71, 182.
- 12. Bottarelli E. (1997). Epidemiologia delle infezioni da *Salmonella enteritidis* nel pollame. Atti del Corso annuale di perfezionamento "Controllo degli allevamenti zootecnici e dei prodotti derivati". Azzali Ed., Parma, p. 235.
- 13. Bottarelli E. (1998). Infezioni da E. coli O157:H7 nell'uomo e negli animali. Atti del Corso annuale di perfezionamento "Produzioni animali ed alimenti derivati: controllo delle filiere a garanzia del consumatore". Azzali Ed., Parma, p. 153.
- 14. Brown R.L., Sanderson K., Kirov S.M. (1997). Plasmids and *Aeromonas* virulence. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 17, 217.
- 15. Callister S.M., Agger W.A. (1987). Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store products. Appl. Envir. Microb., 53, 249.
- 16. Borch E., Nesbakken T., Christensen H. (1996). Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. Int. J. Food Microbiol., 30, 9.
- 17. Carlton W.W., Hunt R.D. (1978). Bacterial diseases. In: Pathology of Laboratory Animals, eds. Benirschke K., Garner F.M., Jontes T.C., New York, p. 1373.
- 18. Carnahan A.M. (1993). *Aeromonas* taxonomy: a sea of change. Med. Microb. Lett., 2, 206.
- 19. Chamorey E., Forel M., Drancourt M. (1999). An in-vitro evaluation of the activity of chlorine against environmental and nosocomial isolates of *Aeromonas hydrophila*. J. Hosp. Infect., 41, 45.
- 20. Colwell R.R., MacDonell M.T., De Ley J. (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 473.
- 21. Comi G., d'Aubert S., Cantoni C. (1984). *Aeromonas* enterotossici in alimenti. Ind. Alim., 7, 597.
- 22. Cusick P.K., Bullock B.C. (1973). Ulcerative stomatitis and pneumonia associated with *Aeromonas hydrophila* infection in the bottle-nosed dolphin. J.A.V.M.A., 163, 578.
- 23. Di Girolamo I., Volterra L. (1993). Il germe emergente *Aeromonas*: aspetti ecologici e sanitari. Ig. Mod., 99, 455.
- 24. Dobrescu L. (1978). Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* from a case of piglet diarrhea. Zentr. Vet B., 25, 713.
- 25. Dooley J.S.G., Trust T.J. (1988). Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein. J. Bacteriol., 170, 499.
- 26. Esteve C., Gutiérrez M.C., Ventosa A. (1995). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. Int. J. Syst. Bacteriol., 45, 462.
- 27. Garcia-Gimeno R.M., Sanchez-Pozo M.D., Amaro-Lopez M.A., Zurera-Cosano G. (1996). Behaviour of *Aeromonas hydrophila* in vegetable salads stored under modified atmosphere at 4° and 15° C. Food Microb., 13, 369.
- 28. George W.L., Nakata M.M., Thompson J., White M.L. (1985). *Aeromonas*-related diarrhea in adults. Arch. Intern. Med., 168, 215.
- 29. Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura. Vol. II. Patologia. Tip. E. Bono, Torino, p.96.
- 30. Gray S.J. (1984). *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. J. Hyg., 92, 365.
- 31. Hanninen M.L., Siitonen A. (1995). Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. Epidemiol. Infect., 115, 39.
- 32. Ho A.S.Y., Sohel I., Schoolnik G.K. (1992). Cloning and characterization of fpx, the flexible pilin gene of *Aeromonas hydrophila*. Mol. Microb., 6, 2725.
- 33. Hokama A., Inagawa M. (1991). Purification and characterization of *Aeromonas sobria* pili, a possible colonization factor. Infect. Immun., 59, 3478.
- 34. Huys G., Kämpfer P., Altwegg M., Kersters I., Lamb A., Coopman R., Luthy-Hottenstein J., Vancanneyt M., Janssen P., Kersters K. (1997). *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 1165.
- 35. Ibrahim A., Mac Rae I.C. (1991). Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. in red meat and milk samples in Brisbane, Australia. Int. J. Food. Microbiol. 12, 263.
- 36. Ingham S.C. (1990). Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* on cooked crayfish tails during cold storage under air, vacuum and modified atmosphere. J. Food Prot., 53, 665.
- 37. Janda J.M. (1991). Recent advances in the study of taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin. Microb. Rev., 4, 397.
- 38. Janda J.M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndrome associated with the genus *Aeromonas*. Clin. Microb. Rev., 4, 397.
- 39. Janda J.M., Abbott S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Clin. Infect. Dis., 27, 332.
- 40. Janda J.M., Duffey S. (1988). Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification and infectious disease spectrum. Rev. Inf. Dis., 10, 980.

- 41. Janda J.M., Oshiro L.S., Abbott S.L., Duffey P.S. (1987). Virulence markers of mesophilic *Aeromonas*: association of autoagglutination phenomenon with mouse pathogenicity and the presence of a cell-associated layer. *Infect. Immun.*, 55, 3070.
- 42. Kay W.W., Buckley J.T., Ishiguro E.E., Phipps B.M., Monette J.P.L., Trust T.J. (1981). Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.*, 147, 1077.
- 43. Khalil N.G. (1997). Incidence of *Aeromonas hydrophila* group in raw milk and some dairy products in Assiut City. *Assiut Vet. Med. J.*, 37, 100.
- 44. Khardori N., Fainstein V. (1988). *Aeromonas* and Plesiomonas as etiological agents. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42, 395.
- 45. Knochel S., Jeppesen C. (1990). Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. *Int. J. Food Microb.*, 10, 317.
- 46. Krovacek K., Huang K., Sternberg S., Svenson S. (1998). *Aeromonas hydrophila* septicaemia in a grey seal (*Halichoerus grypus*) from the Baltic Sea: a case study. *Comp. Immunol., Microbiol. & Infect. Dis.*, 21, 43-49.
- 47. Majeed K., Egan A., Mac Rae I.C. (1989a). Enterotoxigenic aeromonads on retail lamb meat and offal. *J. Appl. Bact.*, 67, 165.
- 48. Majeed K., Egan A., Mac Rae I.C. (1989b). Incidence of aeromonads in samples from an abattoir processing lambs. *J. Applied Bacteriol.*, 67, 597.
- 49. Marcus L.C. (1981). *Veterinary Biology and Medicine of Captive Amphibians and Reptiles*. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 83.
- 50. Martinez-Murcia A.J., Esteve C., Garay E., Collins M.D. (1992). *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 70, 199.
- 51. Merino S., Camprubi S., Tomàs J.M. (1992). Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *Infect. Immun.*, 60, 4343.
- 52. Merino S., Rubires X., Knochel S., Tomàs J.M. (1995). Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int. Food Microb.*, 28, 157.
- 53. Montagna C.O., Addante N., Bianco I., Derobertis A.M. (1998). Tossinfezione alimentare da *Aeromonas hydrophila* HG1. *Arch. Vet. Ital.*, 50, 105.
- 54. Morgan D.R., Johnson P.C., DuPont H.L., Satterwhite T.K., Wood L. V. (1985). Lack of correlation between virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infect. Immun.*, 50, 62.
- 55. Moro E.M.P., Weiss R.D.N., Friedrich R.S.C., de Vargas A.C., Weiss L.H.N., Nunes M.P. (1999). *Aeromonas hydrophila* isolated from cases of bovine seminal vesiculitis in south Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 189.
- 56. Ottaviani D., Leoni F., Giacconi R., Bacchiocchi I., Carraturo A., Sbaraglia G., Giammarioli M. (1998). *Aeromonas* patogeni negli alimenti: messa a punto di un protocollo operativo per la identificazione e valutazione di virulenza. *Ig. Mod.*, 110, 159.
- 57. Paniagua C., Arguello-Villares J.L., Arias M.A., Herreros M. (1998). *Aeromonas hydrophila* associated with a severe outbreak of infection in farmed rabbits. *Zentr. Hyg. Umweltmed.*, 201, 423.
- 58. Palumbo S.A., Abeya C., Stelma G. (1992). *Aeromonas hydrophila* group. In: Vanderzant C., Splitstoeser F. Eds. *Compendium of methods for microbiological examination of food*. Washington, A.P.H.A., 497.
- 59. Pierce R.L., Dalye C.A., Gates C.E., Wohlgemuth K., Brookings V.M. (1973). *Aeromonas* septicemia in a dog. *J.A.V.M.A.*, 162, 469.
- 60. Popoff M. (1984). Genus II *Aeromonas*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I, ed. N.R. Krieg e J.G. Holt, Baltimore, Md: Williams & Wilkins, IX ed., p. 545.
- 61. Saito R., Schick S. (1973). *Aeromonas hydrophila* peritonitis. *Cancer Chem. Rep.*, 57, 489.
- 62. Schiavano G.F., Bruscolini F., Albano A., Brandi G. (1998). Virulence factors in *Aeromonas* spp. and their association with gastrointestinal disease. *New Microbiol.*, 21, 23.
- 63. Singh U. (1997). Isolation and identification of *Aeromonas* spp. from ground meats in eastern Canada. *J. Food prot.*, 60, 125.
- 64. Sisti M., Albano A., Brandi G. (1998). Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. *Let. Appl. Microbiol.*, 26, 347.
- 65. Skoll P.J., Hudson D.A., Simpson J.A. (1998). *Aeromonas hydrophila* in burn patients. *Burns*, 24, 350.
- 66. Stern N.J., Drazek E.S., Joseph S.W. (1987). Low incidence of *Aeromonas* sp. in livestock feces. *J. Food Prot.*, 50, 66.
- 67. Tsai G.J., Chen T.H. (1996). Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. *Int. J. Food Microbiol.*, 1-3, 121.
- 68. Varnam A.H., Evans M.G. (1991). *Food pathogens: an illustrated text*. Wolfe Publ. Ltd, p. 185.
- 69. Varone D., Cola L., Mazzara M.R., Napolitano V., Giordano G., Varone G. (1998). Due casi di gastroenterite acuta da *Aeromonas hydrophila*, batterio patogeno emergente. *Ig. Mod.*, 110, 199.
- 70. Ventura C., Civera T., Grassi M.A. (1998). *Aeromonas* ed alimenti: rischi sanitari e modalità di controllo. *Ind. Alim.*, 37, 982.
- 71. Yamada S., Matsushita S., Dejsirilert S., Kudoh Y. (1997). Incidence and clinical symptoms of *Aeromonas*-associated travellers' diarrhoea in Tokyo. *Epidemiol. Infect.*, 119, 121.