

TERMINAZIONI NERVOSE NELLE CAPSULE ARTICOLARI DELLE PRINCIPALI ARTICOLAZIONI DEGLI ARTI NELLA NUTRIA.

Acone F.*, Dessole A.*, Ragionieri L.**, Gazza F.**, Cappai M.G.*, Botti M.**

Introduzione

L'importanza anatomica, fisiologica e clinica dei diversi distretti articolari ha da sempre sollecitato l'interesse dei ricercatori come dimostrano le numerose osservazioni condotte nei Primati (Stilwell, 1957; Polacek, 1961, 1965; Palmieri e Veggetti, 1970, 1971; Sathian e Devanandan, 1983; Babu e Devanandan, 1995), nell'Uomo (Loffredo, 1949; Rossi, 1950; Stilwell, 1957; Ralston III e Coll., 1960; De Luca e Grosso, 1968; Sathian e Devanandan, 1983; Pionchon e Coll., 1986; Zymny, 1988; Zymny e Coll., 1988; De Avila e Coll., 1989; Fuss, 1989; Krenn e Coll., 1990; Fuss, 1991), nei Mammiferi (Ottolenghi, 1931, 1932; Rossi, 1950; Samuel, 1952; Rosati e Giordano Lanza, 1958; Hromada e Polacek, 1958; Polacek, 1961, 1965, 1966; Karamanlidis, 1965; Callegari, 1966; Freeman e Wyke, 1967 a-b; Goglia e Skelenskà, 1969; Skelenskà, 1970; Novotný, 1973; Halata, 1977; Palmieri e Coll., 1979, 1982; Farina e Sanna, 1985; Zimny, 1988; Sjölander e Coll., 1989; Strasmann e Coll., 1990; Marinozzi e Coll., 1991; Fuss, 1991; Panu e Coll., 1995; Backenköhler e Coll., 1996), negli Uccelli (Polacek e Coll., 1966; Polacek, 1966; Palmieri, 1969 a-b; Malinovsky e Zemanek, 1970), negli Anfibi (Pac, 1970) e nei Rettili (Pac, 1968 a-b; Palmieri e Panu, 1972).

Scopo della presente ricerca è quello di studiare quanti-qualitativamente la componente nervosa delle principali articolazioni degli arti di un mammifero non ancora considerato: la Nutria (*Myocastor coypus*).

Materiale e metodi

Da 4 nutrie adulte (età compresa fra 4 e 5 anni) sono state prelevate, subito dopo il sacrificio eseguito mediante inoculazione di un farmaco eutanatico (TANAX[®], Hoechst), le capsule articolari delle articolazioni della spalla, del gomito, dell'anca e del ginocchio.

Il materiale freschissimo è stato sottoposto ad impregnazione con cloruro d'oro secondo la metodica di Ruffini (1897) oppure applicando alla stessa le varianti introdotte da Goglia (1965).

* Dipartimento di Biologia Animale dell'Università degli Studi di Sassari

** Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli Studi di Parma

Risultati

Tutti i territori considerati sono provvisti di un cospicuo presidio nervoso sensitivo, abbastanza uniformemente distribuito, costituito da terminazioni libere e capsulate; non sono state rilevate differenze significative individuali e nell'ambito dello stesso soggetto tra le articolazioni dell'arto toracico rispetto a quello pelvico.

Le terminazioni libere sono meno numerose dei recettori capsulati e sono, di norma, originate da fibre sottili che si manifestano, solitamente, in forma di fitti intrecci e delicate volute. La uniforme distribuzione della componente nervosa prima ricordata esclude una particolare collocazione topografica delle espansioni in esame che negli strati più superficiali dei legamenti si accompagnano spesso al decorso dei vasi.

Le forme corpuscolate sono morfologicamente classificabili come corpuscoli di Pacini (Fig. 1), paciniformi (Figg. 2, 3) e corpuscoli di Ruffini (Fig. 4) e la successione della elencazione corrisponde anche alle frequenze registrate. Questi recettori si possono rinvenire isolati, riuniti a costituire infiorescenze (Fig. 5), generalmente semplici, oppure corpuscoli opposto-polari (fig. 6); quest'ultimo reperto è sicuramente più raro e sembra interessare solo i corpuscoli di Pacini. Talvolta gruppi di corpuscoli (il numero varia da 7 a 16) occupano un'area di pochi mm². Non è infrequente vedere corpuscoli paciniformi in prossimità di vasi sanguigni.



Fig. 1 - Nutria: articolazione della spalla. Corpuscolo di Pacini isolato. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 120x.



Fig. 2 - Nutria: articolazione del gomito. Corpuscoli isolati di Pacini (in alto e a sn) e paciniforme (a dx). Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini modificata da Goglia. Microfot. 120x.

I corpuscoli di Pacini, di forma ovoidale lievemente flessuosa, sono generalmente di piccole dimensioni (diametro maggiore compreso tra 82 e 211 micron e minore tra 19 e 103 micron). La struttura è quella tipica con capsula poco sviluppata di cui è poco evidente la risoluzione lamellare e suola di sostegno sempre intensamente impregnata dal sale aurico. L'assone espansionale, generalmente ramificato, solo raramente esaurisce la sua corsa col classico bottone apicale. Il fitto intreccio della divisione assonica è spesso mascherato dall'intensa impregnazione della suola (Fig. 7 A,B).



Fig. 3 - Nutria: articolazione dell'anca. Corpuscolo paciniforme isolato. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini modificata da Goglia. Microfot. 120x.

I corpuscoli paciniformi, decisamente più lunghi dei Pacini (diametro maggiore che varia da 378 a 721 micron e minore compreso tra 45 e 123 micron), mostrano, rispetto a questi, anche una più accentuata flessuosità. Il rivestimento capsulare è sempre scarso e di esso non è apprezzabile la risoluzione lamellare, mentre la morfologia ed il

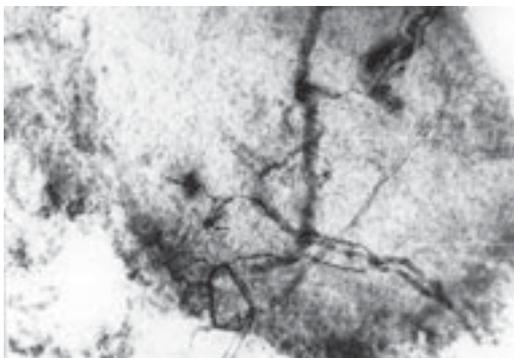


Fig. 4 - Nutria: articolazione del ginocchio. Corpuscoli di Ruffini organizzati a formare una infiorescenza semplice (frecche). Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 70x.

comportamento del cilindrase espansionale appare mascherato dall'impregnazione della suola (Figg. 2, 3, 6).

I corpuscoli di Ruffini, come già riferito, sono sicuramente i meno rappresentati in tutte le articolazioni considerate ma solo raramente si osservano isolati. Hanno forma sferoidale o lievemente ellissoidale e sono di piccole dimensioni. La struttura è quella tipica e l'evidenza dell'avvolgimento capsulare non è possibile anche alle più forti risoluzioni del microscopio ottico (Figg. 4, 5).

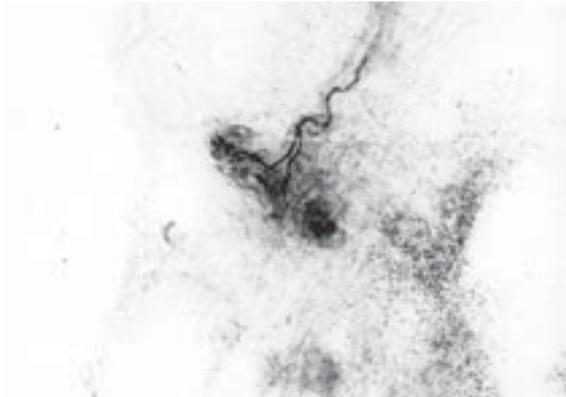


Fig. 5 - Nutria: articolazione del gomito. Altra immagine di infiorescenza semplice di corpuscoli di Ruffini. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini modificata da Goglia. Microfot. 120x.



Fig. 6 - Nutria: articolazione dell'anca. Corpuscoli paciniformi "opposito-polari". Le frecce indicano il punto in cui il cilindrase abbandona un corpuscolo per impegnarsi in un altro. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini modificata da Goglia. Microfot. 70x.

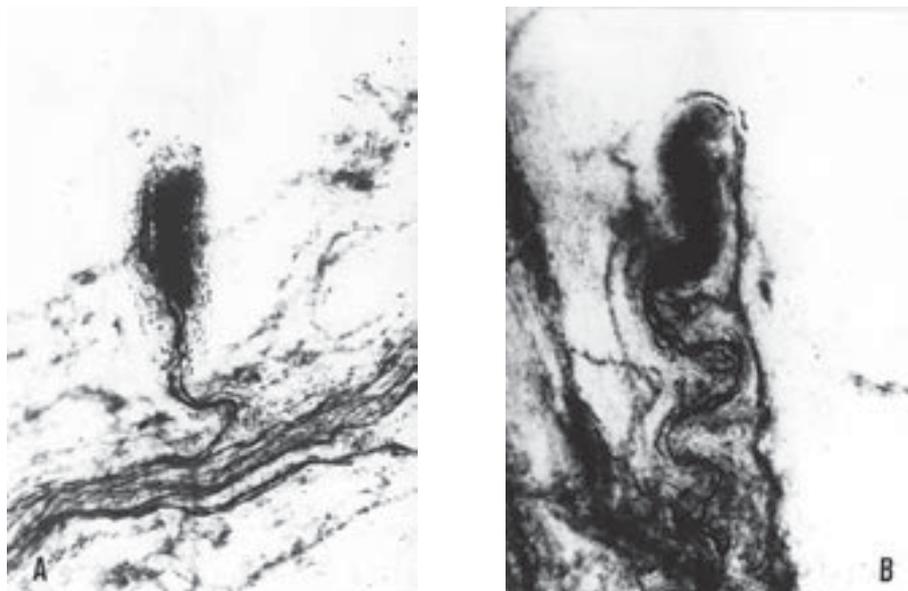


Fig. 7 A, B - Nutria: articolazioni del ginocchio (A) e dell'anca (B). Le immagini lasciano intravedere la ramificazione del cilindrasse espansionale. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 190x.

Discussione

I risultati conseguiti sono nel complesso soddisfacenti anche in considerazione della difficoltà registrata nell'allestimento dei preparati per la eccessiva consistenza di parti del materiale prelevato, in particolare dalle articolazioni del ginocchio e del gomito. Analoghe difficoltà, in precedenza, sono state riscontrate nelle articolazioni metacarpo falangee di scimmia ed uomo da Sathian e Devanandan (1983) i quali hanno riferito che per impiegare l'impregnazione argentea secondo la metodica di Barker ed Ip ".....The chief obstacle presented by articular tissue to application of this method appears to be its toughness".

I dati ottenuti confermano, tuttavia, per la nutria quanto la letteratura riferisce in analoghe osservazioni condotte in numerose specie di Mammiferi, Uccelli, Anfibi e Rettili. Pertanto anche le articolazioni degli arti della nutria sono provviste di un cospicuo presidio nervoso formato da terminazioni libere e capsulate.

Però questi dati non consentono, almeno per il momento, di attribuire una chiara prevalenza della componente in discorso alle articolazioni dell'arto toracico rispetto a quelle dell'arto pelvico e ad una delle articolazioni nell'ambito dello stesso arto. E' possibile che l'estensione delle indagini ad un maggior numero di esemplari, verosimilmente di giovane età per ridurre e/o eliminare l'inconveniente tecnico lamentato, possa confermare l'impressione attuale di una prevalenza nelle articolazioni dell'arto pelvico e segnatamente nel ginocchio.

Venendo ora alle diverse forme recettoriali rinvenute si può constatare che i nostri

risultati confermano, in generale, quelli di precedenti ricerche condotte nell'uomo e in numerosi altri mammiferi (Loffredo, 1949; Rossi, 1950; Stilwell, 1957; Rosati e Giordano Lanza, 1958; Ralston III e Coll., 1960; Polacek, 1961, 1965, 1966; Palmieri e Veggetti, 1970, 1971; Novotný, 1973; Halata, 1977; Sathian e Devanandan, 1983; Farina e Sanna, 1985; Zimny, 1988; Zimny e Coll., 1988; Sjölander e Coll., 1989; Marinozzi e Coll., 1991; Babu e Devanandan, 1995; Panu e Coll., 1995; Backenköhler e Coll., 1996).

Inoltre, anche il rapporto topografico osservato tra corpuscoli paciniformi e vasi sanguigni è in armonia con quanto riferito da Sathian e Devanandan (1983) per i quali ".....Paciniform corpuscles were situated close to blood vessels; often near their bifurcations, frequently encircled by them, or lying amidst a complex vascular network". A questo punto è doveroso precisare che il confronto tra i risultati di questa indagine e quelli riportati in letteratura non si basa su dati omogenei dal momento che non riguardano una precisa articolazione e, nell'ambito di questa, un ben definito legamento. Sarebbe quindi più corretto dire che i dati registrati nelle diverse osservazioni denunciano una certa variabilità, soprattutto a carico delle terminazioni capsulate. Infatti la presenza di alcune forme recettoriali (corpuscoli di Golgi Mazzoni e di Krause) è ammessa da alcuni AA. e negata da altri. E' però anche doveroso sottolineare che le terminazioni nervose fin qui rinvenute e descritte, pur essendo morfologicamente diverse, sono tutte dei meccanocettori dal punto di vista funzionale. Quindi, se è corretta questa premessa, si potrebbe sostenere che il citato presidio è diverso solo apparentemente dal momento che è in grado di assicurare la funzionalità delle varie articolazioni e perciò degli arti a prescindere dalla specie.

Parole chiave: nutria, capsule articolari, arti, innervazione.

Key words: coypu, joint capsules, limbs, innervation.

Riassunto

Gli AA. hanno studiato nella nutria la componente nervosa presente nelle capsule articolari delle principali articolazioni degli arti.

Essi hanno trovato terminazioni nervose libere e capsulate come Pacini, paciniformi e Ruffini. Tutte queste forme recettoriali mostrano struttura tipica e possono trovarsi isolate, riunite a costituire infiorescenze o modelli di corpuscoli opposito-polari.

Non sono state rilevate differenze quanti-qualitative né tra il contingente nervoso di articolazioni dell'arto toracico rispetto al pelvico né tra articolazioni dello stesso arto.

Summary

The AA. have studied the nerve component located in the large coypu joint capsules of the fore and hind limbs.

They have found free and encapsulated nerve endings such as Pacini, pacini-like and Ruffini's corpuscles. All the above recorded receptors show the typical structure and can be found isolated, grouped to constitute flower-sprays or organized to form opposito-polar corpuscles.

Remarkable differences have not been observed neither between the nerve component of the joints of the fore and hind limb nor between the joints of the same limb.

Bibliografia

BABU K. S., DEVANANDAN M. S. (1995). Sensory receptors situated in the interphalangeal joint capsule of the fingers of the Bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Acta Anat.* 153, 49-56.

BACKENKÖHLER U., HALATA Z., STRASMANN T. J. (1996). The sensory innervation of the shoulder joint of the mouse. *Ann. Anat.* 178, 173-181.

CALLEGARI E. (1966). Osservazioni sul legamento sesamoideo prossimale nel cavallo. *Atti S.I.S.Vet.* 20, 174-175.

DE AVILA G. A., O'CONNOR B. L., VISCO D. M., SISK T. D. (1989). The mechanoreceptor innervation of the human fibular collateral ligament. *J. Anat.* 162, 1-7.

DE LUCA B., GROSSO F. M. (1968). Ricerche istologiche sulla vascolarizzazione e sulla innervazione del « ligamentum capitis femoris ». *Quad. Anat. Prat.* 24, 3-18.

FARINA V., SANNA L. (1985). Espansioni nervose sensitive nelle capsule articolari delle articolazioni scapoloomerale e coxofemorale della capra. *Studi Sassaresi* 63, 21-23.

FREEMAN M. A. R., WYKE B. (1967a). The innervation of the ankle joint. An anatomical and histological study in the cat. *Acta Anat.* 68, 321-333.

FREEMAN M. A. R., WYKE B. (1967b). The innervation of the knee joint. An anatomical and histological study in the cat. *J. Anat.* 101, 505-532.

FUSS F. K. (1989). Anatomy of the cruciate ligaments and their function in extension and flexion of the human knee joint. *Am. J. Anat.* 184, 165-176.

FUSS F. K. (1991). Anatomy and function of the cruciate ligaments of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*): a comparison with human cruciates. *J. Anat.* 178, 11-20.

GOGLIA G. (1965). Sopra una modificazione del metodo aurico di Ruffini per la dimostrazione dei recettori nervosi. *Quad. Anat. Prat.* 18, 40-56.

GOGLIA G., SKELENSKÁ A. (1969). Ricerche ultrastrutturali sopra i corpuscoli di Ruffini delle capsule articolari nel coniglio. *Quad. Anat. Prat.* 25, 14-27.

HALATA Z. (1977). The ultrastructure of the sensory nerve endings in the articular capsule of the knee joint of the domestic cat (Ruffini corpuscles and Pacinian corpuscles). *J. Anat.* 124, 717-729.

HROMADA J., POLÁČEK P. (1958). A contribution to the morphology of encapsulated nerve endings in the joint capsule and in the periarticular tissue. *Acta Anat.* 33, 187-202.

KARAMANLIDIS A. N. (1965). Les terminaisons nerveuses dans le ligament métacarpo-phalangien postérieur (ligament sésamoïdien supérieur ou ligament suspenseur du boulet) des équidés et bovidés. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 48, 350-370.

KRENN V., HOFMANN S., ENGEL A. (1990). First description of mechanoreceptors in the corpus adiposum infrapatellare of man. *Acta Anat.* 137, 187-188.

LOFFREDO C. (1949). Le espansioni nervose sensitive periarticolari del ginocchio nell'uomo. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 25, 1-4.

- MALINOVSKY L., ZEMÁNEK R. (1970). Sensory nerve endings in the joint capsules of the large limb joints in the domestic hen (*Gallus domesticus*) and the rook (*Corvus frugilegus*). *Folia Morphol.* 18, 206-212.
- MARINOZZI G., FERRANTE F., GAUDIO E., RICCI A., AMENTA F. (1991). Intrinsic innervation of the rat knee joint articular capsule and ligaments. *Acta Anat.* 141, 8-14.
- NOVOTNÝ V. (1973). Relation between receptor kind and afferent fibre diameter in the knee-joint capsule of the cat. *Acta Anat.* 86, 436-450.
- OTTOLENGHI M. (1931). Ricerche intorno al legamento sesamoideo prossimale (sospensore del nodello) degli Equini, con particolare riguardo alle espansioni nervose. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 28, 555-568.
- OTTOLENGHI M. (1932). Intorno al legamento sesamoideo prossimale (sospensore del nodello) del Bue. *Monit. Zool. Ital.* 43, 179-185.
- PÁC L. (1968 a). Sensory nerve endings in the joint capsules of some Lacertilia. *Scripta Med.* 41, 155-161.
- PÁC L. (1968 b). Sensory nerve endings in the joint capsules of the Tortoise (*Testudo graeca*). *Folia Morphol.* 16, 43-47.
- PÁC L. (1970). A contribution to the study of the joint receptors of the Frog (*Rana temporaria* L.). *Folia Morphol.* 18, 46-51.
- PALMIERI G. (1969 a). Innervazione sensitiva nelle articolazioni di anitra e pollo. *Atti S.I.S.Vet* 23, 1-2.
- PALMIERI G. (1969 b). Espansioni nervose sensitive nelle articolazioni di anitra e pollo. *Riv. Biol.* 62, 329-350.
- PALMIERI G., ASOLE A., PANU R., FARINA V. e SANNA L. (1982). Further observations on the innervation of the proximal sesamoidean ligament of the horse and ox. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 65, 121-133.
- PALMIERI G., PANU R. (1972). Innervazione sensitiva nelle articolazioni di Caiman sclerops. *Atti Soc. Ital. Biol. Sper.* 48, 507-510.
- PALMIERI G., PANU R., ASOLE A. (1979). Innervazione sensitiva del legamento sesamoideo prossimale dell'ovino. *Quad. Anat. Prat.* 35, 229-240.
- PALMIERI G., VEGGETTI A. (1970). Osservazioni preliminari sui recettori articolari di *Cercopithecus aethiops*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 47, 148-150.
- PALMIERI G., VEGGETTI A. (1971). Innervazione sensitiva nelle articolazioni di *Cercopithecus aethiops*. *La Nuova Veterin.* 47, 281-290.
- PANU R., SANNA L., BO MINELLI L., ACONE F., GAZZA F., PALMIERI G. (1995). Articolazione del ginocchio del cavallo. Aspetti morfologici, principali connessioni ed innervazione sensitiva dei legamenti patellari e femoro-patellari e della capsula articolare femoro patellare. *Rivista S.I.D.I.*, 4, 197-209.
- PIONCHON H., TOMMASI M., PIALAT J., BANCEL B., CHAZAL J., ESCANDE G., SCHEYE TH., VANNEUVILLE G. (1986). Etude de l'innervation des ligaments rachidiens a l'etage lombaire. *Bull. Assoc. Anatomistes* 70, 63-67.
- POLÁČEK P. (1961). Differences in the structure and variability of encapsulated nerve endings in the joints of some species of mammals. *Acta Anat.* 47, 112-124.
- POLÁČEK P. (1965). Differences in the structure and variability of spray-like nerve endings in the joints of some mammals. *Acta Anat.* 62, 568-583.

- POLÁČEK P. (1966). Receptors of the joints. Their structure, variability and classification. *Acta Facultatis Medicae Universitatis Brunensis*, 1-107.
- POLÁČEK P., SKLENSKÀ A., MALINOVSK_ L. (1966). Contribution to the problem of joint receptors in birds. *Folia Morphol.* 14, 33-42.
- RALSTON H. J. III, MILLER M. R., KASAHARA M. (1960). Nerve endings in human fasciae, tendons, ligaments, periosteum, and joint synovial membrane. *Anat. Rec.* 136, 137-139.
- ROSATIP., GIORDANO LANZA G. (1958). Il contingente nervoso nelle articolazioni di alcuni ruminanti. *Acta Medica Veterin.* 4, 54-68.
- ROSSI F. (1950). Sur l'innervation fine de la capsule articulaire. *Acta Anat.* 10, 161-232.
- RUFFINI A. (1897). Observation on sensory nerve endings in voluntary muscles. *Brain*, 20, 368-374.
- SAMUEL E. P. (1952). The autonomic and somatic innervation of the articular capsule. *Anat. Rec.* 113, 53-70.
- SATHIAN K., DEVANANDAN M. S. (1983). Receptors of the metacarpophalangeal joints: a histological study in the bonnet monkey and man. *J. Anat.* 137, 601-613.
- SJÖLANDER P., JOHANSSON H., SOJKA P., REHNHOLM A. (1989). Sensory nerve endings in the cat cruciate ligaments: a morphological investigation. *Neurosci. Lett.* 102, 33-38.
- SKLENSKÀ A. (1970). Zur lokalisation einiger sensibler nervenendigungen innerhalb der perineurothelialen scheide. *Acta Anat.* 75, 92-99.
- STILWELL D. L. (1957). The innervation of deep structures of the foot. *Am. J. Anat.* 101, 59-73.
- STRASMANN T., VAN DER WAL J. C., HALATA Z., DRUKKER J. (1990). Functional topography and ultrastructure of periarticular mechanoreceptors in the lateral elbow region of the rat. *Acta Anat.* 138, 1-14.
- ZIMNY M. L. (1988). Mechanoreceptors in articular tissues. *Am. J. Anat.* 182, 16-32.
- ZIMNY M. L., ALBRIGHT D. J., DABEZIES E. (1988). Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta Anat.* 133, 35-40.

PRESENZA DI CELLULE GANGLIARI E TERMINAZIONI NERVOSE LUNGO IL DECORSO DEL FASCIO VASCOLO NERVOSO DEL COLLO DI OCA E POLLO.

Accone F.*, Cappai M.G.*, Orrù A.*, Ragionieri L.***, Botti M.**, Sanna M.*, Gazza F.**

Introduzione

L'individuazione e descrizione di terminazioni nervose libere e capsulate in differenti distretti anatomici sono state oggetto di numerose ricerche, soprattutto in Mammiferi ed Uccelli. In particolare diversi AA. (Loffredo Sampaolo, 1952a-b, 1969; Pansini, 1952, 1954; Manieri e Porciello, 1961; Lambertini e Goglia, 1964; Giordano Lanza e Coll., 1972; Allegri e Coll., 1984) si sono soffermati a verificare la presenza delle citate terminazioni lungo il decorso di vasi sanguigni.

Scopo di questa ricerca è quello di esaminare il fascio vascolo-nervoso del collo di oca e pollo per individuare, localizzare e descrivere le terminazioni nervose e le cellule gangliari eventualmente presenti lungo il suo decorso.

Materiale e metodi

Da 6 oche e 6 polli, di età e sesso differenti, immediatamente dopo il sacrificio eseguito con impiego di un farmaco eutanasi (TANAX[®], HOECHST), è stato prelevato, previa preparazione dissettorica, il fascio vascolo-nervoso del collo a partire dalla sua origine cervicale fino all'ingresso nel torace, a livello della convergenza delle clavicole.

Il prelievo, non comprendente il globo carotideo, è stato diviso in tratti che sono stati numerati in senso cranio-caudale. Sugli stessi è stata eseguita l'impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini (1897) oppure applicando alla stessa le modificazioni apportate da Pelagalli e Schiavo (1958), Pelagalli e Cecio (1959) e Goglia (1965) per migliorarne la risposta.

Risultati

In entrambe le specie considerate sono state individuate delicate reti nervose originate dalla convergenza di fibre di differente diametro; le fibre sottili, apparentemente prive di rivestimento mielinico, sono più numerose delle fibre riccamente mielinizzate. Queste ultime, generalmente riunite a costituire sottili fasci, intrattengo-

* Dipartimento di Biologia Animale dell'Università degli Studi di Sassari

** Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli Studi di Parma

no stretti rapporti con cellule gangliari isolate o più frequentemente riunite a formare ammassi di varie dimensioni (minimo 7 cellule, massimo 392). Le une e gli altri sono spesso localizzati a ridosso dell'epinervio che inguaina i tronchi nervosi, oppure accolti nella compagine o nei punti di convergenza di due o più tronchi (Fig. 1). Detti reperti non sono ubiquitari di un determinato tratto del fascio in esame.

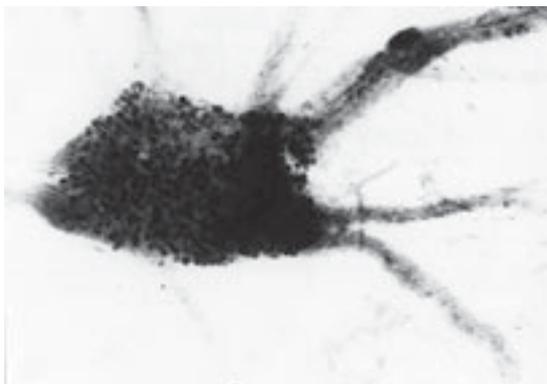


Fig. 1 - Pollo: fascio vascolo-nervoso del collo. In evidenza un grosso ammasso gangliare nel punto in cui tre fasci nervosi confluiscono ed alcuni gangliociti a ridosso dell'epinervio di uno dei tronchi. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 50x.

Le cellule gangliari mostrano forma ellissoidale o più frequentemente sferoidale con lunghezza del diametro che varia da 16.5 a 28.7 micron.

Dalle reti nervose osservate e più precisamente dai fasci più grossi si staccano esili tronchicini costituiti da poche fibre. Il decorso di questi ultimi, parallelo per un tratto più o meno lungo al tronco d'origine, si risolve liberando singole fibre che terminano con caratteristici corpuscoli sempre provvisti di capsula.

Nel connettivo che accompagna il fascio vascolo-nervoso non sono state rinvenute terminazioni libere.

I corpuscoli nervosi, osservati sia nell'oca che nel pollo, sono classificabili come Pacini e paciniformi e sono più generalmente ubicati, in particolare nell'oca, nella parte alta del collo (circa nei due terzi craniali).

I corpuscoli di Pacini, solitamente di forma ovoidale, mostrano volume vario (lunghezza del diametro maggiore oscillante tra 127 e 592 μm e di quello minore tra 63 e 221 μm) e caratteristiche morfologiche diverse, come lo spessore della capsula ed il comportamento del cilindrase espansionale. Possono trovarsi isolati (Fig. 2 A, B) oppure riuniti ad organizzare infiorescenze per lo più semplici (Fig. 3 A, B) e sono frequentemente situati a stretto contatto della componente nervosa del fascio (Fig. 3 A) e lungo il decorso dei grossi vasi o di loro collaterali (Fig. 4). Sono stati rinvenuti anche due Pacini situati, uno di seguito all'altro, lungo il decorso di una stessa fibra nervosa (corpuscoli "opposito-polari").

I corpuscoli sono provvisti di capsula di differente spessore di cui non è mai evidente la struttura lamellare. Il cilindrase espansionale, generalmente indiviso (solo in un corpuscolo si divide in due branche di lunghezza molto diversa), mostra atteggiamento flessuoso o rettilineo a seconda della morfologia del corpuscolo e raramente termi-

na con il tipico bottoncino apicale.

I corpuscoli paciniformi, in numero assai esiguo e solitamente isolati, hanno forma decisamente allungata, andamento rettilineo o lievemente flessuoso, esile rivestimento capsulare e cilindrase espansionale generalmente indiviso (Fig. 5).

E' stato infine osservato un corpuscolo di Pacini di forma sferoidale sostenuto da una fibra nervosa che si divide a livello dello strozzamento preterminale ed i due rami originati si impegnano nel recettore seguendo percorsi individuali e paralleli fra loro (Fig. 6).

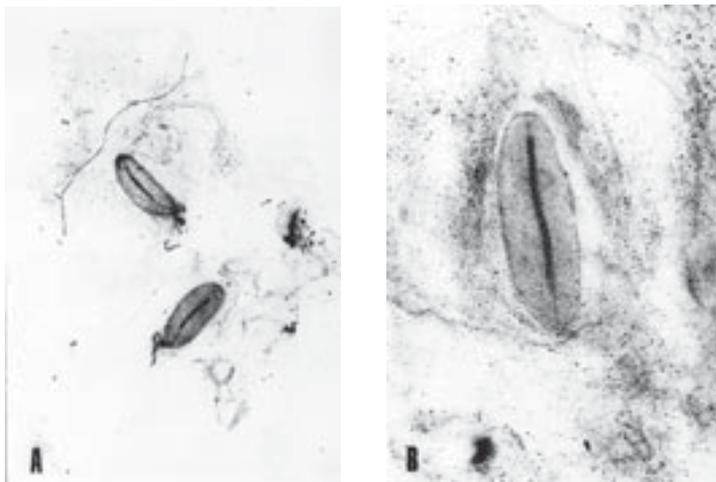


Fig. 2 A, B - Oca (A), Pollo (B): fascio vascolo-nervoso del collo. Corpuscoli di Pacini isolati. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 50x (A), 120x (B).

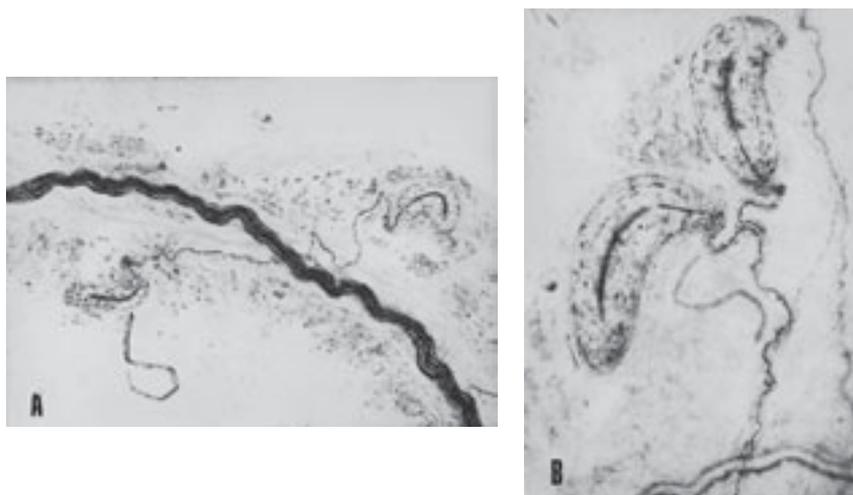


Fig. 3 A, B - Pollo (A), Oca (B): fascio vascolo-nervoso del collo. Infiorescenze semplici di Pacini. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 50x (A), 120x (B).

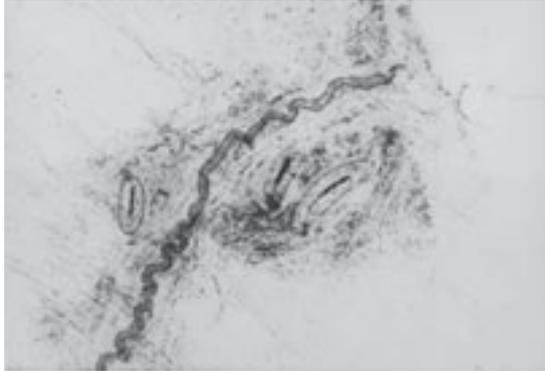


Fig. 4 - Oca: fascio vascolo-nervoso del collo. Corpuscoli di Pacini situati lungo il decorso di un vaso. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 50x

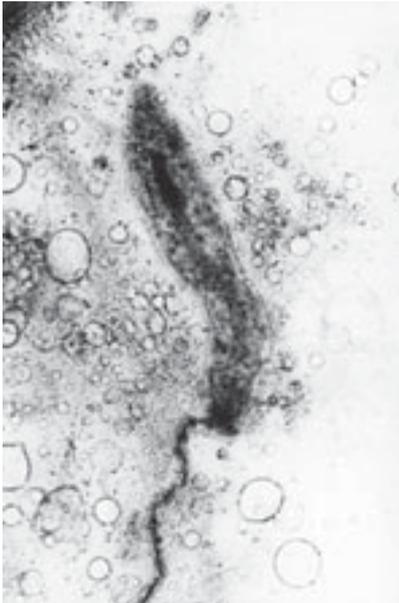


Fig. 5 - Oca: fascio vascolo-nervoso del collo. Corpuscolo paciniforme. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 120x.

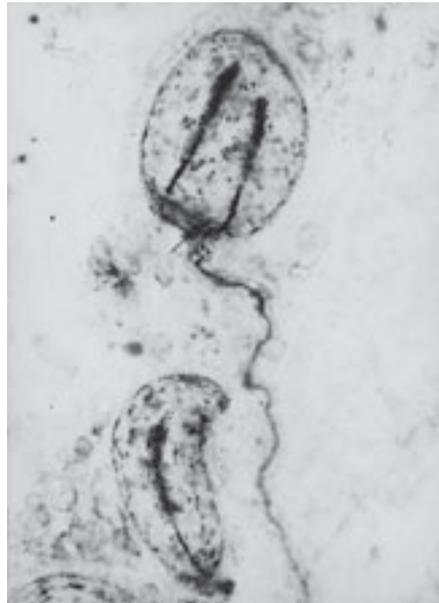


Fig. 6 - Pollo: fascio vascolo-nervoso del collo. Il corpuscolo di Pacini in alto nell'immagine è provvisto di due cilindri espansionali. La fibra che gemma il corpuscolo si divide, a livello dello strozzamento preterminale (freccia), per originare i due assoni espansionali. Impregnazione aurica secondo la metodica di Ruffini. Microfot. 120x.

Discussione

Il fascio vascolo-nervoso del collo, nel pollo e nell'oca, è spesso accompagnato, lungo il suo decorso, dalla presenza di cellule gangliari (innervazione autonoma) e terminazioni nervose provviste di capsula (innervazione sensitiva somatica). Tali presidi, esigui e non costanti, sono sicuramente casuali dal punto di vista inter e intraspecifico sia per la loro consistenza che per la distribuzione topografica. Per questi motivi è difficile poter attribuire agli stessi un preciso ruolo funzionale al di fuori del semplice supporto ai meccanismi già noti di innervazione vegetativa e sensitiva somatica per i visceri e le formazioni muscolari a sede cervicale.

In precedenza corpuscoli nervosi capsulati sono stati rinvenuti nella parete dell'arteria carotide comune di feti umani a termine (Pansini, 1952). In base al citato reperto l'A. avanza l'ipotesi che, benché sussistano incertezze sulla presenza di tali corpuscoli e difficoltà nella loro individuazione, si possa estendere la zona riflessogena della carotide posta in corrispondenza del seno a tutto il tratto che precede la biforcazione della stessa nei suoi rami terminali. Detta ipotesi, successivamente supportata da Manieri e Porciello (1961) in osservazioni condotte su giovani scimmie, non ci sembra condivisibile almeno fino a che i dati non saranno validati statisticamente in ordine alla loro costanza ed alla esatta topografia.

D'altra parte, anche lungo il decorso dell'arteria femorale di uomo sono stati rinvenuti corpuscoli di Pacini, paciniformi e Golgi-Mazzoni ed agli stessi è stata riconosciuta la capacità di raccogliere gli stimoli da inviare centralmente in vista di una successiva regolazione emodinamica (Causo e Lo Re, 1967). Anche per questo dato, in analogia a quanto prima detto, si può sottolineare la rilevanza dal punto di vista anatomico ma, contestualmente, si deve porre l'esigenza di una estensione delle indagini per disporre di una casistica adeguata. A questo riguardo è infatti opportuno precisare che tutti gli AA. citati non fanno cenno nei protocolli al numero dei casi osservati.

Una considerazione a parte merita, infine, il reperto del corpuscolo di Pacini illustrato nella Fig. 6 apparentemente simile all'immagine riportata da Pansini (1954) relativa ad un corpuscolo sostenuto da una fibra che si divide dicotomicamente al suo interno. Nel nostro caso i due assoni espansionali presenti nel recettore sono la diretta continuazione di rami che penetrano separatamente come conseguenza di una probabile disgenesia.

Parole chiave: oca, pollo, fascio vascolo-nervoso, terminazioni nervose.

Key words: goose, chicken, vascular-nervous bundle, nerve endings.

Riassunto

Lungo il fascio vascolo-nervoso del collo di oca e pollo possono trovarsi cellule ed ammassi gangliari e terminazioni nervose capsulate. I gangliociti possono trovarsi a ridosso dell'epinervio oppure nella compagine di fasci nervosi o ancora nei punti di convergenza di più tronchi.

Tra le forme corpuscolate sono state individuate, dal punto di vista morfologico, terminazioni di Pacini e paciniformi e tra questi i primi sono sicuramente più numerosi. La casualità dei reperti e la loro scarsa rappresentatività rendono necessaria l'estensione dell'indagine per poter attribuire agli stessi un impegno funzionale diverso da quello di semplice supporto ai modelli conosciuti di innervazione vegetativa e sensitiva somatica per i visceri e le formazioni muscolari a sede cervicale.

Summary

Isolated or clustered gangliocytes and encapsulated nerve endings could be found along the vascular-nerve bundles's path of the goose and chicken. The gangliocytes can be checked close to the epineurium, within the thickness of the nerve fibres or in the convergence point of several nerve trunks.

From a morphological point of view, among the encapsulated nerve endings, Pacini corpuscles were the most represented.

Because of the fortuity of the findings and their scarce representativeness, further investigations have to be performed in order to state the precise functional engagement, beyond the simple support of the vegetative and sensitive somatic innervation of cervical viscera and muscles.

Bibliografia

ALLEGRI G., RICCI D., MAZZONI M., DEL BORRELLO E., TREVISI M. (1984). Sulle terminazioni nervose nella parete del seno cavernoso dell'Uomo. Arch. It. Anat. Embriol. 89, 197-205.

CAUSO L., LO REF. (1967). Sulla presenza di recettori nervosi capsulati nella parete avventiziale dell'arteria femorale dell'uomo adulto. Quad. Anat. Prat. 13, 1-12.

GIORDANO LANZA G., FUSAROLI P., BRATINA F., CIRINO L. V. (1972). Sulla innervazione della pachimeninge encefalica. Quad. Anat. Prat. 28, 143-154.

GOGLIA G. (1965). Sopra una modificazione del metodo aurico di Ruffini per la dimostrazione dei recettori nervosi. Quad. Anat. Prat. 18, 40-56.

LAMBERTINI G., GOGLIA G. (1964). La Morfologia dei Recettori nervosi. Monit. Zool. It. 72 (suppl.), 24-157.

LOFFREDO SAMPAOLO C. (1952a). Indagine sui recettori sensitivi della pleura e dei vasi intrapolmonari dell'uomo e nei mammiferi. Boll. Soc. It. Biol. Sper. 28, 125-126.

LOFFREDO SAMPAOLO C. (1952b). I recettori sensitivi nelle tuniche dei grossi vasi (Arteria Polmonare). Boll. Soc. It. Biol. Sper. 28, 127-128.

LOFFREDO SAMPAOLO C. (1969). Sulla presenza di apparati nervosi nella capsula di alcune espansioni sensitive e nello spessore dei nervi. Boll. Soc. It. Biol. Sper. 46, 308-310.

MANIERI L., PORCIELLO P. I. (1961). Sulla presenza di corpuscoli nervosi capsulati nella parete del seno carotideo e della carotide. Quad. Anat. Prat. 10, 185-201.

PANSINI A. (1952). Le espansioni nervose pericarotidiche in feti umani a termine.

Quad. Anat. Prat. 7, 73-84.

PANSINI A. (1954). Le espansioni capsulate e i pressocettori vasali del tessuto muscolare striato (Quadricipite femorale di feti umani a termine). Quad. Anat. Prat. 10, 185-201.

PELAGALLI G. V., SCHIAVO A. (1958). L'innervazione sensitiva del proctodeo della gallina domestica. Acta Med. Veterin. 4, 221-239.

PELAGALLI G. V., CECIO A. (1959) Ricerche sulla innervazione vegetativa e sensitiva del proctodeo nella femmina del tacchino. Quad. Anat. Prat. 15, 6-32.

RUFFINI A. (1897). Observations on sensory nerve endings in voluntary muscles. Brain 20, 368-374.

Un approccio per la valutazione della validità dei test diagnostici: le curve R.O.C. (*Receiver Operating Characteristic*)

Ezio Bottarelli¹, Stefano Parodi²

Introduzione

In tutti i campi della scienza vengono sistematicamente messe a punto e utilizzate procedure più o meno complesse e della più svariata natura, ma sempre ben codificate, allo scopo di verificare un'ipotesi. Tali procedure sono comunemente dette "test".

In particolare, in epidemiologia i test rappresentano lo strumento di base nelle operazioni di *screening*, eseguite cioè su popolazioni presuntivamente sane (e nelle quali la prevalenza della malattia in studio è ignota) allo scopo di identificare precocemente la presenza di infezioni o di malattie subcliniche. Anche nell'attività diagnostica di *routine* i test rappresentano elementi fondamentali, e spesso determinanti, nel processo decisionale volto a confermare (o escludere) la presenza di una determinata malattia già sospettata in base ai dati clinici. Nel settore della medicina veterinaria, ai suddetti due vasti campi di azione se ne può aggiungere almeno un terzo che spazia nell'opera di controllo degli alimenti di origine animale, ove i test vengono applicati per determinare sanità e salubrità (es. assenza di agenti patogeni, sostanze chimiche ecc.) dei suddetti prodotti.

In base alla tipologia di responso fornito, i test possono essere classificati in due categorie. Alla prima appartengono i test "qualitativi", ossia che restituiscono un *output* (risposta) dicotomico (es. positivo/negativo, vero/falso ecc.); la seconda, numericamente più consistente, comprende i test di tipo quantitativo, ossia che producono risultati sotto forma di variabili numeriche "discrete" (es. titolo anticorpale su diluizioni seriali di siero) o "continue" (es. test sierologici ELISA su singola diluizione). Per i test quantitativi, l'ottenimento di risultati affidabili è subordinato alla condizione che il parametro misurato (es. concentrazione anticorpale, marcatore tumorale, ecc.) possieda una distribuzione approssimativamente unimodale sia nella classe dei soggetti sani che in quella degli ammalati, ovviamente con medie differenti per ciascuna classe. Tale ipotesi di distribuzione viene detta "bi-normale".

E' evidente che, per i test quantitativi (siano essi discreti o continui), occorre individuare sulla scala di lettura un valore-soglia ("*cut point*" o "*cut off*") che discrimini i risultati da dichiarare "positivi" da quelli "negativi"³. Ciò consente di

¹ Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Salute Animale. Via del Taglio 10, 43100 PARMA. e-mail: ezio.bottarelli@unipr.it

² Istituto G. Gaslini. Sezione Epidemiologia e Biostatistica, Direzione Scientifica. Largo G. Gaslini 5, 16147 GENOVA. e-mail: stefanoparodi@ospedale-gaslini.ge.it

³ Per semplicità, nella trattazione si farà sempre riferimento a test applicati per determinare lo stato di "salute" o "malattia" di un singolo animale. Tuttavia, l'analisi ROC può essere utilizzata anche per test quantitativi capaci di accertare qualsiasi altra condizione (es. infezione o non-infezione, protezione o non-protezione ecc.).

categorizzare in “positivi” e “negativi” la gamma di tutti possibili risultati e di equiparare l’interpretazione di un test quantitativo a quella di un test qualitativo.

Il problema di base che genera incertezza nell’interpretazione di un test risiede nel fatto che – nella grande maggioranza dei casi – esiste una zona di sovrapposizione fra le distribuzioni dei risultati del test medesimo applicato in popolazioni di animali rispettivamente sani e ammalati.

Infatti, se le due popolazioni restituissero valori separati (Figura 1) allora sarebbe facile individuare sull’asse delle ascisse il valore di *cut off* capace di discriminare con precisione assoluta le due popolazioni.

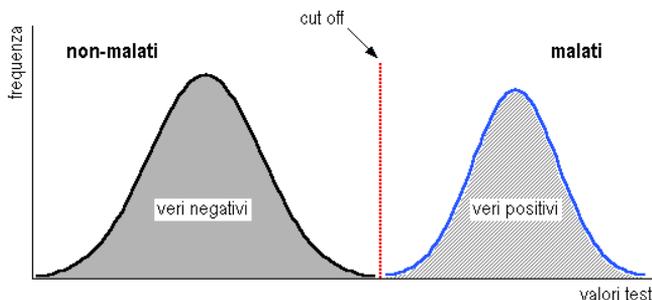


Figura 1. Distribuzione degli esiti di un ipotetico test nelle classi di individui malati e non malati, senza sovrapposizione inter-classe.

Purtroppo, invece, nella pratica si verifica sempre una sovrapposizione più o meno ampia delle due distribuzioni (Figura 2) ed è perciò impossibile individuare sull’asse delle ascisse un valore di *cut off* che consenta una classificazione perfetta, ossia tale da azzerare sia i falsi positivi che i falsi negativi.

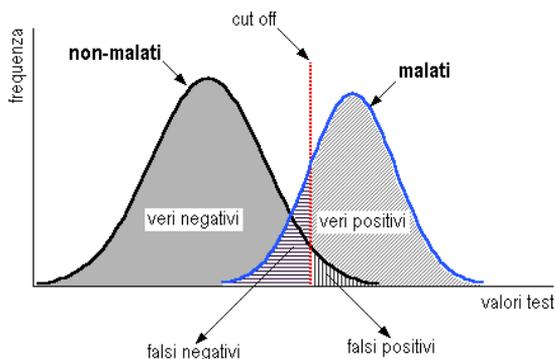


Figura 2. Distribuzione degli esiti di un ipotetico test nelle classi di individui malati e non malati, con sovrapposizione inter-classe.

La capacità diagnostica (o validità o *performance*) di un test ad un determinato valore di *cut off* rappresenta la capacità di condurre ad una diagnosi positiva nei soggetti

affetti da una determinata malattia e ad una diagnosi negativa nei soggetti non ammalati. Essa può essere valutata attraverso una semplice tabella di contingenza (Tabella 1), confrontando l'*output* del test in esame con il vero stato degli animali. Quest'ultimo può essere già noto in partenza (ad esempio, nel caso di una malattia infettiva, saggiando gruppi di animali sicuramente esenti dall'infezione oppure *Specific Pathogen Free* ed altri sottoposti ad infezione sperimentale) oppure può essere stabilito per mezzo di un test di referenza provvisto della più alta attendibilità ("test aureo" o *golden test* o *gold standard*), possibilmente basato su un principio biologico diverso rispetto al test da valutare. In genere i *golden test* presentano alcuni svantaggi (es. difficile somministrazione, rischio per il soggetto da testare, costo elevato, ecc.) che li rendono inapplicabili di *routine* o in operazioni di *screening*. Ai fini del raffronto con il test in studio, nell'ipotesi più semplice si assume che il *golden test* fornisca risultati perfettamente corrispondenti alla verità.

Tabella 1. Tabella di contingenza o tabella della verità.

Test in esame ↓	Golden test ↓	
	positivo (malato)	negativo (non-malato)
positivo	a	b
negativo	c	d

Il confronto fra i risultati del test in esame e l'autentico stato di ogni individuo consente di stimare due importanti parametri: la sensibilità (Se) ossia la probabilità che un animale ammalato risulti test-positivo e la specificità (ossia la probabilità che un animale sano risulti test-negativo):

$$Se = a/(a+c)$$

$$Sp = d/(d+b)$$

Soprattutto nel campo dell'epidemiologia clinica, e cioè quando i test vengono utilizzati a scopo diagnostico e non in operazioni di *screening*, ancor più interessanti risultano altri due parametri e cioè il valore predittivo di un test positivo (o valore predittivo positivo, VP⁺) ed il valore predittivo di un test negativo (o valore predittivo negativo, VP⁻). Contrariamente a Se e Sp, che esprimono probabilità *pre-test*, questi due parametri rappresentano invece probabilità *post-test*, nel senso che individuano, *a fronte di un certo risultato del test*, la probabilità che l'animale in questione sia realmente provvisto (o meno) del carattere ricercato. In particolare, VP⁺ indica la probabilità che un test-positivo sia effettivamente ammalato e, viceversa, VP⁻ indica la probabilità che un test-negativo sia effettivamente sano. Essi possono quindi essere stimati, rispettivamente, dalla proporzione di veri positivi sul totale dei positivi al test (VP⁺) e dalla proporzione di veri negativi sul totale dei negativi al test (VP⁻):

$$VP^+ = a/(a+b)$$

$$VP^- = d/(c+d)$$

E' facile verificare, osservando ad esempio la Figura 2, che Se e Sp sono fra loro inversamente correlate in rapporto alla scelta del valore di *cut off*. Infatti, modificando quest'ultimo si può ottenere uno dei seguenti effetti: [aumento della Se e diminuzione della Sp], oppure [diminuzione della Se ed aumento della Sp]. In altre parole, l'adozione di una soglia che offre un'elevata Se comporta una perdita di Sp e viceversa. E' possibile dimostrare che, quando la distribuzione dei valori nelle due classi malati-sani è di tipo normale, la "soglia discriminante ottimale", ossia il valore di *cut off* che minimizza gli errori di classificazione, è pari al valore in ascissa corrispondente al punto di intersezione delle due distribuzioni. Tuttavia, la scelta del *cut off* non può essere dettata soltanto da considerazioni di ordine probabilistico volte a minimizzare la proporzione di classificazioni errate, ma è necessario basarsi anche sul prevedibile impatto di tipo sanitario, economico, sociale, ecc. di ciascuno dei due tipi di mis-classificazione (falsi positivi e falsi negativi). Ad esempio, per malattie ad alta contagiosità potrebbe essere opportuno minimizzare la quota di falsi negativi, e quindi privilegiare la sensibilità a scapito della specificità. Viceversa, in altre situazioni (es. malattie non contagiose, trattabili soltanto con una terapia molto costosa) il prezzo di un falso positivo sarà verosimilmente superiore rispetto a quello di un falso negativo, e quindi il *cut off* verrà determinato in modo da privilegiare la specificità.

Un metodo empirico comunemente utilizzato per la scelta del *cut off* consiste nel fissare a priori il valore desiderato di specificità (generalmente >0.9) e quindi nel calcolare la corrispondente sensibilità del test nella suddetta condizione. Questo approccio genera tuttavia due effetti collaterali negativi. Il primo è rappresentato dall'evenienza che il test in questione possa produrre risultati complessivamente migliori attraverso l'adozione di un *cut off* diverso da quello scelto. Il secondo è legato all'impossibilità di effettuare un raffronto affidabile fra la *performance* di due o più test valutati in base ad un singolo valore di *cut off*. Pertanto, si configura un evidente e non trascurabile inconveniente pratico quando si tratta di scegliere fra uno o più test e, in subordine, vengono ostacolati gli studi di meta-analisi nei quali, come è noto, vengono effettuate comparazioni qualitative fra risultati ottenuti in studi diversi sullo stesso argomento.

Alle difficoltà ora accennate, è da sovrapporre un ulteriore elemento che ostacola sia la scelta del *cut off* ottimale per un singolo test che il raffronto fra le *performances* di test diversi. Tale elemento è costituito dal fatto che i valori predittivi dipendono, oltre che dalla Se e Sp del test, anche dalla *prevalenza* della malattia nella popolazione studiata. Infatti è intuitivo che, all'aumentare della frazione dei malati nel campione sottoposto al test, la proporzione dei malati positivi aumenti nell'insieme dei positivi al test. Al contrario, per una patologia poco rappresentata tenderà ad aumentare la frazione dei falsi positivi sul totale dei positivi al test. Tali relazioni possono essere ricavate analiticamente applicando alcune regole di base di calcolo delle probabilità (Appendice 1).

Nel complesso, le suddette osservazioni comportano tre importanti implicazioni:

1. è possibile scegliere un valore di *cut off* tale che risponda ad un predeterminato valore di Se o di Sp , ma non è detto che tale valore sia ottimale per gli scopi contingenti;

2. la *Se* e la *Sp* associate ad un singolo valore di *cut off* non rappresentano descrittori esaurienti della *performance* del test potenzialmente ottenibile adottando altri valori di *cut off*;
3. i valori predittivi, in quanto dipendenti dalla prevalenza della malattia nella popolazione studiata, non sono caratteristiche intrinseche del test e quindi non possono essere utilizzati come descrittori esaurienti della *performance* dei test.

Le curve ROC: il principio di base

La gamma di problematiche ora accennate, fatta eccezione per quelle legate alla interrelazione fra valori predittivi e prevalenza, può essere affrontata attraverso l'analisi ROC (*Receiver Operating Characteristic* o *Relative Operating Characteristic*). Si tratta di una metodologia sviluppata per la prima volta durante la II Guerra mondiale per l'analisi delle immagini radar e lo studio del rapporto segnale/disturbo. Essa venne ben presto applicata in altri campi della tecnica e, a partire dagli anni '70, anche in campo medico (Lusted, 1971) inizialmente allo scopo di quantificare l'attendibilità dei responsi di immagini radiografiche interpretate da operatori diversi (Goodenough e coll., 1974; Hanley e McNeil, 1982). In tempi più recenti, l'utilizzo delle curve ROC si è fatto relativamente comune per la valutazione non solo delle immagini, ma anche dei più svariati test sia nel settore medico (con particolare riguardo alla valutazione dei test clinici di laboratorio) (Erdrich 1981, Henderson, 1993) che, in minor misura, in quello veterinario (Greiner, Pfeiffer e Smith, 2000).

L'analisi ROC viene effettuata attraverso lo studio della funzione che – in un test quantitativo – lega la probabilità di ottenere un risultato vero-positivo nella classe dei malati-veri (ossia la sensibilità) alla probabilità di ottenere un risultato falso-positivo nella classe dei non-malati (ossia 1-specificità). In altre parole, vengono studiati i rapporti fra allarmi veri (*hit rate*) e falsi allarmi.

La relazione tra i suddetti parametri può venire raffigurata attraverso una linea che si ottiene riportando, in un sistema di assi cartesiani e per ogni possibile valore di *cut off*, la proporzione di veri positivi in ordinata e la proporzione di falsi positivi in ascissa. Se il risultato del test è riportato su scala continua, si possono calcolare i valori di sensibilità e 1-specificità per ogni valore registrato (oppure, in modo del tutto equivalente, utilizzando la media tra ogni valore e quello precedente). Un altro approccio, applicabile anche a dati ordinali, consiste nel suddividere l'intera gamma di valori restituiti dal test nelle due classi (malati e non-malati) in una serie di *k* intervalli, per *k* variabile in rapporto al numero di dati disponibili (ampiezza del set di dati) e della risoluzione della curva che si desidera ottenere. Ad esempio, nel caso di un ipotetico test ELISA che abbia fornito valori di densità ottica (D.O.) compresi fra 0 e 2.0, l'intervallo potrebbe essere suddiviso per *k*=20, e cioè in 20 intervalli uniformi di ampiezza 0.1. In alternativa, se si utilizzano set di dati a limitata numerosità, è possibile utilizzare intervalli non uniformi individuati attraverso i valori di D.O. ottenuti sperimentalmente nel test. Quest'ultimo approccio consente di ottenere una curva con risoluzione ottimale compatibilmente con lo scarso numero di dati disponibili.

L'unione dei punti ottenuti riportando nel piano cartesiano ciascuna coppia

(Se) e $(1-Sp)$ genera una curva spezzata con andamento a scaletta (*ROC plot*). Per interpolazione, è possibile eliminare la scalettatura (*smoothing*) ed ottenere una curva (*ROC curve*) che rappresenta una stima basata sui parametri del data set sperimentale (Figura 3).

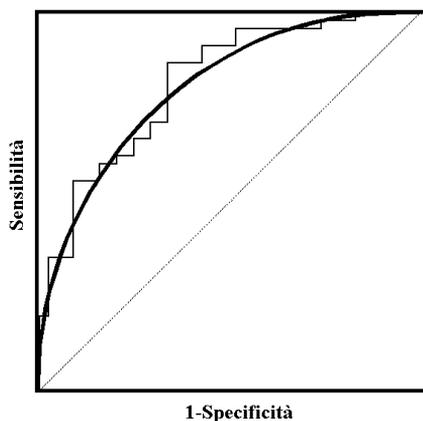


Fig. 3. Curva ROC prima e dopo interpolazione ("smoothing")

Valutazione della capacità discriminante di un test e scelta di *cut off* ottimali

La capacità discriminante di un test, ossia la sua attitudine a separare propriamente la popolazione in studio in "malati" e "sani" è proporzionale all'estensione dell'area sottesa alla curva ROC (*Area Under Curve*, AUC) ed equivale alla probabilità che il risultato di un test su un individuo estratto a caso dal gruppo dei malati sia superiore a quello di uno estratto a caso dal gruppo dei non-malati (Bamber, 1975; Zweig e Campbell, 1993). Per chi è familiare con metodi di statistica non parametrica, risulta evidente la stretta relazione che lega la AUC alla statistica U di Wilcoxon e Mann-Whitney (Appendice 2). Nel caso di un test perfetto, ossia che non restituisce alcun falso positivo né falso negativo (capacità discriminante = 100%), la AUC passa attraverso le coordinate $\{0;1\}$ ed il suo valore corrisponde all'area dell'intero quadrato delimitato dai punti di coordinate (0,0), (0,1), (1,0) (1,1), che assume valore 1 corrispondendo ad una probabilità del 100% di una corretta classificazione. Si noti che, in tale caso limite che corrisponde ad una distribuzione separata della variabile nei due gruppi a confronto (Figura 1), i valori predittivi non dipendono più dalla prevalenza. Al contrario, la ROC per un test assolutamente privo di valore informativo è rappresentata dalla diagonale ("*chance line*") che passa per l'origine, con $AUC=0.5$.

In una curva ROC esistono in genere due segmenti di scarsa o nulla importanza ai fini della valutazione dell'attitudine discriminante del test in esame. Essi sono rappresentati dalle frazioni di curva sovrapposte rispettivamente all'asse delle ascisse ed all'asse delle ordinate. Infatti, i corrispondenti valori possono essere scartati in quanto esistono altri valori di *cut-off* che forniscono una migliore Sp senza perdita di Se o, viceversa, una migliore Se senza perdita di Sp.

Infine è da ricordare che la valutazione di un test attraverso l'AUC viene compiuta attribuendo ugual importanza alla Se e alla Sp, mentre in molti casi è necessario, nella pratica, differenziare il peso da assegnare ai suddetti parametri.

Nella maggioranza degli studi, l'individuazione del *cut off* ottimale viene effettuata assumendo una distribuzione normale per la variabile in studio e si raggiunge adottando un valore pari a: [media aritmetica + 2 deviazioni standard] dei risultati generati dal gruppo di animali sani di referenza. Questo approccio rigido corrisponde ad ottenere un test con specificità pari a 97.5% (Barajas-Rojas e coll., 1993) e presenta lo svantaggio di trascurare completamente il valore della sensibilità. Un'altra possibilità è quella di selezionare un livello di *cut off* sulla base dei percentili della distribuzione dei non-malati (ad esempio, il 90° percentile), e di considerare come potenzialmente malati i soggetti con valori superiori. Tale metodo, cui si è accennato in Introduzione, corrisponde a fissare a priori la specificità del test (si noti, infatti, che il 90° percentile nella distribuzione dei non-malati corrisponde a settare la specificità al 90%). Un approccio più adeguato può essere adottato tenendo in considerazione la relazione che lega sensibilità e specificità, ovvero studiando la curva ROC. L'utilizzo della curva ROC rappresenta infatti un criterio più "flessibile", in quanto offre la possibilità di visualizzare, dato un valore a scelta di Sp, la corrispondente Se e viceversa (Schäfer, 1989).

Come regola generale, si può affermare che il punto sulla curva ROC più vicino all'angolo superiore sinistro rappresenta il miglior compromesso fra sensibilità e specificità. Tuttavia, in condizioni ottimali, la procedura di selezione del *cut off* consiste in un percorso decisionale molto più complesso che deve tener conto, come già ricordato in precedenza, sia della situazione epidemiologica nella popolazione da studiare (con particolare riferimento alla prevalenza della malattia) che dell'esame comparativo delle conseguenze pratiche derivanti dall'ottenimento di risultati falsi positivi e falsi negativi in quella particolare situazione contingente.

Valutazione della *performance* di un singolo test mediante una curva ROC

L'area sottesa ad una curva ROC rappresenta un parametro fondamentale per la valutazione della *performance* di un test, in quanto costituisce una misura di accuratezza non dipendente dalla prevalenza ("pure accuracy"). Poiché AUC rappresenta una stima da popolazione campionaria finita, risulta quasi sempre necessario testare la significatività della capacità discriminante del test, ovvero se l'area sotto la curva eccede significativamente il suo valore atteso di 0.5. Tale procedura corrisponde a verificare se la proporzione dei veri positivi è superiore a quella dei falsi positivi. Dalle proprietà della statistica U, AUC può essere considerata una variabile normale, per cui si può costruire un test z nella seguente maniera:

$$z = \frac{AUC - 0.5}{\sqrt{\sigma^2_{AUC}}}$$

ove σ^2 rappresenta la varianza di AUC.

Se, ad esempio, il valore di z eccede il valore critico di 1.96, si può affermare che il test diagnostico presenta una *performance* significativamente superiore a quella di un test non discriminante, con $p < 0.05$. Se il test z risulta invece significativamente inferiore (curva ROC al di sotto della *chance line*), occorre invertire il criterio di classificazione, in quanto il marcatore evidenziato dal test presenta valori mediamente più elevati nella popolazione dei non-malati (evenienza di difficile riscontro).

In Appendice 3 è riportata la stima della varianza di AUC per dati ordinali, che viene comunemente utilizzata (con buona approssimazione) anche per dati misurati su scala continua. Nella stessa Appendice viene anche illustrato come l'area sottesa ad una curva ROC per dati ordinali, ottenuti per aggregazione di una variabile continua, rappresenti una sottostima della *performance* del test.

Stima dell'area sottesa ad una curva ROC

Il calcolo dell'AUC per una curva empirica (cioè ottenuta da un campione finito) può venire effettuato semplicemente connettendo i diversi punti del ROC *plot* all'asse delle ascisse con segmenti verticali e sommando le aree dei risultanti poligoni generati nella zona sottostante. Come sopra accennato, questa tecnica, detta "regola trapezoidale", può fornire risultati sistematicamente distorti per difetto. I metodi di stima dell'area "vera" e di interpolazione delle curve ROC per dati ordinali vanno oltre i limiti della presente trattazione. Tuttavia, in pratica, il calcolo della AUC può essere eseguito al calcolatore per mezzo di pacchetti statistici completi (NCSS, R, SAS, SPSS, SimStat, Stata, SYSTAT ecc.) oppure di software specifico per la valutazione dei test diagnostici e delle curve ROC. Alcuni di questi ultimi sono riportati nella Tabella 3.

Per quanto riguarda l'interpretazione del valore di AUC, si può tenere presente la classificazione della capacità discriminante di un test proposta da Swets (1998). Essa è basata su criteri largamente soggettivi ed avviene secondo lo schema seguente.

- $AUC=0.5$ test non informativo
- $0.5 < AUC \leq 0.7$ test poco accurato
- $0.7 < AUC \leq 0.9$ test moderatamente accurato
- $0.9 < AUC < 1.0$ test altamente accurato
- $AUC=1.0$ test perfetto

Tabella 3. Selezione di software per Windows® utilizzabile per l'analisi delle curve ROC.

Denominazione	Descrizione	Sito WEB
MedCalc	Programma statistico completo indirizzato ai ricercatori nel campo bio-medico	www.medcalc.be
AccuROC	Analisi delle curve ROC e calcolo di altre misure di <i>performance</i> dei test	www.accumetric.com
TG-ROC	<i>Template</i> per Microsoft Excel® per la scelta dei valori di <i>cut-off</i> e la valutazione di test quantitativi	http://city.vetmed.fu-berlin.de/~mgreiner/TG-ROC/tgroc.htm
ROCKIT, LABMRMC, LABROC4, PLOTROC, ROCPWR	Analisi delle curve ROC, con test di significatività statistica	http://www-radiology.uchicago.edu/cgi-bin/roc_software.cgi
JROCFIT	Programma Java (utilizzabile on-line) per il calcolo delle curve ROC	http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html

CMDT

Procedure di ottimizzazione per valori di *cut off* basati su studi di validazione<http://city.vetmed.fu-berlin.de/~mgreiner/CMDT/cmdt.htm>

PEPI

Pacchetto di 43 programmi utili per indagini epidemiologiche

<http://www.sagebrushpress.com/pepibook.html>

La comparazione di due test mediante analisi ROC

Sotto l'ipotesi bi-normale sopra descritta, due test possono essere quindi confrontati tra di loro comparando le *accuracy* stimate mediante l'area sottesa alle corrispondenti curve ROC (Figura 4). Un test *z* (cioè basato sulla distribuzione normale standardizzata) può essere eseguito rapportando la differenza delle due aree all'errore standard di tale differenza. Nel caso di indipendenza dei due test, tale parametro viene facilmente stimato dalla radice quadrata della somma della varianza di ogni area.

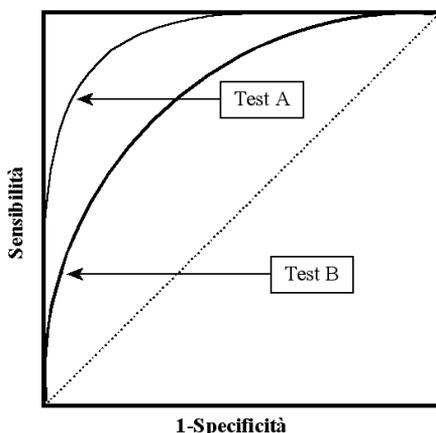


Figura 4. Confronto tra due test diagnostici mediante analisi ROC. Sotto l'ipotesi bi-normale (curve ROC proprie), tale confronto corrisponde a testare la differenza tra le rispettive aree. Risulta evidente la superiorità del test A la cui curva ROC teorica si trova interamente al di sopra di quella corrispondente al test B.

Test *z* per il confronto tra due curve ROC indipendenti:

$$z = \frac{AUC_1 - AUC_2}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}$$

Nel caso i due test non siano indipendenti (situazione che può verificarsi quando essi vengono applicati agli stessi soggetti), l'errore standard della differenza delle due aree viene a dipendere dalla correlazione *r* esistente tra esse:

$$z = \frac{AUC_1 - AUC_2}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 - 2r\sigma_1\sigma_2}}$$

La stima di r , sia nel caso di variabili continue che categoriche ordinali, è stata illustrata in dettaglio da Hanley e McNeil (1982). In pratica, il primo passaggio consiste nel calcolare il coefficiente di correlazione dei valori dei due test separatamente nel gruppo dei malati e in quello dei non-malati; nel caso di dati ordinali occorre utilizzare il coefficiente tau di Kendall. La correlazione media tra i due test può essere quindi stimata dalla media dei due coefficienti così ottenuti. Infine, da questo valore si può ricavare la correlazione tra le due AUC (che è anche funzione della media delle due aree), utilizzando la tavola di Hanley e McNeil, riportata in Appendice 4.

Violazioni dell'ipotesi bi-normale: curve ROC non proprie

Lo scostamento dall'ipotesi bi-normale produce curve ROC non proprie, ovvero si assiste ad una perdita della concavità oppure della simmetria rispetto alla diagonale discendente. Un caso piuttosto frequente consiste nell'incrocio della curva con la *chance line*; ciò può indicare l'esistenza di una distribuzione bimodale all'interno di uno dei due gruppi a confronto, come illustrato nella Figura 5.

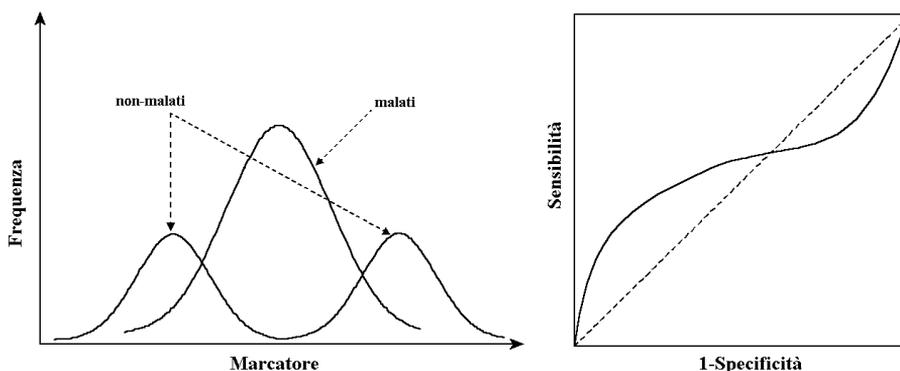


Figura 5. Distribuzione bimodale di uno dei gruppi a confronto e corrispondente Curva ROC non propria.

In tal caso risulta che la popolazione dei non malati è costituita da (almeno) due diverse sottopopolazioni di cui una presenta un valore di marcatore mediamente più elevato rispetto al gruppo dei malati, e l'altra mediamente più basso. In linea teorica si potrebbe quindi generare una regola di classificazione basata su due valori diversi di *cut off*. Tuttavia, visto che la prevalenza delle diverse sottopopolazioni nel gruppo dei non-malati non è nota, in genere un simile risultato induce al rigetto del test.

Un esempio applicativo su dati simulati

Si supponga che un nuovo marcatore tumorale A sia stato scoperto in uno studio *in vitro* e si voglia valutare la sua efficacia nel separare individui ammalati (ad

esempio di uno specifico tumore) da soggetti sani. Viene reclutata una coorte consecutiva di 58 pazienti afferenti ad un centro, di cui 30 sono risultati affetti da tale patologia e 28 no.

I valori di tale marcatore, misurati nel plasma dei soggetti appartenenti ai due gruppi, sono riportati nella tabella in Appendice V, insieme ai valori di un secondo marcatore B, che verranno utilizzati nella prosecuzione di questo esempio.

Per valutare la *performance* del nuovo marcatore viene costruita una curva ROC (Figura 6).

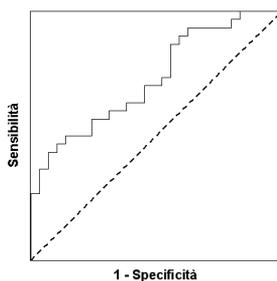


Figura 6. Curva ROC corrispondente al marcatore A.

L'area sotto la curva risulta pari a 0.720, per cui il marcatore risulterebbe moderatamente accurato, secondo la classificazione sopra riportata. Per valutare se tale valore è significativamente superiore a quello atteso sotto l'ipotesi di classificazione casuale ($AUC=0.5$), occorre quindi calcolare il suo errore standard (radice quadrata della varianza). Applicando il metodo di Hanley e McNeil (Appendice 3):

$$Q_1(A) = \frac{0.720}{2 - 0.720} = 0.563 \qquad Q_2(A) = \frac{2 \cdot 0.720^2}{1 + 0.720} = 0.603$$

$$ES(AUC_A) = \sqrt{\frac{0.720 \cdot (1 - 0.720) + (30 - 1) \cdot (0.563 - 0.720)^2 + (28 - 1) \cdot (0.603 - 0.720)^2}{30 \cdot 28}} = 0.067$$

Si può quindi procedere alla costruzione di un test z:

$$z = \frac{AUC - 0.5}{ES(AUC)} = \frac{0.720 - 0.5}{0.067} = 3.284$$

Il valore ottenuto eccede il valore soglia convenzionale di 1.96, per cui si può affermare che i valori del marcatore differiscono significativamente nei due gruppi (con $p < 0.05$).

Si supponga ora di voler valutare la possibilità di utilizzare il nuovo marcatore A in sostituzione di un secondo marcatore B, ben validato, ma molto più costoso. Si applica quindi un confronto tra le due curve ROC, utilizzando ancora i valori riportati nella tabella in Appendice V.

Nella Figura 7 sono riportate le due curve corrispondenti.

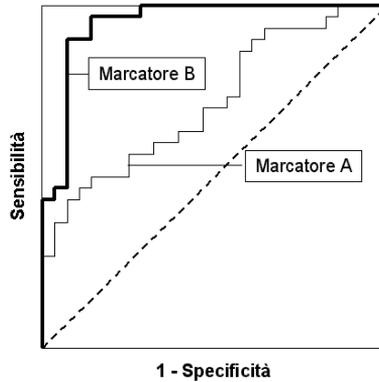


Figura 7. Confronto tra le curve ROC corrispondenti ai due marcatori.

Il marcatore B presenta quindi una migliore capacità discriminante, poiché la curva ROC corrispondente si trova interamente al di sopra di quella generata dal marcatore A; di conseguenza, l'area sottesa risulta superiore ($AUC=0.949$). Comunque un confronto formale tra le due AUC può essere effettuato mediante il metodo di Hanley e McNeil.

Si procede al calcolo dell'errore standard dell'AUC del marcatore B, in modo analogo a quanto effettuato per il marcatore A,

$$Q_1(B) = \frac{0.949}{2 - 0.949} = 0.903 \quad Q_2(B) = \frac{2 \cdot 0.949^2}{1 + 0.949} = 0.924$$

$$ES(AUC_B) = \sqrt{\frac{0.949 \cdot (1 - 0.949) + (30 - 1) \cdot (0.903 - 0.949)^2 + (28 - 1) \cdot (0.924 - 0.949)^2}{30 \cdot 28}} = 0.030$$

Il secondo parametro necessario per il confronto tra le due AUC è la correlazione tra le due aree. Il coefficiente di correlazione di Pearson tra i valori dei due marcatori nella popolazione dei non malati è pari a 0.578, mentre nella popolazione dei malati risulta pari a 0.595, da cui il coefficiente di correlazione medio risulta pari a 0.587. La media delle due AUC è 0.835, per cui, dalla tabella di Hanley e McNeil (Appendice 4) si ricava (approssimativamente) il valore di correlazione r tra le due aree: $r = 0.52$.

A questo punto è possibile eseguire un test z per il confronto delle due aree:

$$z = \frac{AUC_B - AUC_A}{\sqrt{\sigma_B^2 + \sigma_A^2 - 2r\sigma_B\sigma_A}} = \frac{0.949 - 0.720}{\sqrt{0.030^2 + 0.067^2 - 2 \cdot 0.52 \cdot 0.030 \cdot 0.067}} = 3.987$$

Il valore di z eccede ampiamente il valore critico di 1.96, per cui si può affermare che la *performance* del marcatore B rimane comunque superiore a quella del nuovo marcatore A (con $p < 0.05$).

Conclusioni

Le proprietà delle curve ROC consentono di valutare la *performance* di un test diagnostico basato su valori soglia in modo semplice, efficace e costruito su una ormai consolidata teoria statistica e di eseguire di conseguenza confronti tra test diversi. L'analisi ROC rappresenta una famiglia di metodologie statistiche estremamente versatili, cui si è potuto solo brevemente accennare nella presente trattazione, e che ha dimostrato la sua utilità in diversi campi della scienza, compresa la medicina. Tuttavia la sua applicazione in Epidemiologia e in particolare nella pratica veterinaria risulta ancora piuttosto sporadica. Si auspica che nei prossimi anni, grazie alla sempre più ampia disponibilità di programmi statistici e di *routine* dedicate, ed alla maggiore diffusione di una cultura statistica negli operatori del settore, l'analisi ROC diventi pratica corrente nella valutazione dei test in Medicina veterinaria.

APPENDICE I

Valori predittivi di un test e prevalenza della malattia

La relazione tra valori predittivi di un test, sensibilità, specificità e prevalenza della malattia può essere ricavata analiticamente mediante il teorema di Bayes.

Dati due eventi A e B, definendo con $P(A|B)$ e $P(B|A)$ rispettivamente, la probabilità che si verifichi l'evento A dato che si è verificato l'evento B e viceversa, la formula o teorema di Bayes pone in relazione le due probabilità nel seguente modo:

$$P(A|B) = \frac{P(B|A)P(A)}{P(B)}$$

Ricordando la definizione di valore predittivo (VP), di sensibilità (Se) e di specificità (Sp), si può scrivere, formalmente:

$$VP^+ \equiv P(M^+|T^+), \quad VP^- \equiv P(M^-|T^-), \quad Se \equiv P(T^+|M^+), \quad Sp \equiv P(T^-|M^-)$$

dove il simbolo \equiv significa "uguale per definizione".

Si indichi inoltre con OP l'Odd di Prevalenza, definito formalmente come rapporto tra la probabilità di osservare un soggetto malato rispetto a quella di osservare un soggetto non malato:

$$OP \equiv \frac{P(M^+)}{P(M^-)}$$

Tale indice viene spesso impiegato per comodità, in quanto aumenta con la prevalenza e può essere stimato molto semplicemente come rapporto tra il numero dei malati e quello dei non malati nel campione.

Applicando la formula di Bayes alle definizioni sopra riportate si ricava immediatamente la relazione tra VP^+ , prevalenza, sensibilità e specificità:

$$VP^+ \equiv P(M^+|T^+) = \frac{P(T^+|M^+)P(M^+)}{P(T^+)}$$

Si consideri inoltre che la probabilità di un test positivo $P(T^+)$ è uguale alla somma delle probabilità di un test positivo nei malati e della probabilità di un test positivo nei non malati:

$$P(M^+|T^+) = \frac{P(T^+|M^+)P(M^+)}{P(T^+|M^+)P(M^+) + P(T^+|M^-)P(M^-)}$$

da cui si ottiene la seguente relazione:

$$VP^+ \equiv P(M^+|T^+) = \frac{Se}{Se + \frac{(1 - Sp)}{OP}}$$

Analogamente si dimostra che:

$$VP^- \equiv P(M^-|T^-) = \frac{Sp}{Sp + (1 - Se) \cdot OP}$$

Altri parametri spesso impiegati per valutare la performance di un test diagnostico sono i rapporti di verosimiglianza (LR, dall'inglese "likelihood ratio"), così definiti:

$$LR^+ \equiv \frac{P(T^+|M^+)}{P(T^+|M^-)} = \frac{Se}{1 - Sp} \qquad LR^- \equiv \frac{P(T^-|M^+)}{P(T^-|M^-)} = \frac{1 - Se}{Sp}$$

Il rapporto di verosimiglianza di un risultato positivo (LR^+) esprime la probabilità di un risultato positivo in un soggetto malato rispetto alla medesima probabilità in un soggetto sano. Analogamente, il rapporto di verosimiglianza di un risultato negativo (LR^-) esprime la probabilità di un risultato negativo in un soggetto malato rispetto alla medesima probabilità in un soggetto sano.

In termini di rapporti di verosimiglianza, le relazioni sopra illustrate diventano:

$$VP^+ = \frac{LR^+ \cdot OP}{LR^+ \cdot OP + 1} \qquad VP^- = \frac{1}{1 + OP \cdot LR^-}$$

Illustrando tali relazioni in modo grafico (Figura A1) si può notare che il VP^+ tende ad aumentare in modo non lineare con la prevalenza e con maggiore rapidità per valori elevati di LR^+ , mentre il VP^- tende a diminuire con la prevalenza, tanto più rapidamente quanto più elevato è LR^- .

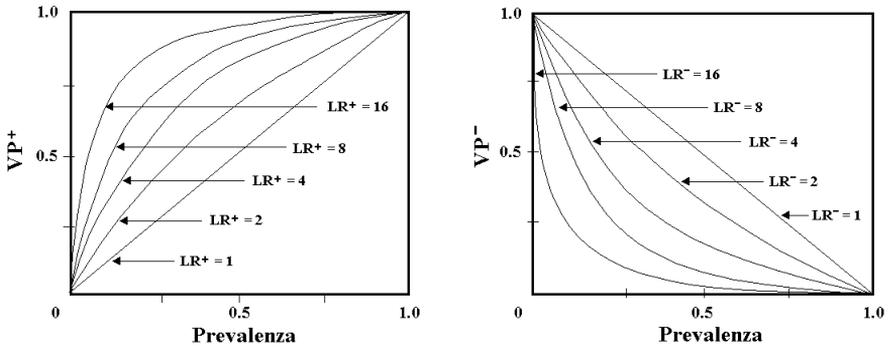


Figura A1. Relazione tra Valori Predittivi e Prevalenza

APPENDICE 2

Statistica U e Area Sottesa ad una curva ROC

La statistica U, ideata dal chimico Wilcoxon e perfezionata dal matematico Mann-Whitney, rappresenta una delle più note tecniche di statistica non parametrica. Viene utilizzata per il confronto della distribuzione di una variabile continua tra due gruppi e per testare l'ipotesi nulla che i due gruppi presentino la stessa mediana. Tale ipotesi è del tutto equivalente a testare che un soggetto estratto a caso da un gruppo X abbia la stessa probabilità di presentare un valore della variabile superiore ad un valore predefinito di quello di un soggetto estratto a caso dall'altro gruppo Y. Nella sua formulazione originaria, il test si basa sul numero U delle coppie di valori (X,Y), tali che $X > Y$.

La stima campionaria di U è:

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

dove n_1 e n_2 sono le numerosità campionarie dei due gruppi, mentre R_1 è la somma dei ranghi nel gruppo a numerosità n_1 . Il valore atteso di U è:

$$\mu_U = \frac{n_1 n_2}{2}$$

Bamber (1975) ha dimostrato l'equivalenza tra l'area AUC sottesa ad una curva ROC, costruita per dati su scala continua, e la statistica U. La relazione che lega i due parametri è la seguente:

$$AUC = \frac{U}{n_1 n_2}$$

da cui:

$$\mu_{AUC} = \frac{1}{2}$$

APPENDICE 3

Parametri di una curva ROC costruita su dati ordinali

L'area sottesa ad una curva ROC (AUC) costruita su dati ordinali (ad esempio, derivati da aggregazioni in classi di una variabile continua) costituisce una sottostima sistematica dell'area sottesa alla curva ROC teorica (ottenibile per popolazione campionaria infinita). Tale asserzione è illustrata nella Figura A2.

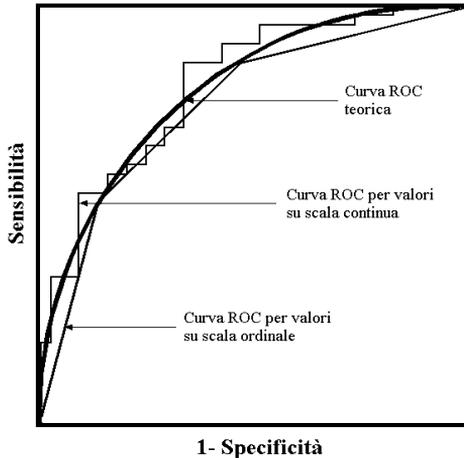


Figura A2. Area sottesa ad una curva ROC teorica, empirica per dati continui e empirica per dati ordinali.

Secondo Hanley e McNeil (1983), la varianza di una curva ROC può essere stimata dalla seguente formula, spesso applicata sia a dati ordinali che su scala continua:

$$\sigma_{AUC}^2 = \frac{AUC \cdot (1 - AUC) + (n_1 - 1) \cdot (Q_1 - AUC^2) + (n_2 - 1) \cdot (Q_2 - AUC^2)}{n_1 \cdot n_2}$$

ove n_1 e n_2 rappresentano la numerosità dei due gruppi a confronto, e Q_1 e Q_2 :

$$Q_1 = \frac{AUC}{2 - AUC}$$

$$Q_2 = \frac{2AUC^2}{1 + AUC}$$

che rappresentano, rispettivamente, una stima della probabilità che due campioni estratti a caso dal gruppo dei malati presentino entrambi i valori superiori ad un campione estratto a caso dal gruppo dei non-malati e viceversa.

APPENDICE 4

Tabella per il calcolo della correlazione tra due AUC
(da Hanley & McNeil, 1982).

Correlazione media tra i due gruppi	Media delle 2 AUC											
	0.700	0.725	0.750	0.775	0.800	0.825	0.850	0.875	0.900	0.925	0.950	0.975
0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02
0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.03	0.02
0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.04	0.03
0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.04
0.12	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	0.05
0.14	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.11	0.10	0.09	0.08	0.06
0.16	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.12	0.11	0.11	0.09	0.07
0.18	0.16	0.16	0.16	0.16	0.15	0.15	0.14	0.14	0.13	0.12	0.11	0.09
0.20	0.18	0.18	0.18	0.17	0.17	0.17	0.16	0.15	0.15	0.14	0.12	0.10
0.22	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.18	0.18	0.17	0.16	0.15	0.14	0.11
0.24	0.22	0.22	0.21	0.21	0.21	0.20	0.19	0.19	0.18	0.17	0.15	0.12
0.26	0.24	0.23	0.23	0.23	0.22	0.22	0.21	0.20	0.19	0.18	0.16	0.13
0.28	0.26	0.25	0.25	0.25	0.24	0.24	0.23	0.22	0.21	0.20	0.18	0.15
0.30	0.27	0.27	0.27	0.26	0.26	0.25	0.25	0.24	0.23	0.21	0.19	0.16
0.32	0.29	0.29	0.29	0.28	0.28	0.27	0.26	0.26	0.24	0.23	0.21	0.18
0.34	0.31	0.31	0.31	0.30	0.30	0.29	0.28	0.27	0.26	0.25	0.23	0.19
0.36	0.33	0.33	0.32	0.32	0.31	0.31	0.30	0.29	0.28	0.26	0.24	0.21
0.38	0.35	0.35	0.34	0.34	0.33	0.33	0.32	0.31	0.30	0.28	0.26	0.22
0.40	0.37	0.37	0.36	0.36	0.35	0.35	0.34	0.33	0.32	0.30	0.28	0.24
0.42	0.39	0.39	0.38	0.38	0.37	0.36	0.36	0.35	0.33	0.32	0.29	0.25
0.44	0.41	0.40	0.40	0.40	0.39	0.38	0.38	0.37	0.35	0.34	0.31	0.27
0.46	0.43	0.42	0.42	0.42	0.41	0.40	0.39	0.38	0.37	0.35	0.33	0.29
0.48	0.45	0.44	0.44	0.43	0.43	0.42	0.41	0.40	0.39	0.37	0.35	0.30
0.50	0.47	0.46	0.46	0.45	0.45	0.44	0.43	0.42	0.41	0.39	0.37	0.32
0.52	0.49	0.48	0.48	0.47	0.47	0.46	0.45	0.44	0.43	0.41	0.39	0.34
0.54	0.51	0.50	0.50	0.49	0.49	0.48	0.47	0.46	0.45	0.43	0.41	0.36
0.56	0.53	0.52	0.52	0.51	0.51	0.50	0.49	0.48	0.47	0.45	0.43	0.38
0.58	0.55	0.54	0.54	0.53	0.53	0.52	0.51	0.50	0.49	0.47	0.45	0.40
0.60	0.57	0.56	0.56	0.55	0.55	0.54	0.53	0.52	0.51	0.49	0.47	0.42
0.62	0.59	0.58	0.58	0.57	0.56	0.56	0.55	0.54	0.53	0.51	0.49	0.45
0.64	0.61	0.60	0.60	0.59	0.59	0.58	0.58	0.57	0.55	0.54	0.51	0.47
0.66	0.63	0.62	0.62	0.62	0.61	0.60	0.60	0.59	0.57	0.56	0.53	0.49
0.68	0.65	0.64	0.64	0.64	0.63	0.62	0.62	0.61	0.60	0.58	0.56	0.51
0.70	0.67	0.66	0.66	0.66	0.65	0.65	0.64	0.63	0.62	0.60	0.58	0.54
0.72	0.69	0.69	0.68	0.68	0.67	0.67	0.66	0.65	0.64	0.63	0.60	0.56
0.74	0.71	0.71	0.70	0.70	0.69	0.69	0.68	0.67	0.66	0.65	0.63	0.59
0.76	0.73	0.73	0.72	0.72	0.72	0.71	0.71	0.70	0.69	0.67	0.65	0.61
0.78	0.75	0.75	0.75	0.74	0.74	0.73	0.73	0.72	0.71	0.70	0.68	0.64
0.80	0.77	0.77	0.77	0.76	0.76	0.76	0.75	0.74	0.73	0.72	0.70	0.67
0.82	0.79	0.79	0.79	0.79	0.78	0.78	0.77	0.77	0.76	0.75	0.73	0.70
0.84	0.82	0.81	0.81	0.81	0.81	0.80	0.80	0.79	0.78	0.77	0.76	0.73
0.86	0.84	0.84	0.83	0.83	0.83	0.82	0.82	0.81	0.81	0.80	0.78	0.75
0.88	0.86	0.86	0.85	0.85	0.85	0.85	0.84	0.84	0.83	0.82	0.81	0.79
0.90	0.88	0.88	0.88	0.88	0.87	0.87	0.87	0.86	0.86	0.85	0.84	0.82

* Si ottiene come media dei coefficienti di correlazione tra i due marcatori calcolati separatamente nei malati e nei non malati.

APPENDICE 5

Valori simulati dei due marcatori tumorali A e B utilizzati nell'esempio (vedi testo).

Malati			Non-Malati		
ID soggetto	Marcatore A	Marcatore B	ID soggetto	Marcatore A	Marcatore B
1	23.7	63.0	31	23.8	48.2
2	25.4	63.1	32	35.9	38.5
3	23.2	59.2	33	30.2	22.5
4	32.4	71.4	34	20.6	22.2
5	24.4	68.5	35	13.7	33.1
6	48.8	69.9	36	19.5	24.3
7	42.1	59.7	37	36.3	39.0
8	31.5	67.1	38	20.3	18.1
9	54.2	74.5	39	20.7	32.4
10	53.7	93.3	40	22.4	31.3
11	40.1	58.5	41	22.9	36.3
12	23.3	40.8	42	15.7	18.4
13	27.6	60.0	43	33.6	53.7
14	39.9	82.6	44	27.3	22.1
15	52.2	88.2	45	34.8	42.4
16	26.0	75.7	46	30.0	43.3
17	16.3	53.6	47	25.0	28.6
18	23.5	80.8	48	41.3	71.0
19	22.6	60.1	49	26.9	45.5
20	42.9	95.3	50	21.3	57.2
21	22.3	74.0	51	11.6	28.0
22	36.5	63.4	52	39.2	69.2
23	29.0	61.5	53	18.3	17.9
24	50.8	80.6	54	28.7	23.5
25	42.6	80.8	55	10.8	16.0
26	36.0	73.8	56	28.5	33.7
27	36.8	68.2	57	33.2	15.1
28	35.0	89.7	58	25.3	31.0
29	19.2	53.2			
30	40.6	67.6			

Bibliografia

- 1) Bamber D. (1975) The Area above the Ordinal Dominance Graph and the Area below the Receiver Operating Characteristic Graph. *J. Math. Psychol.*, **12**, 387-415.
- 2) Barajas-Rojas J. A., Riemann H. P., Franti C. E. (1993) Notes about determining the cut-off value in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Prev. Vet. Med.*, **15**, 231-3.
- 3) Erdreich L.S. (1981) Use of Relative Operating Characteristic analysis in Epidemiology. *Am. J. Epidemiol.*, **114**, 649-62.
- 4) Goodenough D.J., Rossmann K., Lusted L.B. (1974) Radiographic applications of receiver operating characteristic (ROC) analysis. *Radiology*, **110**, 89-95.
- 5) Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. (2000) Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet.*

- Med., **45** (1-2), 23-41.
- 6) Hanley J., McNeil B.J. (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, **143**, 29-36.
 - 7) Hanley J.A., McNeil B. J. (1983) A method of comparing the areas under Receiver Operating Characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*, **148**, 839-43.
 - 8) Henderson A.R. (1993) Assessing test accuracy and its clinical consequences: a primer for receiver operating characteristic curve analysis. *Ann. Clin. Biochem.*, **30**, 521-39.
 - 9) Lusted L.B. (1971) Signal detectability and medical decision-making. *Science*, **171**, 1217-19.
 - 10) Schäfer H. (1989). Constructing a cut-off point for a quantitative diagnostic test. *Statistics in Medicine*, **8**, 1381-91.
 - 11) Swets J.A. (1998) Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, **240**, 1285-93.
 - 12) Zweig H.H., Campbell G. (1993) Receiver Operating Characteristic (ROC) plots: a fundamental evolution tool in medicine. *Clin. Chem.*, **39**, 561-77.

RIASSUNTO

In epidemiologia e in medicina clinica vengono spesso utilizzati test che forniscono risultati sotto forma di variabili continue. In questi casi è necessario individuare un valore-soglia (*cut off*) allo scopo di decidere se, a fronte di un determinato valore, l'individuo deve essere classificato come malato o non-malato. Pur essendo il valore di *cut off* critico ai fini decisionali, non esiste un *cut off* ottimale. Infatti, ogni variazione del valore adottato coincide con una variazione della sensibilità e della specificità del test. Purtroppo le suddette variazioni si verificano contemporaneamente in direzioni opposte, nel senso che ad un incremento della sensibilità corrisponde un decremento della specificità e viceversa.

Le curve ROC (*Receiver Operating Characteristic*) permettono di analizzare la correlazione tra sensibilità e specificità di un test per una gamma di differenti valori di *cut off* e vengono generate graficamente riportando in ordinata la proporzione di veri-positivi (sensibilità) ed in ascissa la proporzione di falsi-positivi (1-specificità). Attraverso l'esame della curva ed il calcolo dell'area ad essa sottesa (AUC, *Area Under Curve*), si può misurare in modo semplice ed efficace la capacità discriminante del test ed individuare il miglior *cut off*. Inoltre, l'analisi ROC è di grande utilità quando sia necessario mettere a raffronto la validità di due o più test.

Al momento attuale l'applicazione dell'analisi ROC in Epidemiologia, e in particolare nel settore veterinario, risulta ancora piuttosto limitata. Si auspica che nei prossimi anni, con la sempre più ampia disponibilità di programmi statistici e di *routine* dedicate e la maggiore diffusione di una cultura statistica negli operatori del settore, l'analisi ROC diventi pratica corrente nella valutazione dei test in Medicina veterinaria.

SUMMARY

In epidemiology and clinical medicine we often have to carry out tests in order to determine the presence/absence of a specific disease. Many tests provide

results on a continuous scale, and a cut-off point should be selected to decide whether the disease is present or not. Although the cut-off value is critical for diagnosis, the determination of an optimal threshold is a complex process, as test sensitivity and specificity are function of the threshold value. Therefore, changing the cut-off point will always result in an increase in one of the two validity indices (e.g., sensitivity) and a decrease in the other one (e.g., specificity). Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis is a useful technique to estimate test sensitivity and specificity based on a wide range of cut-off points. ROC curves are displayed by plotting the false-positive rate (1-specificity) against the true positive rate (sensitivity). Optimal cut-off point and test performance can be reliably estimated by observing the form of the curve and calculating the area under the curve (AUC). Moreover, ROC analysis can be used in comparing two or more tests. Unfortunately, nowadays the use of ROC analysis in Epidemiology and veterinary laboratory practice is quite neglected. In the future, the wide availability of specific software and the increasing statistical knowledge of health workers will definitely make ROC analysis a basic tool to evaluate diagnostic testing.

PAROLE CHIAVE

Test diagnostici, screening, curve ROC, receiver operating characteristics.

KEY WORDS

Diagnostic tests, screening, ROC curve, receiver operating characteristics.

Cervello e Mente ovvero Casualità e Determinismo

*Enrico Bignetti

Introduzione

a) Il caso e le leggi della probabilità

Per prima cosa, vorrei mostrare l'immagine del Marchese di Laplace (Fig. 1A) perché, inconsapevolmente, sarà lui questa volta ad ispirare e dirigere questa chiacchierata. In particolare, avremo l'occasione di valutare quanto le sue affermazioni fatte a cavallo tra il '700 e l'800 siano fondamentali per la scienza moderna e in particolare di grande attualità per lo studio della difficile relazione tra il cervello e la mente. Fuor di dubbio è stato un grande scienziato (fisico, astronomo, matematico e filosofo), uno di quegli scienziati che solo nel passato potevano mostrare l'assoluta poliedricità, una qualità questa che, in un mondo selettivo e competitivo come quello di oggi, difficilmente si concilia con la richiesta di assoluta specializzazione.



Fig. 1.a. Il Marchese deLaplace

Il suo valore sta soprattutto nel fatto che, da un lato, era sì un fermo sostenitore della legge del determinismo in natura, ovvero della stretta relazione causa-effetto che

*Dipartimento di Fisica, Viale delle Scienze 7A, Università degli studi di Parma, 43100 Parma, eMail: bignetti@fis.unipr.it

sottende ai processi naturali, al punto che la riteneva una legge esistenziale, ma era anche consapevole, d'altro canto, che alcuni eventi apparentemente sfuggivano al controllo di queste legge ferrea; perciò era stimolato all'analisi scientifica proprio da questi scenari imprevedibili (stocastici o aleatori). Non era disposto a fare sconti al determinismo ammettendo la presenza del "caso", cosicché si mise proprio a verificare di persona quei fenomeni dove sembrava allignare l'aleatorietà, sperando di ribaltare alcune evidenze contrarie, a favore ancora una volta del determinismo.

Il suo lavoro fu grandioso; suo malgrado, egli scoprì l'esistenza di eventi legati al "caso" puro, ma scoprì anche che una ripetizione di questi eventi su grandi numeri dava origine a comportamenti mediati prevedibili, non più sotto il profilo del determinismo duro ma sotto una nuova veste morbida di "determinismo probabilistico". Le leggi della probabilità come compromesso storico-scientifico da allora videro così la luce.

Per capire meglio le affermazioni precedenti, in relazione al titolo del nostro argomentare, potremmo partire facendo alcuni esempi. Per esempio potremmo partire con il determinismo dicendo che persino un cane sa che siamo in un campo gravitazionale e che tutta la nostra vita ne è condizionata. Se chiedete, infatti, ad un cane da caccia perché un fagiano colpito dal padrone cade a terra vi risponderà per la forza di gravità, se gli chiedete perché capita invece che alcuni fagiani non cadano allo sparo del padrone vi dirà con precisione e con aria di commiserazione che il suo padrone è una schiappa. Eppure ci sono cose come la predizione del sesso nei nascituri o il numero in un lancio di dadi che non sono affatto prevedibili, sono davvero "casuali". Per quanto riguarda il lancio dei dadi, in particolare, tale evento è anche definito Markoviano, intendendo per questo che ogni lancio non sa cosa è successo prima né quello che succederà dopo; ovvero che in ogni lancio non c'è alcun briciolo di memoria storica e, per di più, che non c'è alcuna interferenza tra un lancio e l'altro, almeno di un tipo riconducibile alla relazione causa-effetto.

Un esempio tipico di eventi aleatori è nell'immagine dove le palline che scendono casualmente dall'imbuto si distribuiscono tuttavia secondo una legge statistica matematicamente risolta da Laplace (Fig.1B).



Fig. 1.b. Strumento per la osservazione di eventi stocastici e per la determinazione delle leggi di probabilità.

In conclusione, se abbiamo un dado a sei facce e facciamo pochi lanci può capitare che una faccia non venga mai fuori, ma se il numero dei lanci aumenta, la probabilità che tutte le facce escano lo stesso numero di volte aumenta fino a tendere a $p=1$.

Un ultimo esempio molto pertinente è quello del moto caotico Browniano di un soluto in un solvente oppure di un gas (Fig.2). In questo caso, ogni singola molecola di gas si muove di moto markoviano eppure la distribuzione delle molecole del gas le dispone “mediamente” equidistanti. Questa risultante statistica fa sì che il gas popoli omogeneamente sempre tutto l’ambiente a disposizione e che un agente esterno possa “indirizzare” la diffusione del gas in un ambiente voluto sfruttando le proprietà stocastiche delle singole molecole del gas.

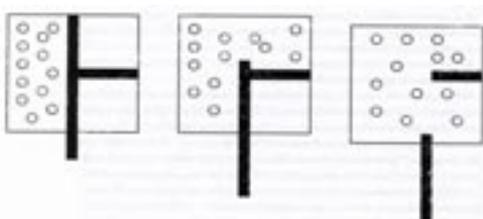


Fig. 2. Moto diffusivo di un gas. Le singole molecole si muovono in modo aleatorio ma il comportamento collettivo è apparentemente deterministico. La distribuzione finale vede una ripartizione media equidistante di tutte le molecole nel volume disponibile. Un agente esterno può dunque aprire nuovi spazi prevedendo in anticipo il loro riempimento omogeneo.

Questi discorsi hanno una stretta attinenza con quello che stiamo per dire adesso. Una prima conclusione al preambolo che ci serve per poter affrontare i discorsi successivi è proprio la scoperta delle regole che sottendono al determinismo di tipo “probabilistico”

- 1) ogni evento preso in sé è stocastico (aleatorio)
- 2) più eventi sommati in serie od in parallelo rappresentano un campione statistico
- 3) molti eventi diventano quasi certezza

Così arriviamo alla 1a vera domanda: “Abituati alle nostre (quasi) certezze ed incertezze, viviamo in una atmosfera comunque di determinismo logico esistenziale; sappiamo che il tempo scorre inesorabile, che dopo la notte ci sarà il giorno e che, se il motore dell’auto è a posto e c’è benzina, la nostra auto andrà sicuramente e tutto ciò ci apparirà seguendo il nostro pensiero razionale e rigoroso. Ma se ad un certo punto qualcuno ci venisse a dire che le singole strutture cerebrali (prese una alla volta) che stanno alla base dei meccanismi della mente sia inconscia che conscia, funzionano in modo aleatorio come ci sentiremmo psicologicamente?”

b) Il cervello ed i suoi elementi fondamentali

Che il cervello sia estremamente intricato e complesso nessuno lo può negare ed è evidente che è così perché è nella stessa natura del sistema nervoso di organizzarsi in modo esteso e complesso. Basta vedere al microscopio qualche neurone in coltura per renderci subito conto del modo intricato con cui una manciata di neuroni sviluppa una fitta rete di interconnessioni per poter comunicare.

Proviamo ad approfondire la nostra indagine sulle modalità di comunicazione e di elaborazione dell'informazione focalizzando la nostra attenzione, come esempio, su una rete minimale costituita da un recettore collegato in serie con un neurone e quest'ultimo poi con un altro effettore, tramite una serie di sinapsi.

Per primo, esaminiamo il meccanismo della comunicazione a distanza dell'informazione in tutte queste cellule eccitabili. Alle aree di proiezione specifica, l'invio dell'informazione, utilizza sempre come denominatore comune un'onda che si autopropaga, il "Potenziale d'azione" (PA). Il PA è stereotipato, ovvero ha velocità costante ed ampiezza costante perciò, per portare lontano un segnale graduato in intensità (+o- caldo; +o- luce ecc.) deve viaggiare in un treno di molti PA con frequenze correlabili all'intensità dello stimolo trasportato.

Per quanto riguarda invece la percezione periferica, ogni recettore è specializzato a recepire e trasdurre il segnale specifico esterno in "Potenziali generatori" (PG) localizzati e modulati in ampiezza. Un PG è, tuttavia, sempre capace di generare la formazione di PA propagati con una relazione del tipo: modulazione d'ampiezza dei PG che si traduce in modulazione di frequenza dei PA.

Nel terzo esempio, infine, analizziamo la giunzione sinaptica che collega un neurone all'altro. Per passare l'informazione all'altro nervo, i PA devono essere tradotti in potenziali sinaptici (PGS). Il sistema sinaptico in altre parole traduce una modulazione di frequenza dei PA in arrivo dal nervo a-monte, in PGS modulati in ampiezza sul nervo a valle; questi sono potenziali locali sì, che non possono propagarsi ma sono però in grado di generare l'uscita di nuovi PA modulati in frequenza. L'informazione, grazie a questi meccanismi non si arresta, dunque, quasi mai.

Cos'è aleatorio e cos'è deterministico nel cervello

Analizziamo i singoli elementi della catena della comunicazione or ora citati per capire se tutte queste componenti si comportano in modo rigidamente deterministico, come uno si aspetterebbe confidando nella capacità raziocinante della sua mente. Cominciando proprio dal PA:

a) Il PA è un'onda (Fig. 3) che si autopropaga lungo la superficie del nervo. In corrispondenza della cresta dell'onda ci sono dei canali al Na⁺ aperti dietro la cresta i canali al sodio (Na⁺) sono già chiusi mentre sono aperti quelli al potassio (K⁺); questa situazione rende la coda dell'onda refrattaria al suo ritorno indietro. Invece, la membrana antistante alla cresta è ancora a riposo, con i cancelli al sodio e al potassio ancora chiusi; quel tratto perciò è sensibile ed eccitabile. Ne consegue che se la cresta dell'onda vuole procedere deve spingere i cancelli al sodio che sono immediatamente davanti. Tuttavia di ogni singolo cancello ci sono 8 possibili forme molecolari, con identica probabilità di esistenza ma con una sola di queste che coincide con la sua reale apertura (Koch 1999) (la figura 4 mostra il modello delle conformazioni assunte da un singolo cancello al sodio con le modalità di apertura). Immaginiamo che ogni cancello sia un dado ad otto facce e che una sola di queste corrisponda al cancello tutto aperto e funzionante; il PA ha dunque solo una probabilità su otto di poter aprire il singolo canale davanti a lui. Il risultato di questa probabilità troppo bassa non garantirebbe il suo moto regolare e veloce. Tuttavia, il PA ha davanti a sé sullo stesso tratto di membrana, molti dadi (cancelli) cosicché, se li lancia tutti contemporaneamente

amente, gli sarà certamente più facile aprirne almeno uno di questi che lo faccia passare.

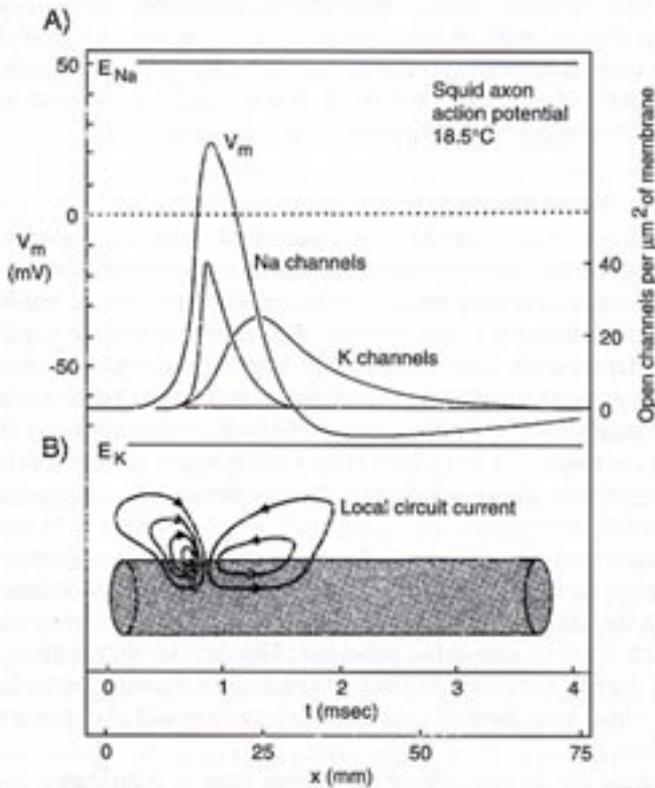


Fig. 3. Il Potenziale d'azione (PA) e i canali al sodio e al potassio coinvolti nella sua genesi e propagazione sulla membrana di un nervo.

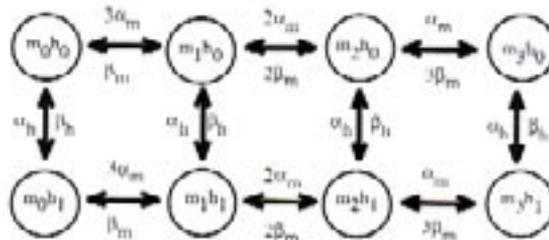


Fig. 4. Le otto conformazioni possibili del cancello al Sodio sensibili alla depolarizzazione di membrana indotta dal PA. Solo la forma "bianca" corrisponde alla conformazione aperta.

In conclusione, la sommazione spaziale e temporale della stimolazione di più canali al sodio sulla membrana del nervo al passaggio di un PA, è essenziale per avere un comportamento probabilistico-deterministico della comunicazione nervosa. Ciò ac-

cade nonostante il panorama che si presenta alla vista del PA sia costellato di molti canali che vivono di natura stocastica.

b) Analogo discorso vale per un qualunque recettore di senso. Ad esempio, osserviamo quello che accade nella retina di un macaco sveglio, dove ci sono milioni di recettori della vista del tutto simili a quelli dell'uomo. Al passaggio ripetuto più volte di uno stimolo visivo noto, la risposta del recettore è ogni volta diversa; cioè, il codice che viene generato in risposta al suo PG potrebbe essere paragonato ad un vero codice a barre che tuttavia risulta diverso da volta a volta, in modo del tutto aleatorio (Fig. 5).

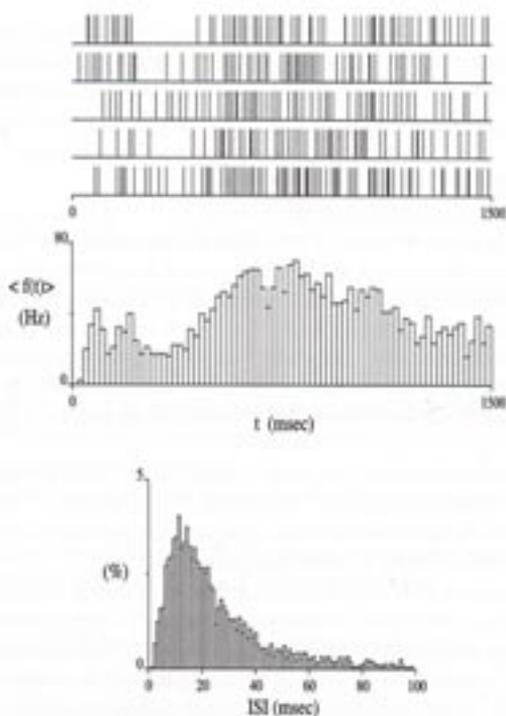


Fig. 5. Un recettore della retina di macaco sveglio, viene sottoposto a ripetute stimolazioni con il passaggio di una barra verticale nel suo campo visivo. Ogni volta il recettore “spara” potenziali con ordine sparso cioè con risultati ogni volta diversi (i potenziali sono compressi e appaiono come tante barrette verticali, come la visualizzazione di un codice a barre). Se tuttavia si va a vedere su molti esperimenti la distribuzione del parametro ISI (Inter-spike intervall) calcolato sulla media di tutte le risposte, si nota che un certo “codice a barre” medio è più probabile tra tanti altri. Il nervo ottico invia questa informazione ai centri corticali.

Tuttavia se analizziamo questo codice evocato in un numero elevato di stimolazioni, possiamo evidenziarne un comportamento medio conforme ad una regola matematica di tipo probabilistico (Koch 1999), proprio come aveva visto Laplace con tutte le palline in quella specie di flipper. Dunque, se la percezione di uno stimolo visivo arrivasse da un singolo recettore, il nostro cervello non saprebbe come interpretarla; invece, per nostra fortuna, la risposta viene mediata per sommazione spaziale e temporale su un numero elevato di recettori in parallelo, assumendo nella retina una sorta di codice a barre medio dal significato probabilistico-deterministico.

c) Infine, l'ultimo esempio ci viene dato dal comportamento della sinapsi. Anche in questo caso il PGS (inibitorio od eccitatorio) che si genera nel neurone a valle dovrebbe avere ampiezze rigorosamente proporzionali allo stimolo a monte; invece, se analizziamo il singolo bottone sinaptico ne scopriamo un comportamento assolutamente stocastico (con probabilità p vicino a 0.1-0.2) (Fig. 6). Per nostra fortuna, su ogni nostro neurone arrivano centinaia di bottoni sinaptici cosicché esso può sempre mediare con un'informazione di tipo probabilistico (Koch 1999). Ancora una volta l'intervento di grandi numeri tramuta una legge naturale stocastica del singolo elemento sub-cellulare in un'informazione di rete globale, di natura probabilistico-deterministica.

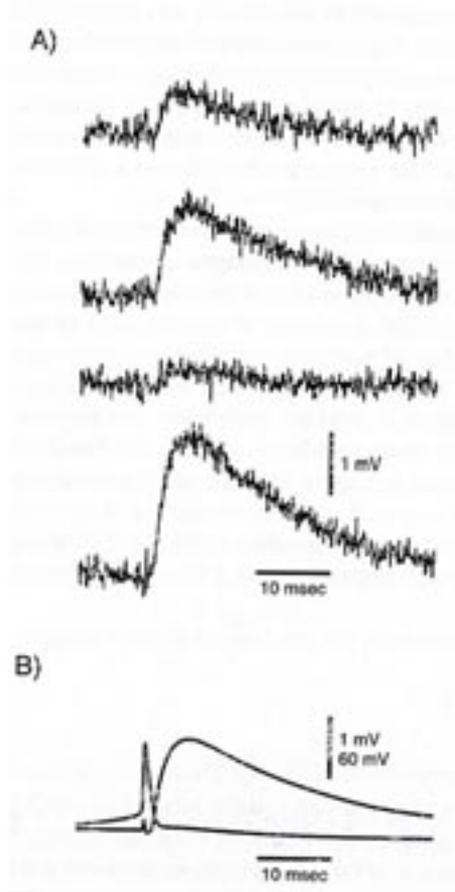


Fig. 6. Una giunzione sinaptica tra due neuroni è costituita da molte strutture sub-cellulari interagenti, denominate bottoni sinaptici. Se la sinapsi è "eccitatoria", è deputata a produrre un potenziale EPSP (potenziale eccitatorio post-sinaptico) sul neurone a valle allorquando viene stimolata a-monte, affinché il segnale possa condursi. Tuttavia la probabilità con cui questo avviene in ogni singolo bottone di una giunzione sinaptica è molto bassa (A). Se però assumiamo che i bottoni di una giunzione sono decine e decine e sono molti i neuroni che di solito convergono su un unico neurone post-sinaptico (anche inibitori), allora si può con una certa tranquillità affermare che ci sarà sempre un segnale post-sinaptico anche se elaborato in maniera statistica (B).

Conclusioni

In sostanza la mente può emergere dall'insieme di inferenze e di meccanismi convergenti del tutto casuali, utilizzando lo strumento del calcolo statistico, altrimenti sarebbe perennemente un guazzabuglio di informazioni contraddittorie ed inaffidabili.

Da questa prima conclusione ne deriva immediatamente la seguente affermazione: alla nostra mente deve sottendere un cervello estremamente complesso, nel quale differenze di struttura sub-microscopica nelle reti neuronali tra due individui possono coincidere con le differenze comportamentali visibili (ad es. una connessione nervosa diversa immediatamente si riflette su una popolazione numerosa diversa di bottoni sinaptici e quindi un "modo di pensare" diverso).

Un'ulteriore affermazione che possiamo fare riguarda i meccanismi dell'evoluzione che ha segnato lo sviluppo del nostro cervello; è evidente, infatti come la selezione naturale abbia favorito il successo della complessità proprio con l'ottenimento di un sistema probabilistico-deterministico più efficiente. La spinta all'evoluzione deve provenire come sempre dal premio di una lunga sopravvivenza e di un perfetto adattamento all'ambiente, che le strutture più intelligenti acquistano a-posteriori.

A proposito di questo discorso vale la pena citare la teoria dell'Autopoiesi dei sistemi biologici introdotta alcuni anni fa da Maturana e Varela (1980). Essi sostenevano che un sistema biologico integrato avesse in sé una spinta naturale alla autoconservazione che attua mediante scelte obbligate o, se si preferisce, "naturali e spontanee". Questo soggetto è così complesso che, in realtà, non è distaccato dal mondo circostante ma si sviluppa in modo "co-dipendente" con il mondo; come a dire che in realtà non c'è un oggetto esterno reale senza che vi sia associato un soggetto. Secondo l'Autopoiesi, nei sistemi cognitivi molto complessi come l'uomo, il cervello includerebbe un dominio "linguistico" speciale dove il soggetto inventa ed usa un linguaggio per comunicare a sé e agli altri. E questo è il punto cruciale della teoria, il soggetto installerebbe un Ego virtuale in questo dominio (dal quale si svilupperebbe la nostra "identità personale" o IP come la definisco io, Bignetti 2001), un agente o gestore centrale del soggetto con il quale si identifica e con il quale si distingue artificialmente dal resto del mondo per un fine autopoietico. Con questa separazione, anche se fittizia, l'individuo valuta il mondo esterno come se fosse un'entità "oggettiva", nel contempo, egli definisce sé stesso come un soggetto interagente ma dotato di realtà propria e quindi in ultima analisi responsabile delle "scelte" e suscettibile di premio e di punizione. Questi sono i presupposti per la nascita di un comportamento nel quale trovino posto il senso dell'IO, il concetto di azione intenzionale per un fine autopoietico, il giudizio delle proprie azioni ed il circuito a retro-azione della remunerazione (del premio e della punizione) con tutte le derivazioni sul comportamento condizionato. Ne deduciamo due cose sorprendenti e apparentemente contraddittorie: 1) l'IP, anche se deriva dalla nascita di un'entità virtuale soggettiva fittizia, svolge un ruolo di un'importanza fondamentale per i meccanismi dell'apprendimento e della memorizzazione nella crescita individuale; 2) Proprio per la natura virtuale e probabilistica dell'IP, il concetto di azione volontaria e di libero arbitrio sarebbero frutto di pura illusione. In effetti, dal punto di vista scientifico, i dati dimostrano che non può esserci un "pensatore" prima del "pensiero"; la mente, perciò, emergerebbe solo a-posteriori come evento di natura probabilistica, cioè solo se mettiamo insieme tanti mattoncini

aleatori e ciascuno con vita propria e senza memoria storica del perché siano lì e del dove siano diretti. Anche la memoria altro non sarebbe che una rete neuronale dove le informazioni sono codificate nell'intrico della complessità delle sue maglie; le variazioni dei pesi sinaptici all'interno della rete sarebbero in grado di mutare drasticamente il contenuto mnestico medio ed il suo significato.

Il contenuto di una memoria del genere potrebbe benissimo incarnare la nostra IP, l'agente virtuale, così come previsto sulla base della teoria autopoietica. Questo rafforzerebbe l'idea che l'IP individuale possa essere cresciuta da un potenziale genetico iniziale, selezionandosi e rafforzandosi poi attraverso un lungo processo esperienziale di sovrapposizione e di rimodellamento di strutture nervose plastiche; in questo senso, molte sono le analogie tra le reti neuronali reali e quelle neurali artificiali.

C'è, infine, un lavoro recente di Libet (1999) che va citato e che mostra che l'attività cerebrale relativa all'atto decisionale di un'azione intenzionale, precederebbe la presa di coscienza del soggetto (la sua consapevolezza) anche se di un tempo brevissimo. Altri lavori stanno uscendo sempre in tal senso, come a rinforzare l'idea che il soggetto emerga con l'arrivo dell'oggetto e non prima. Staremo a vedere... E' chiaro che a questo punto sorge spontaneo una domanda esistenziale: "Ma il Libero Arbitrio in un quadro del genere che fine fa?" Che il Libero arbitrio sia un'illusione è una vecchia idea che non appartiene certo alla nostra cultura occidentale né a quella medio-orientale ma è tutta estremo-orientale (Bignetti 1991, 2001, 2003a,b). La possibilità che esista una coscienza senza Libero arbitrio d'altra parte non è impossibile da un punto di vista anche scientifico (Bignetti, 2001), si tratta di abituarsi all'idea e non è poi così male.

Parole chiave

Casualità e determinismo, cervello e mente, identità personale, autopoiesi, libero arbitrio

Riassunto

In questo lavoro, siamo degli osservatori esterni che seguono la nascita della mente, di un pensiero compiuto cosciente, partendo dalle singole strutture nervose del cervello. La scoperta sorprendente è che, se prese singolarmente, le strutture molecolari e microscopiche (ad es.: il canale al Na⁺, il bottone sinaptico, il recettore periferico) si comportano in modo sempre aleatorio, mentre assumono un comportamento medio di tipo probabilistico se integrate nel lavoro collettivo per formulare un pensiero compiuto. Ciò suggerisce che la mente non pre-siste al cervello, ma emerge sempre in concomitanza con un qualunque atto decisionale o al massimo lo segue a-posteriori, anche se per una manciata di millisecondi. Il Libero Arbitrio sarebbe dunque una pura illusione dell'Ego? Per la filosofia estremo-orientale (Tao, Advaita Vedanta e Buddismo) è così: non ci sono dubbi da almeno tre mila anni!

Abstract

Single elements constituting the basic structures of the nervous system (i.e.: a synaptic button, a Na⁺ channel or a receptor cell) behave in a stochastic way; however, from

these it can rise an affordable, conscious mind that takes his own responsibilities and voluntary decisions in a deterministic way. This apparent paradox can be solved when those elements are taken collectively; in this case, our mind arises as a probabilistic (quasi-deterministic) machine. Now, the question regards our free-will: if the subject comes out a-posteriori, is free will an illusion? Actually, Tao, Advaita vedanta and Buddhism say so since long ago.

Bibliografia

- 1) Bignetti E. (1991) Il Tao della Biologia, Ann. Fac. Med. Vet. Parma, vol XI, pp 19-36.
- 2) Bignetti E. (2001) Dissacrazione della coscienza, Il Valico ediz., Firenze.
- 3) Bignetti E. (2003a) Autopoiesi della mente, invited speaker al ciclo di seminari di "Neuronica", Dip. Fisica di Palermo.
- 4) Bignetti E. (2003b) Cervello e Libero Arbitrio, invited speaker al Lions di Brescia per una serie di conferenze sul cervello.
- 5) Koch C. (1999) Biophysics of computation, Oxford University press, New York.
- 6) Libet B. (1999) Do we have free will? J. Consc. Studies, 6, 47-57.
- 7) Maturana H.R. and Varela F.J. (1980) Autopoiesis and cognition: the realization of the living, Reidel Pub. Co., Dordrecht.
- 8) Ramachandran V. and Hubbard E. (2003) First effect then cause, BioMedNet conferences, www.BioMedNet.com.

LO STUDIO DELLE RADICI DEI NERVI MEDIANTE VALUTAZIONE DELLE ONDE F, DEL CORD DORSUM POTENTIAL E DEL RIFLESSO H

Bianchi E.¹, Callegari D.¹, Dondi M.¹

Introduzione

Gli studi di conduzione nervosa comunemente utilizzati per valutare le componenti motorie e sensitive dei nervi spinali e cranici solo raramente permettono di investigare le lesioni prossimali¹. In particolare, per la loro posizione anatomica, le radici motorie e sensitive non sono incluse nei segmenti dei nervi spinali valutati mediante gli studi di conduzione nervosa motoria (SCNM) e sensitiva (SCNS). L'elettromiografia (EMG) dei muscoli paraspinali può fornire informazioni sull'integrità delle radici motorie dei nervi spinali, in quanto le fibre che innervano questi gruppi muscolari si distaccano dalle radici ventrali prima che queste si fondano alle dorsali per formare il nervo spinale corrispondente². Indicazioni ancora più precise sulle radici nervose sono quelle derivanti dallo studio delle Onde F, che permettono di valutare le radici motorie dei nervi, del Riflesso H, che consente di esaminare un arco riflesso monosinaptico, e quindi sia le radici sensitive che quelle motorie, e del Cord Dorsum Potential, con il quale si valutano solo le radici sensitive dei nervi spinali. Obiettivo del presente lavoro è di descrivere il significato e l'esecuzione di questi test, mettendone in evidenza l'utilità nella diagnosi delle patologie del sistema nervoso periferico dei piccoli animali.

Onde F

L'onda F rappresenta un potenziale d'azione muscolare a lunga latenza che si sviluppa dopo la stimolazione sovramassimale antidromica di un nervo motorio³. Questo potenziale d'azione segue di diversi millisecondi il potenziale d'azione muscolare derivante dall'attivazione ortodromica delle fibre motorie (Onda M). L'impulso che percorre antidromicamente le fibre motorie, dopo aver raggiunto gli alfa motoneuroni, ripercorre ortodromicamente le stesse fibre determinando la comparsa di un secondo potenziale d'azione muscolare (Onda F) (figura 1). L'onda F è quindi un potenziale di natura esclusivamente motoria, che permette di evidenziare danni di lieve entità a carico delle fibre motorie, non rilevabili con gli SCNM, di diagnosticare le lesioni a carico delle radici motorie dei nervi e le alterazioni funzionali dei motoneuroni delle corna ventrali del midollo spinale³.

¹ Clinica Medica Veterinaria - Dipartimento di Salute Animale - Università degli Studi di Parma

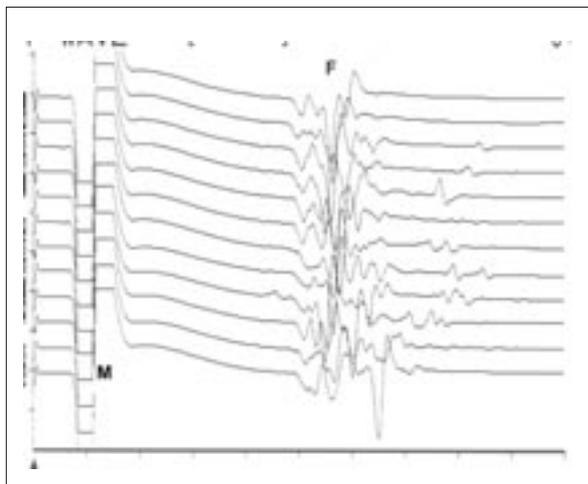


Figura 1 – Esempio di onde F nel cane dopo stimolazione al tarso del nervo sciatico-tibiale e registrazione nei muscoli interessei plantari. Sono identificate le onde M ed F. Parametri di registrazione: 5 ms/div; 400 mV/div.

L'onda F può essere prodotta dalla stimolazione sopramassimale di un qualsiasi punto di un nervo misto o motorio, i nervi più utilizzati per questo esame sono l'ulnare e lo sciatico-tibiale⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷. La stimolazione viene effettuata solitamente al ginocchio e al tarso per il nervo sciatico-tibiale e al carpo per il nervo ulnare, gli elettrodi di registrazione sono inseriti nei muscoli interessei come per gli SCNM. Vi è una certa variabilità nella latenza di quest'onda, ed è quindi necessario registrare almeno 10- 20 onde F al fine di identificare la latenza minima. Quest'ultimo parametro è il più utile, insieme alla latenza dell'onda M, nell'interpretazione clinica di questo test.

Vista la notevole variabilità della lunghezza degli arti dei cani sono stati stabiliti dei modelli di regressione lineare sulla base dei quali determinare le latenze minime normali dell'onda F.

Latenza minima dell'onda F del nervo ulnare = $6.03 + 0.22 \times \text{lunghezza dell'arto (in estensione) in cm dall'angolo craniale della scapola alla punta del dito medio}^4$.

Latenza minima dell'onda F del nervo sciatico-tibiale = $2.799 + 0.029 \times \text{distanza in cm dal punto di stimolazione (tarso) al margine craniale del processo spinoso di L5, passando per il grande trocantere e il processo spinoso di L6}^7$.

La ridotta variabilità nella lunghezza degli arti dei gatti rende superflua l'elaborazione di modelli di regressione lineare per l'identificazione di valori normali della latenza minima dell'onda F³.

Sulla base delle latenze e della lunghezza dell'arto è possibile anche calcolare la velocità di conduzione dell'onda F (FWCV) applicando la formula:

$$\text{FWCV} = (2 \times \text{distanza in tra punto di stimolazione e segmento midollare corrispon-})$$

dente) (mm) / (latenza dell'onda F - latenza dell'onda M - 1) (ms)¹.

L'identificazione di un aumento della latenza minima dell'onda F o della riduzione della FWCV non consente di localizzare la sede della/e lesioni a carico del nervo. Molto utile da questo punto di vista è il calcolo della *F ratio*, che permette di misurare in modo accurato la conduzione nel segmento prossimale rispetto a quello distale del nervo³. La formula per il calcolo della *F ratio* è:

$$F \text{ Ratio} = \frac{\text{latenza dell'onda F} - \text{latenza dell'onda M} - 1 \text{ (ms)}}{\text{latenza dell'onda M} \times 2 \text{ (ms)}}$$

Sono stati pubblicati i valori normali della *F ratio* nel cane per lo sciatico-tibiale dopo stimolazione al tarso (1.954 ± 0.086) e dopo stimolazione alla fossa poplitea (0.883 ± 0.052)⁶.

Se la *F ratio* è maggiore del valore normale sta ad indicare un prevalente coinvolgimento della porzione prossimale del nervo, se è minore indica un prevalente coinvolgimento della parte distale. Quando la *F ratio* è normale in presenza di alterazioni delle latenze dell'onda M ed F e delle velocità di conduzione motorie deve essere sospettata una neuropatia che coinvolge uniformemente per tutta la sua estensione la componente motoria del nervo. Una maggiore sensibilità per le lesioni delle radici e della porzione prossimale dello sciatico-tibiale dovrebbe essere garantita dalla misurazione della *F ratio* dopo stimolazione prossimale (all'altezza del ginocchio)⁶.

L'indipendenza dalle misurazioni della lunghezza del nervo, che sono talvolta imprecise, rappresenta un ulteriore vantaggio della *F ratio* nella pratica clinica.

Un altro parametro che può trovare un impiego clinico è l'ampiezza media dell'onda F, che varia solitamente nel cane tra i 200 e i 300 mV (circa il 3% dell'ampiezza dell'onda M corrispondente)³.

Cord Dorsum Potential

Il *Cord Dorsum Potential* (CDP) è un potenziale elettrico che viene prodotto dai segmenti midollari in risposta a degli stimoli che raggiungono quei tratti di midollo spinale da nervi sensitivi o misti⁸. Rappresenta quindi un evento puramente afferente (sensitivo), che può essere sfruttato per studiare le radici dorsali dei nervi spinali e le corna dorsali midollari⁹.

Il CDP consiste in un'ampia deflessione negativa (verso l'alto) seguita da una deflessione positiva a lunga latenza (figura 2). Il CDP vero e proprio può essere preceduto da una serie trifasica di piccoli picchi, che rappresentano eventi extracellulari legati alla propagazione dei potenziali d'azione sensitivi nel midollo spinale⁹.

I nervi spinali che possono essere impiegati nell'esecuzione di questo test sono il tibiale, il peroneo, il radiale e l'ulnare. I punti di stimolazione sono simili a quelli impiegati per gli studi di conduzione nervosa, mentre gli elettrodi di registrazione (attivi) vengono posizionali nel legamento interarcuato C7-T1, o sulla lamina dorsale di T1 per l'arto anteriore, e nel legamento interarcuato L4-L5 per il posteriore. Gli elettrodi di riferimento vengono posizionati nel sottocute sul lato opposto della colonna,

allo stesso livello del corrispondente elettrodo di registrazione³. Trattandosi di potenziali di ampiezza molto ridotta è necessario fare la media di almeno 500-1000 registrazioni per ottenere dei tracciati chiari, ripuliti dai disturbi elettrici concomitanti.

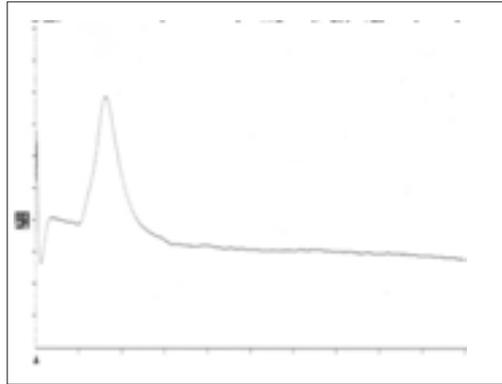


Figura 2 – Esempio di Cord Dorsum Potential nel cane dopo stimolazione del nervo tibiale al tarso e registrazione a livello di spazio L4-L5. Parametri di registrazione: 10 ms/div; 2.50 mV/div.

Sono state stabilite delle formule per il calcolo dei valori normali di latenza del CDP nel cane dopo stimolazione del tibiale al tarso, sulla base delle dimensioni del soggetto e della latenza del potenziale d'azione sensitivo del nervo (SNAP) registrata al ginocchio⁹:

- A. = $- 1.194 + 0.014 \times \text{lunghezza dell'arto dalla punta del quarto dito al grande trocantere seguendo il decorso del nervo (mm; } R^2 = 0.912).$
- B. = $- 2.156 + 0.011 \times \text{lunghezza dell'arto e della colonna dal quarto dito fino all'elettrodo di registrazione seguendo il decorso del nervo (mm; } R^2 = 0.911).$
- C. = $0.941 + 2.197 \times \text{latenza del SNAP tibiale distale (ms; } R^2 = 0.903).$

Per il nervo radiale, dopo stimolazione al carpo, sono state elaborate le seguenti formule per il calcolo della latenza normale del CDP⁹:

- A. = $- 0.9 + 0.014 \times \text{lunghezza dell'arto toracico in estensione dalla punta del quarto dito all'incisura sovraglenoidea (mm; } R^2 = 0.873).$
- B. = $1.454 + \text{latenza del SNAP del radiale laterale superficiale registrato al gomito (ms; } R^2 = 0.903).$

Lo stesso autore ha inoltre stabilito i valori normali e la deviazione standard della latenza tra l'inizio e il picco del CDP nel cane. Che sono 3.1 ± 0.3 ms e 3.0 ± 0.4 ms rispettivamente per il tibiale e il radiale⁹.

Non sono ancora disponibili intervalli di normalità per il CDP nel gatto, ma la minore variabilità intraspecifica di taglia rende meno problematico il riconoscimento di tracciati anomali. La ridotta mole dei soggetti di questa specie facilita notevolmente la

registrazione di questi potenziali, in particolare a livello cervicotoracico; sede nella quale può risultare difficile e talvolta impossibile la registrazione del CDP nei cani di razza gigante.

Riflesso H

Il riflesso H è un potenziale muscolare conseguente all'attivazione di un arco riflesso prevalentemente monosinaptico che coinvolge fibre afferenti del gruppo 1A ed alfa motoneuroni³. In medicina umana, questo riflesso compare per stimolazioni di intensità inferiore rispetto a quelle necessarie per produrre l'onda M, la sua ampiezza aumenta al crescere dell'intensità fino a stimoli sottomassimali, per poi diminuire fino a scomparire con stimoli sopramassimali¹⁰. Nel cane e nel gatto sia la soglia, che l'ampiezza e la latenza dei riflessi H sono variabili. Non essendo inoltre questi riflessi sempre annullati dagli stimoli sopramassimali possono contaminarsi reciprocamente con le onde F (figura 3). Al contrario di quanto accade per la latenza minima dell'onda F, che non è influenzata da questa contaminazione da parte del riflesso H⁶, è frequente la sovrapposizione e il mascheramento del riflesso H da parte dell'onda F.

L'impiego clinico di questo esame è limitato, oltre che dalle sopra citate difficoltà di esecuzione, e dall'interferenza che alcuni anestetici hanno sulla registrazione del potenziale, anche dal fatto che lo studio del riflesso H non permette di valutare separatamente le radici sensitive da quelle motorie^{11,3}.

Ciononostante, sono stati pubblicati i valori normali per il riflesso H nel cane e nel gatto^{5,12,11}.

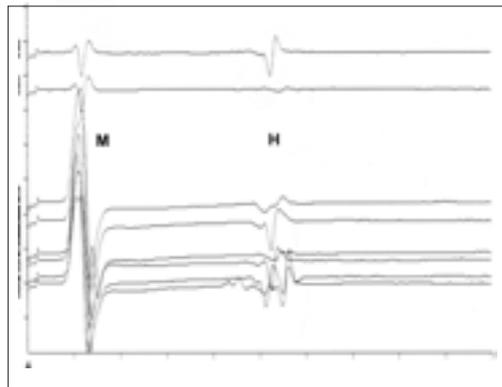


Figura 3 – Esempio di riflessi H in un cane dopo stimolazione al tarso del nervo sciatico-tibiale e registrazione nei muscoli interossei plantari. Sono identificate le onde M ed H. Si evidenzia la variabilità dell'onda H tra le diverse registrazioni e la probabile contaminazione da parte dell'onda F anche dopo stimoli sottomassimali. Parametri di registrazione: 5 ms/div; 100 mV/div; intensità di stimolazione procedendo dall'alto verso il basso 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6 mA.

Discussione e conclusioni

I test elettrodiagnostici rappresentano un passaggio fondamentale nell'iter diagnostico delle patologie del sistema nervoso. Con l'accrescersi delle esperienze nell'impiego

di questi esami, e con l'affinamento delle metodiche di esecuzione anche nella neurologia dei piccoli animali, si sta migliorando l'efficacia di questi esami nell'individuazione di lesioni focali non evidenziabili in passato. Se quindi fino a pochi anni fa la porzione radicolare dei nervi non era in nessun modo indagabile con questi esami, se non attraverso l'interpretazione di effetti "a distanza" della loro sofferenza (denervazione dei muscoli paraspinali, etc.), oggi è possibile studiare i nervi in ogni loro componente (sensitive e motorie) e per tutta la loro estensione. Particolarmente utile a questo scopo è lo studio delle onde F e del CDP, poiché permette di valutare separatamente le radici motorie e quelle sensitive. Molto importante, nell'esecuzione di questi esami, è l'accuratezza delle misurazioni delle distanze e il monitoraggio della temperatura. Quest'ultima infatti influenza notevolmente la velocità di conduzione nervosa, e quindi le latenze dei potenziali.

Numerose sono le polineuropatie, i traumi midollari e dei nervi che possono coinvolgere le radici nervose. Tra le patologie più importanti possiamo ricordare la **poliradiculoneurite acuta del cane**, una patologia a probabile eziologia autoimmune nella quale vengono colpiti la mielina e gli assoni prevalentemente delle radici ventrali e delle porzioni prossimali dei nervi spinali motori. In questa patologia, accanto alla presenza di attività elettrica spontanea all'EMG (potenziali di fibrillazione e onde positive a fronte ripido) e a una riduzione di ampiezza dei potenziali d'azione muscolari, senza marcate riduzioni della velocità di conduzione motoria, si riscontra un aumento della latenza dell'onda F, con incremento della F ratio, e diminuzione dell'ampiezza anche dell'onda F¹³.

Le **poliradiculoneuriti da *Neospora caninum*** si riscontrano soprattutto nei cuccioli, e di rado nei soggetti adulti, e sono caratterizzate, nella forma più comune, da iniziale paraparesi ed atassia dei posteriori, che evolve verso una grave rigidità estensoria degli arti pelvici con atrofia muscolare. I test elettro-neurofisiologici evidenziano, accanto ad attività spontanea diffusa all'EMG, e alterazioni di ampiezza e velocità agli studi di conduzione nervosa motoria e sensitiva, un aumento della latenza dell'onda F ed un prolungamento della latenza del CDP del nervo tibiale¹³.

Tra gli eventi traumatici più comuni a carico del sistema nervoso periferico vi sono le **avulsioni del plesso brachiale e del plesso lombosacrale**. In queste patologie la trazione esercitata sull'arto determina lo stiramento delle radici nervose dei nervi spinali corrispondenti. I test elettrodiagnostici sono di grande aiuto in queste forme, poiché ne permettono la differenziazione dai traumi a carico delle porzioni meno prossimali dei nervi spinali (ad esempio di natura concussiva). Nelle avulsioni infatti, accanto ad alterazioni aspecifiche riscontrabili all'EMG e agli SCNM, vi è tipicamente una sofferenza radicolare evidenziabile grazie allo studio delle onde F e del CDP; e quest'ultimo appare fortemente alterato o non registrabile pur in presenza di studi di conduzione nervosa sensitiva normali.

Un altro gruppo di patologie nelle quali lo studio delle radici può fornire informazioni diagnostiche importanti sono i **tumori delle guaine dei nervi spinali**. Queste neoplasie spesso coinvolgono le radici ventrali dei nervi del plesso brachiale e causano una debolezza a lenta progressione, con atrofia dei muscoli dell'arto anteriore colpito¹⁴. L'EMG e le onde F possono favorire l'evidenziazione delle lesioni causate da queste neoplasie, quando ancora sono in una fase molto precoce.

L'impiego di questi esami elettrodiagnostici "nuovi" rappresenta quindi un momento fondamentale dell'iter diagnostico di numerose patologie del sistema nervoso periferico. La messa a punto di metodiche di esecuzione accurate anche per questi test ne permette un utilizzo routinario nella clinica neurologica dei piccoli animali alla pari di esami ormai consolidati come EMG e studio delle velocità di conduzione.

Parole chiave: Onde F, Riflesso H, Cord Dorsum Potential, Cane, Gatto.

Key words: F wave, H reflex, Cord Dorsum Potential, Dog, Cat.

RIASSUNTO – I test elettrofisiologici comunemente impiegati nello studio delle malattie neuromuscolari (EMG, studi di conduzione nervosa motoria e sensitiva, etc.) forniscono informazioni limitate sulle lesioni delle radici e delle porzioni prossimali dei nervi spinali. L'impiego delle onde F, del Cord Dorsum Potential, e del riflesso H nello studio di queste lesioni nervose periferiche prossimali fornisce informazioni molto utili ai fini diagnostici. In questo articolo gli autori descrivono brevemente questi esami e il loro impiego nella neurologia dei piccoli animali.

SUMMARY –Electrophysiologic tests routinely used for peripheral neuromuscular diseases (EMG, motor and sensory nerve conduction studies etc.) give little information on lesions of nerve roots and of the proximal portions of spinal nerves. Evaluating the F waves, the Cord Dorsum Potential and the H reflex in these proximal peripheral lesions invaluable diagnostic information are provided. In this article the authors briefly describe these tests and their use in small animal neurology.

Bibliografia

- 1) Kimura J.: The F wave. In: Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice - 2nd Edition. F. A. Davis Company, Philadelphia, 1989.
- 2) Yiannikas C.: Short-latency somatosensory evoked potentials in peripheral nerve lesions, plexopathies, and radiculopathies. In: Evoked potentials in clinical medicine - 3rd Edition. Ed. by K.L. Chiappa. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
- 3) Cuddon P.A.: Electrophysiology in neuromuscular disease. *Veterinary clinics of north america / small animal practice*, 32: 31-62, 2002.
- 4) Steiss J.E.: Linear regression to determine the relationship between F-wave latency and limb length in control dogs. *Am J Vet Res*, **45**: 2649-2650, 1984.
- 5) Knecht C.D., Redding R.W., Wilson S.: Characteristics of F and H waves of ulnar and tibial nerves in cats: reference values. *Am J Vet Res*, **46**: 977- 979, 1985.
- 6) Poncelet L., Balligand M.: Nature of the late potentials and F-ratio values in dogs. *Research in Veterinary Science*, **51**: 1-5, 1991.
- 7) Okuno S., Kobayashi T., Orito K.: F-wave latency and F-wave conduction velocity for the tibial nerve in clinically normal dogs. *Am J Vet Res*, **63**: 1262- 1264, 2002.
- 8) Holliday T.A., Weldon N.E., Ealand B.G.: Percutaneous recording of evoked spinal cord potentials of dogs. *Am J Vet Res*, **40**: 326- 333, 1979.

- 9) Cuddon P.A., Delauche A.J., Hutchison J.M.: Assessment of dorsal nerve root and spinal cord dorsal horn function in clinically normal dogs by determination of cord dorsum potentials. *Am J Vet Res*, **60**: 222- 226, 1999.
- 10) Kimura J.: H, T, Masseter, and other reflexes. In: *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice - 2nd Edition*. F. A. Davis Company, Philadelphia, 1989.
- 11) Malik R., Ho S.: A new method for recording H-reflexes from the plantar muscles of dogs. *J Small Anim Pract* **32**: 547-556, 1991.
- 12) Malik R., Ho S., Church D.B.: The normal response to motor nerve stimulation in dogs. *J Small Anim Pract* **30**: 20-26, 1989.
- 13) Cuddon P.A.: Acquired canine peripheral neuropathies. *Veterinary clinics of north america / small animal practice*, **32**: 207-249, 2002.
- 14) Braund K.G.: *Clinical syndromes in veterinary neurology – 2nd*. Mosby, St. Luis, 1994.

EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL FOR THE STUDY OF THE OSTEOGENETIC ACTIVITY OF BONE SEGMENTS.

Gabbi C.¹, Cacchioli A.¹, Romanelli S.², Borghetti P.¹, Martini F. M.¹

INTRODUCTION

In order to describe the analysis of the parameters which influence osteogenetic activity, it is necessary to define the concept of the “experimental animal model”. This concept allows us to study the fundamental biological processes in which the experimentally induced phenomenon is as close as possible to what occurs in clinical practice (3, 5, 8, 11, 13, 15 e 22).

The question of animal experimentation is complex, and can be considered from many points of view: the strictly biological one which is linked to the issue of bio-compatibility, the ethical one which in recent years has become increasingly important, and the legal one which has led to a series of laws aiming to protect the well-being of the animal. Below are cited the main laws (16):

- L. 473/93: *New rules against maltreating animals* (substituting art. 727/30 of the Penal Code);
- D.L.vo 116/92: *Enforcement of Directive 86/609/CEE regarding protection of animals used for experimental or scientific purposes.*

A correct research methodology must have certain characteristics. Above all, it must allow the comparison between results from different experimentations, both within the same laboratory and with other laboratories. Data collection should be as schematic and standardised as possible, and has to consider those parameters which may be needed for further investigations, even if not strictly necessary in that moment. It is therefore necessary setting research purposes, to keep future studies in mind.

In the field of animal experimentation it is particularly important to plan research carefully in order to obtain as much information as possible using the least number of animals (9, 12, 15 e 23). The use of animals in research is an age-old practice, but the role of animals in experiments has changed radically with the evolution of science and technology. In scientific research the use of laboratory animals has gradually extended to different fields: from the production of biological materials (hormones, proteins, serum), to the study of individual responses to particular stimulants, and of the biological processes which regulate more or less standardised behaviours.

The issue becomes extremely complex when we have to choose the kind of animal to use. The aim is to reach a “standardisation of experiments” which could increase in time the comparison between results both within the same laboratory and

¹Department of Animal Health - University of Parma - Italy

²Department of Human Anatomy, Pharmacology and Forensic Medicine – University of Parma - Italy

with others. The parameters by which the subjects for experimentation are selected depend not only on the purpose to reach and the range of data to obtain, but also on many other factors which characterise a particular research, such as the fact that the reaction of the animal used could be related to other species (4, 12, 17 e 19).

In order to allow the results to be used repeatedly, it is necessary to use laboratory animal breeders who maintain a high variability of the population. This means that the genetics of the population remains unaltered over time. The variability in a population may be environmental or genetic, and while in the former there are many factors (housing, feed, climate, etc.), the latter can be controlled and increased according to a particular method of breeding and selection known as *outbreeding*. This foresees the use of the greatest number of reproducers in order to reduce blood-relationship within the group to a minimum. In *outbred* stock cross-breeding between related animals is avoided in order to conserve a “genetic pool” in the population as varied as possible (21).

With this research we wish to emphasize the analogies of growth between counter-lateral bone segments, in particular between the right and left thigh-bone of adult male rabbits. This type of experimentation originates from the awareness of the extreme importance of a correct methodology in the study of interactions between artificial materials and bone tissue (9).

In this work we used *outbred* stock of male White New Zealand rabbits because, in addition to having a bone constitution similar to that of other animals, (particularly as far as osteogenetic metabolism and its modifications are concerned), they best met the needs of this experimentation: our will to use as few animals as possible, the low running costs, the possibility of breeding them in limited space, and their easy handling (4, 12, 17 e 18).

MATERIALS AND METHODS

The experimentation used (*outbred* stock) three male White New Zealand rabbits of a weight of 3.3 ± 0.2 kg, 6 months aged. Animals were free from ecto and endoparasites and no lesions associated with metabolic, infective or nutritional diseases were found.

The housing conditions foresaw the use of steel cages with 0.25/0.3 m² of litter per animal containing one rabbit per cage, with gridded bedding and defecation collection twice a day. The temperature of the room was around 22-24°C, with humidity equivalent to that of external environment. The light/darkness cycle was 12/12 hrs.

Mixed feed (MORINI) was used for feeding, with vitamin and mineral integration composed of dried purple medic flour, dried grass flour, wheat, oats, barley, maize, and soya oil. The breakdown of the main nutrients was: moisture 12%, raw proteins 13.20%, raw fats 2.50%, raw fibre 22%, raw ashes 9.50%. The feed was administered *ad libitum* in pellets and the drinking water was administered *ad libitum* through watering places.

The animals were given doses of bone marker, in order to highlight the areas of bone growth during the period of administration. The markers used are Calcein Green (a dose of 5 mg/kg) and Xylenol Orange (90 mg/kg): these are Calcium binding substances injected subcutaneously, which enter circulation and reach the bones, where

they produce marking lines which highlight the osteogenesis in the 48 hours following the injection, thereby giving an accurate indication of the osteogenic activity in that particular period.

Calcein Green is a fluorescein-imino-diacetic acid complex which generates a brilliant green fluorescent when combined with Calcium; Xylenol Orange forms a divalent bond with Calcium producing an orange fluorescence (2, 10 e 20).

Rabbits were euthanatized (TANAX, Roussel Hoechst Agrovet, 0.3 ml/kg) after general anaesthesia (PREQUILLAN, KETAVET).

Then thigh-bones were removed and were measured with callipers and fixed in 70% ethyl alcohol. Each segment was then sectioned into different parts for reasons related to the inclusion technique of hard tissues. The various portions of bone underwent a dehydration process by repeatedly placing them in ethyl alcohol at different concentrations. These stages are necessary for the inclusion of the samples in acrylic resin (araldite). This method is based on the principle of polymerization of low molecular weight acrylic resins in transparent solids, and allows the fine dissection of hard tissues without preventative decalcification.

The included samples were sectioned with a round diamond blade microtome (Leitz 1600) at thickness of 100 μm , and the preparations obtained were examined with a polarized light microscope, with and without the interposition of the compensator - in order to examine the disposition of the collagen fibres in bone - and with ultraviolet light, in order to see the marking substances and value the topography and the speed of bone growth over time.

The sectioning was done in a distal-to-proximal verse, starting from the distal epiphysis in order to reach the diaphysis in its proximal portion. The sections were dried and placed on slides, each one was catalogued with a letter indicating the thigh-bone of origin and a number. In this way, knowing the height of the thigh-bone, the identification number of each slide and the bone segment of origin, it is possible to identify the position within the bone segment (of each section). A comparison can be made through proportion between a particular slice and the corresponding one in the counter-lateral thigh-bone, and between two sections belonging to two different ones. If carried out correctly and systematically, this method permits to achieve a standardization of experiments which allows the comparison not only with previous works, but also with those carried out by other laboratories or research groups.

The methodology described is important in order to make an effective comparison between right and left thigh-bones in the same animal or in different animals, which was the main purpose of this research.

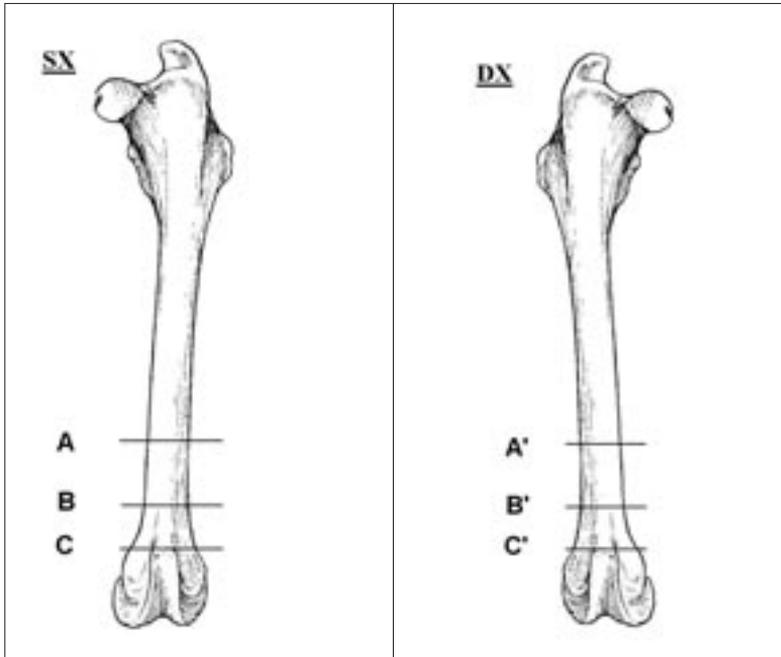
RESULTS

The analysis was carried out on all the sections, but on account of space we report the data concerning to three different levels, corresponding between right and left thigh-bones for each animal. The structural organization and the distribution of the bone fibres (a morphological expression of the mechanical forces distribution on the bone) (1, 6, 7 e 14) were verified by means of observation with polarized light, while the analogies of osteogenesis between each thigh-bone and the counter-lateral on the same level were identified with ultraviolet light.

For the description, each level was given a letter in alphabetic order, in a

distal-to-proximal verse (6): A, B, C for the left thigh-bone and A', B', C' for the right (Scheme 1).

Taking level "A" of the left thigh-bone as a reference point (Fig. 1), the
Scheme 1: Rabbit's left and right femura, cranial view.



observation with polarized light shows, in a craniolateral and caudomedial position, a distinct prevalence of fibres directed perpendicular to the orientation line of the compensator of the microscope, which generates path differences of 550 nm (fibres that become yellow when polarized light passes through them). In the more cranial portion of the medial surface and in the lateral part of the caudal surface there is a strong presence of fibres parallel to the orientation line of the compensator. These appear blue-lighted if lighted with polarized light with interposition of the compensator.

If we compare this image with the counter-lateral thigh-bone "A", we find a very similar organization and in some parts there are mirror-like images. The fibres which appear in yellow are concentrated in craniolateral and caudomedial positions, while the blue-lighted fibres are in the craniomedial and caudolateral ones.

The usefulness of such observations with a polarized light microscope lies in the possibility of analysing the modifications of the fibres distribution on the ground of the solicitation induced by the dynamic forces acting on the bone.

The most interesting aspect of the discussion is provided by the observation - with an ultraviolet light microscope - and the comparison of the osteogenetic activity in the two thigh-bones at the same height. As we can see from the images, in each of the three different section levels we examined, bone growth in right and left segments shows characteristics of definite symmetry and mirror-like images.

In the first two images we can see how the marker, which highlights the

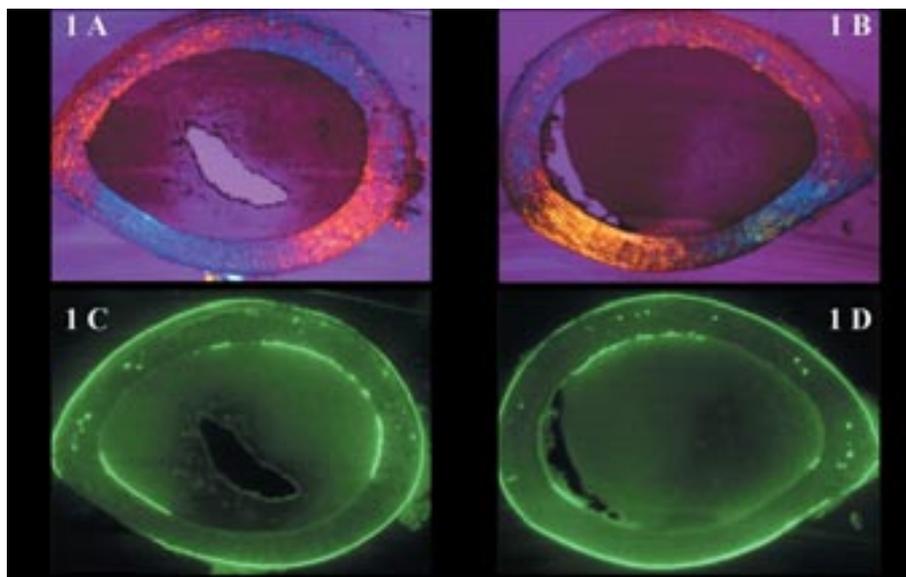


Fig. 1: 1 A- Transverse diaphyseal section of rabbit's left femur (height A), observed with polarized-light microscope, power 2,5x;
1 B- Transverse diaphyseal section of rabbit's right femur (height A'), observed with polarized-light microscope, power 2,5x;
1 C- Section 1 A, observed with ultraviolet-light microscope, Calcein Green labeling, power 2,5x;
1 D- Section 1 B, observed with ultraviolet-light microscope, Calcein Green labeling, power 2,5x.

newly-formed bone, is prevalently periosteal, with some endosteal parts in the craniomedial portion and on the lateral margin of both bone segments.

In the next sections (Fig. 2), proceeding in a proximal-to-distal verse along the bone segments, we can note an inversion of this pattern, with a clearly defined marking on the whole endosteal bone and some fluorescence around osteones on the cranial border and on the medial surface, where the bone activity is particularly expressed.

In the femoral distal epiphysis the osteogenic topography becomes more complex, because of the presence of spongy bone which is less organized than the compact one. Strong marking lines on the endosteal bone and signs of osteonic proliferation in all the section are found on both segments, while fluorescence can be noted on most of the spongy tissue; this demonstrates striking bone growth also in spongy bone.

These images reveal a clear analogy and similarity in the bone growth between right and left thigh-bones, both as far as the osteogenic topography is concerned and the different intensity that the synthesis activity of the newly-formed bone takes on from one height to another in the observed segments.

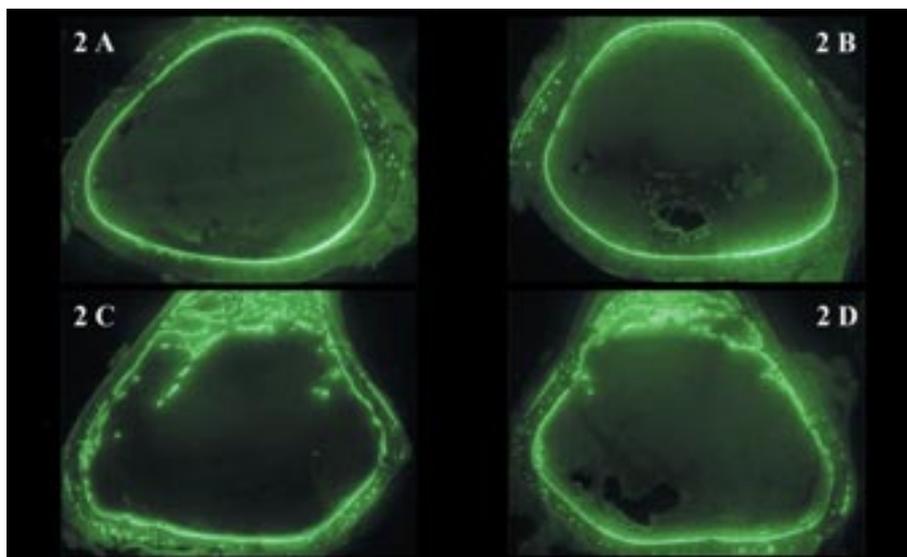


Fig. 2:

2 A- Transverse metaphyseal section of rabbit's left femur (height B) observed with polarized-light microscope, Calcein Green labeling, power 2,5x;

2 B- Transverse metaphyseal section of rabbit's right femur (height B') observed with polarized-light microscope, Calcein Green labeling, power 2,5x;

2 C- Transverse epiphyseal section of rabbit's left femur (height C) observed with ultraviolet-light microscope, Calcein Green labeling, power 2,5x;

2 D- Transverse epiphyseal section of rabbit's right femur (height C') observed with ultraviolet-light microscope, Calcein Green labeling, power 2,5x.

DISCUSSION

This work aims to show the different aspects of the complex osteogenetic activity which regulates bone growth. We tried to answer a number of questions which arise in the orthopaedic field regarding prosthesis implantation and the use of different bone cements as an adjuvant in the stability of the bone-prosthesis complex over time. This experiment confirms the results of previous studies carried out on the extreme variability of bone activity in all its length. Sections produced on different levels in the same bone are not comparable, neither are in counter-lateral segments or in different animals.

Likewise, there is an effective correspondence in the topography of the osteogenetic activity between counter-lateral thigh-bones if we compare sections at proportionally corresponding heights. This fact takes on a considerable importance in animal experimentation, particularly when animals are used to value biological reactions of the bone to the implantation of different materials (for example, the grafting of different cements) at different levels in the same animal. In our opinion, this methodology is incorrect because it does not consider the particular organization of the bone, and this can lead to different results which don't depend on the kind of cement, but rather on the different constitution of the bone as a whole .

These first results may be the basis for the continuation and completion of other studies on osteogenesis in laboratory animals and on the possible applications in

the human field. The aim of these studies is to improve the performances of the materials actually used in orthopaedics, keeping a correct methodology which is essential for the reliability of the results.

Key words: Osteogenesis, Rabbit, Experimental model.

Parole chiave: Osteogenesi, Coniglio, Modello sperimentale

ABSTRACT

The aim of this study is to analyse the characteristics of osteogenetic topography in thigh-bones of male rabbits, in order to better understand the response of the bone to exogenous stimuli such as the implantation of biomaterials used in orthopaedic and maxillo-facial fields. The use of a correct and reliable experimental animal model plays a decisive role in the study of the characteristics of biocompatibility of biomaterials. The repeatability of results and standardisation of experiments are two main purposes which must be considered when choosing the type of animal to be used in biomedical research. In particular, for this experimentation selected animals were chosen to verify some characteristics regarding to the osteogenetic activity and the presence of bone growth analogies in the counterlateral thigh-bones of the rabbit at corresponding levels. Using bone markers at different times, we compared and documented the effective existence of a correspondence in the topography of osteogenesis in the thigh-bones of each animal at proportionally corresponding heights. We highlighted that it is not possible to compare sections of counterlateral thigh-bones of the same animal if taken at different heights, or in sections belonging to different animals, because osteogenetic activity is particular for each animal, and each rabbit showed individual characteristics for the heights we examined. This fact becomes extremely important when different biomaterials are tested and compared: the grafting of different materials in the same animal does not give reliable results since the osteogenesis varies along the whole length of the bone segment, and consequently changes the response of the bone to the different biomaterials.

RIASSUNTO

L'utilizzo di un modello sperimentale animale rigoroso ed affidabile è un passaggio chiave nello studio delle caratteristiche di biocompatibilità dei biomateriali. La ripetibilità dei risultati e la standardizzazione degli esperimenti sono due obiettivi primari che devono essere tenuti in considerazione nel momento in cui si opera la scelta del tipo di animale da utilizzare per la ricerca biomedica. In particolare, per questa sperimentazione sono stati scelti animali selezionati, nei quali abbiamo voluto verificare alcune caratteristiche in merito all'attività osteogenetica e, nello specifico, alla presenza di analogie nella crescita ossea in femori controlaterali di coniglio ad altezze corrispondenti. Mediante l'utilizzo di marcatori ossei in tempi diversi abbiamo riscontrato e documentato l'effettiva esistenza di corrispondenze nella topografia dell'osteogenesi nei femori di ciascun animale, ad altezze proporzionalmente corrispondenti; abbiamo evidenziato come non sia possibile confrontare sezioni di femori controlaterali di uno stesso soggetto prese ad altezze diverse, né tantomeno sezioni appartenenti ad animali diversi, in quanto l'attività osteogenetica è peculiare di cia-

scun soggetto, ed ogni coniglio ha presentato caratteristiche individuali peculiari per ogni altezza esaminata. Questo diviene un dato esternamente importante nel momento in cui si desidera testare e confrontare tra loro biomateriali differenti: l'impianto di più provini sullo stesso segmento osseo non porta risultati attendibili, in quanto l'attività osteogenica del segmento osseo non è costante lungo la sua estensione e la risposta dell'osso ai biomateriali varia di conseguenza.

REFERENCES

1. Ascenzi A, Portigliatti Barbos M, Carando S. (1986). Il rimaneggiamento haversiano nell'adattamento dell'osso alla sua funzione di sostegno in condizioni normali e patologiche. LXII Congresso SIOT, Venezia.
2. Berton A. R., Stephan M. P. (1971). Xylonol Orange, a fluorochhrome useful in polychrome sequential labelling of calcifying tissues. *Stain Tecnology*, 48, 3, 125-29.
3. Browne R. M. (1994). Animal tests for biocompatibility of dental materials-relevance, advantages and limitations. *J. Dent.*, 22, 2, S2, 1-4.
4. Fialkov J. A., Holy C. E., Shoichet M. S., Davies J. E. (2003). In vivo bone engineering in rabbit femur. *J. Craniofac. Surg.*, 14, 3, 324-32.
5. Fox W. C., Aufdemorte T. B. (1993). Experience with osseous implants for bone and biomaterials research. *J. Long Term Eff. Med. Implants*, 3, 1, 1-27.
6. Gabbi C, Cacchioli A, Alpigiani I, Borghetti P, Martini FM. (2002). Parametri morfometrici e densitometrici di polli maschi della linea genetica del broiler Cobb durante i primi due mesi di vita. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*, 253-272.
7. Gabbi C, Cacchioli A, Ragionieri L. (1995). Studio al microscopio a luce polarizzata di tessuto osseo. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*; XV, 71-79.
8. Kuryszko J., Wuropka P., Jedrzejowska I. (2000). Biological experimental models in orthopedics. *Chir. Narzadow Ruchu. Ortop. Pol.*, 65, 5, 541-3.
9. Laberge M., Powers DL. (1991). Scientific basis for bilateral animal models in orthopaedics. *J. Invest Surg.*, 4, 2, 109-10.
10. Lee T. C., Arthur T. L., Gibson L. J., Hayes W. C. (1999). Sequential labelling of microdamage in bone using chelating agents. *J. of Orthopaedic research*, 18, 322-5.
11. Lemons J., Natiella J. (1986). Biomaterials, biocompatibility, and peri-implant considerations. *Dent. Clin. North Am.*, 30, 1, 3-23.
12. Narhi T. O., Jansen J. A., Jaakkola T., De Ruijter A., Rich J., Seppala J., Yli-Urpo A. (2003) Bone response to degradable thermoplastic composite in rabbits. *Biomaterials*, 24, 10, 1697-704.
13. Neyt J. G., Buckwalter J. A., Carroll N. C. (1998). Use of animal models in musuloskeletal research. *Iowa Ortop. J.*, 18, 118-23.
14. Nkenke E., Kloss F., Wiltfang J., Schultze-Mosgau S., Radespiel-Troger M., Loos K., Neukam F. W. (2002). Histomorphometric and fluorescence microscopic analysis of bone remodelling after installation of implants using an osteotome technique. *Clin. Oral Implants Res.*, 13, 6, 595-602.

15. O'Neil B. J., Kline J. A., Burkhart K., Younger J. (1999). Research fundamentals: The use of laboratory animal models in research. *Acad. Emerg. Med.*, 6, 1, 75-82.
16. Papalia S. *Il benessere degli animali*. (2003). Esseditrice, Roma.
17. Piattelli M., Scarano A., Paoloantonio M., Iezzi G., Petrone G., Piattelli A. (2002) Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. *J. Oral Implantol.*, 28, 1, 2-8.
18. Scalvini G, Guaitani A. (1994). Modelli sperimentali nella ricerca biomedica: aspetti tecnici e scientifici. *La Goliardica Pavese*, Pavia.
19. Silva M. J., Sandell L. J. (2002). What's new in orthopaedic research. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 84, A8, 1490-6.
20. Stuart AJ, Smith DA. (1992). Use of the fluorochromes Xylenol Orange, Calcein Green, and Tetracycline to document bone deposition and remodeling in healing fractures in chickens. *Avian Diseases*, 36, 447-449.
21. Van Zutphen L. F. M., Baumans V, Beynen A.C. (1996). *Principi di scienza dell'animale da laboratorio*. La Goliardica Pavese, Pavia.
22. Williams D. F. (1989). A model for biocompatibility and its evaluation. *J. Biomed. Eng.*, 11, 3, 185-91.
23. Yuehwei H. A., Shane K. W., Richard J. F. (2000). Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*, 21, 2635-52.

UTILITA' DELL' ANALISI DEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE INFIAMMATORIE DEL SNC DEL CANE: 3 CASI CLINICI

Callegari D.¹, Bianchi E.¹, De Risio L.²

INTRODUZIONE

Tra le malattie infiammatorie del sistema nervoso centrale (SNC) che possono colpire meningi, encefalo e midollo spinale alcune riconoscono una precisa causa infettiva (virale, batterica, protozoaria, da rickettsie, fungina, o parassitaria), le altre per cui nessun agente infettivo è ancora stato isolato, sono classificate sotto il termine di "meningo-encefalo-mielite non infettiva" (Cauznille, 1999), tra queste ultime sono annoverate la meningo-encefalo-mielite granulomatosa (GME), la meningite-arterite sensibile ai corticosteroidi (SRMA) ed alcune meningo-encefaliti specifiche di razza come la meningo-encefalite necrotizzante del Carlino e del Maltese e le encefaliti necrotizzanti dello Yorkshire terrier.

Quando si ha il sospetto di meningo-encefalo-mielite, una volta eseguite le normali indagini di routine (visita clinica e neurologica, esami ematici e delle urine, ed eventualmente radiografie ed ecografia) è sempre opportuno effettuare un esame del liquido cefalorachidiano (LCR). Quest'ultimo infatti consente, nella maggior parte dei casi, di diagnosticare uno stato infiammatorio del sistema nervoso centrale. Inoltre, l'analisi del LCR e del siero mediante metodiche di laboratorio avanzate (PCR, immunofluorescenza, quantificazione di IgG, IgA, IgM, IEF) consente di stabilire una diagnosi definitiva o comunque di forte sospetto di numerosi tipi di meningo-encefalo-mielite. Per determinate patologie, invece, è necessario l'ausilio di ulteriori indagini collaterali quali TAC o RM, e biopsia del sistema nervoso per esame istologico al fine di raggiungere una diagnosi certa *in vitam*.

In questo articolo verranno presentati tre casi clinici con tre diverse patologie infiammatorie del SNC. L'attenzione verrà concentrata sull'analisi del LCR per dimostrare come questo esame sia di grande utilità nell'iter diagnostico di queste patologie.

CARATTERISTICHE DEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO NORMALE

Nella seguente tabella verranno elencate le caratteristiche principali che deve avere un campione di LCR per essere considerato normale (Chrisman, 1991, 1992; Andersson et al., 1994; Coates, 2000; Cook e De Nicola, 1988; Callegari et al., 2002).

1 Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Clinica Medica Veterinaria – Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma

2 Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza – Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma

ASPETTO	Limpido ed incolore
PESO SPECIFICO	1.004-1.006
GLOBULI ROSSI/ mm³	0-5
GLOBULI BIANCHI/ mm³	< 8
FORMULA LEUCOCITARIA	Prevalenza di linfomononucleati. Basso numero di: neutrofili non degenerati, eosinofili, plasmacellule, cellule delle leptomeningi, del plesso corioideo, cellule endodimali.
PROTEINE mg/dl	Cisterna magna: ≤ 15-20 Cisterna lombare: ≤ 30
IEF	Assenza di bande di sintesi intratecale

CIMURRO O CANINE DISTEMPER VIRUS (CDV)

Il virus del cimurro (CDV, canine distemper virus) è un Morbillivirus della famiglia dei Paramixovirus, che colpisce i cani di tutte le età ma con incidenza maggiore nei cuccioli non vaccinati dopo la perdita dell'immunità passiva materna (a 6-12 settimane di età).

Esistono tre diverse forme neurologiche di questa patologia: la poliencefalomiopatia (PEM) dei cani giovani, la leucoencefalomiopatia (LEM) dei cani maturi e una sindrome conosciuta col nome di "old dog encephalitis" (ODE) che coinvolge generalmente cani con un'età superiore ai 6 anni. In corso di **PEM** si evidenziano principalmente sintomi gastroenterici e respiratori quali vomito, diarrea, tosse e scolo oculo-nasale sieroso-muco-purulento, alcuni cani presentano ipercheratosi dei cuscinetti plantari, congiuntivite e corioretinite. Tra i sintomi neurologici si possono riscontrare crisi convulsive e alterazioni dello stato mentale come depressione e disorientamento, ipermetria, incoordinazione, cadute, rotazione della testa e nistagmo. Occasionalmente si può verificare monoplegia o paraplegia. Un sintomo piuttosto caratteristico è il mioclono, che può interessare i muscoli flessori degli arti, i muscoli addominali e la muscolatura cervicale, ma anche i masseteri e i muscoli temporali e periorbitali. Questo tipo di encefalite è associato ad un'elevata mortalità (Tipold, 1995; Munana, 1996). In corso di **LEM** si possono avere disturbi della deambulazione con paresi degli arti pelvici che può evolvere in tetraplegia, oppure atassia, ipermetria, tremori della testa, deficit vestibolari e paralisi del nervo facciale; lo stato mentale solitamente non è alterato. Alcuni cani presentano deficit mono o bilaterali della reazione di minaccia, associati o meno ad alterazioni dei riflessi pupillari. In questa forma di cimurro il mioclono è di solito assente. I sintomi sono generalmente progressivi e il tasso di mortalità è inferiore a quello della PEM (Munana, 1996). I cani con **ODE** presentano disturbi visivi, fino alla cecità e gravi alterazioni comportamentali quali movimenti di maneggio, ipercinesia, pressione della testa contro gli oggetti, demenza e, in casi estremi, incapacità di riconoscere il proprietario. E' comune anche la comparsa di deficit della reazione della minaccia (Munana, 1996).

La diagnosi si basa in genere sull'anamnesi e sui sintomi clinici, soprattutto nei cuccioli. Ci si può avvalere di prove virologiche, come la ricerca di corpi inclusi

citoplasmatici nei linfociti, nei campioni citologici o nei campioni biotici, o la dimostrazione attraverso l'immunofluorescenza della presenza dell'antigene virale nelle cellule ematiche, nel LCR, nei campioni citologici e nei campioni tissutali. Tuttavia un risultato negativo di questi test non esclude la presenza del virus. Per quanto riguarda la sierologia un solo titolo di IgG positivo non è significativo, in quanto non distingue l'infezione in atto da una passata vaccinazione o esposizione al virus. La dimostrazione di un titolo anticorpale crescente o la determinazione di IgM specifiche è suggestiva, ma non diagnostica, di una infezione da CDV (Birchard e Sherding, 1994). Anche un esame del fondo dell'occhio può essere indicato, in quanto in numerosi casi il cimurro provoca retinocorioidite (Munana, 1996). Un ulteriore ausilio diagnostico è l'esame del LCR che spesso rivela una moderata pleocitosi, ovvero aumento di cellule che comunque non superano le 50 cellule/mm³ con prevalenza di linfociti (Chrisman, 1992) e le proteine totali risultano da mediamente a notevolmente aumentate. Questo accade in particolare quando vi è produzione intratecale di IgG.

C'è, inoltre, un incremento dell'IgG Index, evidente soprattutto nelle forme croniche (Coates, 2000). La sintesi intratecale di anticorpi contro il CDV è indicativa di un'infezione in atto, ma una sua mancanza non la esclude in quanto può essere dovuta ad un'inadeguata risposta immunitaria (Munana, 1996). Recentemente si può contare anche sull'ausilio diagnostico della PCR (polymerase chain reaction) la quale è stata applicata con successo su siero, leucociti, LCR e urine di cani con CDV (Saito et al., 2001).

Non esiste un efficace trattamento antivirale per il cimurro, la terapia è quindi sintomatica. Si somministrano antibiotici ad ampio spettro per controllare le infezioni secondarie, specialmente la polmonite, per la quale ci si può aiutare anche con espettoranti e broncodilatatori. Per controllare i sintomi gastroenterici si possono utilizzare antiemetici e antidiarroici. Nei soggetti che presentano crisi epilettiche è indicata una terapia anticonvulsivante con pentobarbitale, se c'è miocloni si può utilizzare procainamide (Birchard e Sherding, 1994). Se l'animale è fortemente depresso a causa del coinvolgimento cerebrale e non ci sono gravi infezioni batteriche in atto, una terapia con glucocorticoidi può essere di aiuto. Se l'animale risponde a questa terapia, la prognosi può essere buona, ma c'è la possibilità che i farmaci antiepilettici vadano somministrati al cane per tutta la vita. Se il cane non risponde alla terapia e, anzi, le sue condizioni continuano a peggiorare, la prognosi è da ritenersi infausta e bisogna considerare l'eventualità di praticare l'eutanasia (Chrisman, 1991). Comunque, in caso di CDV, la prognosi è generalmente infausta. In uno studio retrospettivo sulle patologie infettivo/ infiammatorie del SNC, su 84 cani affetti da CDV solo 2 sono guariti (Tipold, 1995)

CASO CLINICO

SEGNALAMENTO

Meticcio, maschio, di 4 mesi.

ANAMNESI

Il paziente, 3 giorni dopo la vaccinazione, ha iniziato a manifestare scialorrea, atassia, crisi convulsive e febbre. I sintomi sono peggiorati progressivamente nel corso dei successivi 20 giorni, fino al momento della visita, nonostante fosse già stata messa

in atto terapia antibiotica con amoxicillina e acido clavulanico (Synulox®), cortisonica e antiepilettica con fenobarbital (Luminalette®).

INFORMAZIONI CLINICHE

Il paziente presentava un lieve aumento della temperatura corporea (39.8°C) e le tonsille iperemiche.

All'**esame neurologico** il cane mostrava alternarsi di fasi di ipereccitazione e fasi di profonda depressione del sensorio e atassia di tutti e 4 gli arti, con maggior interessamento del bipede di destra. I riflessi miotattici erano aumentati in particolare sul bipede posteriore, la reazione della minaccia era assente bilateralmente e le pupille si presentavano lievemente miotiche ma rispondevano alla luce. Qualche giorno prima il cane aveva manifestato nistagmo posizionale verticale.

Gli **esami ematici** hanno evidenziato un aumento degli enzimi epatici (GPT = 236, Valori di riferimento: < 40; γ GT = 12.3, Valori di riferimento: < 7; ALP = 229, Valori di riferimento: < 150) e lieve neutrofilia relativa (92% neutrofili, Valori di riferimento: 60-73%).

E' stato inoltre eseguito il **BAEP test** (Brain Auditory Evoked Potentials) (vedi figura 1) che ha dimostrato rallentamento bilaterale della velocità di conduzione lungo la via acustica con conseguente aumento della latenza interpicco tra la I e la V onda (2.96 ms; valori di riferimento: 2.50, deviazione standard: ± 0.17). Quadro elettrodiagnostico compatibile con una patologia demielinizante.

LCR

Con l'animale in anestesia generale gassosa è stato effettuato il prelievo del LCR dalla cisterna magna. Il campione si presentava limpido, con modesta pleocitosi mista ed aumento delle proteine. La IEF (Isoelectric Focusing) ha dimostrato presenza di bande di sintesi intratecale (vedi figura 2), in analogia con quanto riportato in letteratura sull'aumento di IgG Index nel liquor di soggetti affetti da questa patologia (Tipold et al. 1994).

Parametri	Cisterna
ASPETTO	Limpido
GL. ROSSI / mm³	216
GL. BIANCHI / mm³	9
Piccoli mononucleati %	50
Grandi mononucleati %	37
Neutrofili %	13
GLUCOSIO mg/dl	66%
PROTEINE mg/dl	97.71
PESO SPECIFICO	1.006
IEF	Presenza di bande di sintesi intratecale

DIAGNOSI

Le informazioni cliniche, e le caratteristiche del LCR hanno fatto insorgere un forte sospetto di CDV, per tale motivo è stata eseguita un'**immunofluorescenza su**

siero e liquor la quale ha permesso di rilevare anticorpi specifici contro CDV (siero: IgG 1:360, IgM 1:180 +/- 1:360, liquor: IgG 1:20).

TERAPIA

Visto il progressivo aggravarsi dei sintomi clinici i proprietari hanno optato per l'eutanasia, ma non hanno autorizzato l'esame anatomico-patologico.

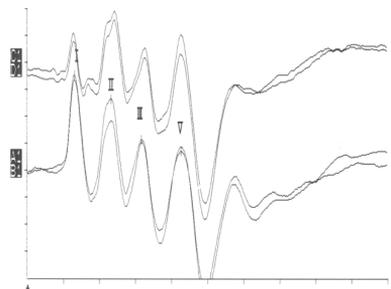


Figura 1: tracciato BAEP del paziente affetto da CDV in seguito a stimolazione a 90 dB NHL. Le tracce A1 e B1 sono relative all'orecchio sinistro e le tracce C1 e D1 sono relative all'orecchio destro. (1 ms/div; 0.62 µV/div). Si evidenzia aumento della latenza interpico tra la I e la V onda (2.96 ms; valori di riferimento: 2.50, deviazione standard: ±0.17).

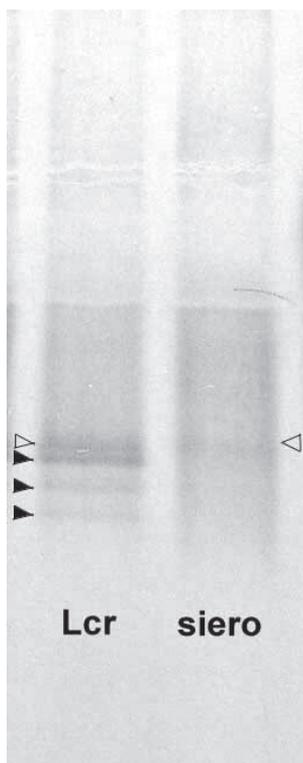


Figura 2: tracciato di IEF di cane affetto da cimurro. Notare la presenza di bande di sintesi intratecale (freccia nera), ovvero bande di IgG che sono presenti nel LCR ma non nel siero. Le bande che sono presenti sia nel siero che nel LCR (freccia bianca) sono di derivazione ematica.

MENINGO-ENCEFALOMIELITE GRANULOMATOSA (GME)

La GME è una patologia infiammatoria idiopatica con insorgenza acuta ed andamento progressivo, riscontrata generalmente, in cani adulti di piccola o media taglia; è stata osservata una predisposizione nei terriers e nei barboncini. La maggior parte dei casi è stata riscontrata in cani giovani adulti e di mezza età, con età media di 5 anni. Entrambi i sessi possono essere colpiti, anche se è stata riscontrata una prevalenza nelle femmine (Munana, 1998).

La causa di questa patologia non è nota, ma è stata proposta una possibile eziologia infettiva, immunomediata o neoplastica (Vandeveldt et al., 1981; Munana, 1998; Kipar et al., 1998; Demierre et al., 2001). La GME può presentarsi in tre diverse forme cliniche: la forma oculare, la forma focale e la forma diffusa. La forma oculare si manifesta con riduzione della vista, midriasi e mancanza del riflesso pupillare. Un esame oftalmologico rivela neurite del nervo ottico. Nelle altre due forme i sintomi sono molto variabili e rispecchiano le sedi interessate dalle lesioni, si possono avere iperestesia, convulsioni, disorientamento, sindrome vestibolare, mielopatie e che possono progredire fino alla tetraparesi (Munana, 1996). L'esame emocromocitometrico e le analisi biochimiche non mostrano in genere alterazioni significative; l'elettroencefalogramma può essere normale o presentare alterazioni aspecifiche. L'analisi del LCR è un ausilio diagnostico molto utile in questa patologia in quanto il LCR è alterato nella maggior parte dei casi. Il LCR può apparire torbido e il peso specifico può essere normale o lievemente aumentato (Bailey e Higgins, 1986). Si ha, in genere, una pleocitosi mononucleata con prevalenza di linfociti, ma sono stati riscontrati anche casi di neutrofilia (Tipold, 1995; Munana, 1996). Si verifica, inoltre, un aumento proteico da moderato a notevole, in alcuni casi i valori possono essere anche superiori a 500 mg/dL (Bailey e Higgins, 1986). L'IgG index è sempre aumentato (in genere entro i $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ anche se sono stati riscontrati dei picchi di $33.9 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Tipold et al., 1994). L'impiego di metodiche di diagnostica per immagini avanzate quali la TAC o la RM, in associazione all'analisi del LCR, (ed all'esclusione di altre patologie mediante sierologia, PCR, immunofluorescenza), può risultare estremamente utile nel tentativo di diagnosticare questa patologia (Barone et al., 2002; Speciale, 1992). Inoltre, qualora questi accertamenti lo rendano indicato, è possibile effettuare l'esame istologico di un prelievo biotico del tessuto cerebrale affetto al fine di ottenere una diagnosi definitiva di GME in vitam. In alternativa, soltanto l'esame istologico post-mortem consente una diagnosi certa di questa patologia (Munana et al., 1998). La terapia si basa sull'utilizzo di dosi immunosoppressive di corticosteroidi (prednisone) ma, contrariamente a quanto si verifica per la meningoencefalite sensibile ai corticosteroidi, non sempre i pazienti rispondono al trattamento e la prognosi è, nella maggior parte dei casi, infausta (Tipold, 1995; Munana, 1996). Una terapia più aggressiva si basa sull'utilizzo di citosina arabinoside (Nuhsbaum et al., 2002). Tuttavia nella maggior parte dei casi la patologia progredisce indipendentemente dal tipo di terapia effettuata. La radioterapia può essere efficace in soggetti con lesioni intracraniche focali (Munana et al., 1998).

CASO CLINICO

SEGNALAMENTO

Pinscher, maschio, di 4 anni.

ANAMNESI

Da quasi un mese il cane manifestava andatura rigida, progressiva atrofia della muscolatura degli arti posteriori ed algia intensa (localizzata a livello di L6 dal veterinario referente). Un trattamento con Ketoprofene per 4 giorni aveva determinato un miglioramento parziale e transitorio. Il cane non era mai stato trattato con corticosteroidi in quanto in passato aveva manifestato gravi sintomi di intolleranza a questi farmaci. Inoltre, l'animale soffriva di gastriti ricorrenti. Al momento della visita presso il nostro Dipartimento, i proprietari riferivano che le condizioni del cane erano progressivamente peggiorate tanto che l'animale non abbassava più la testa per alimentarsi e doveva essere imboccato. La profilassi vaccinale ed antiparassitaria era stata effettuata correttamente.

INFORMAZIONI CLINICHE

Alla visita neurologica il paziente manifestava andatura rigida a testa bassa ed atassia dei quattro arti. Gli arti posteriori mostravano un lieve deficit propriocettivo, moderata atrofia dei muscoli, riduzione del riflesso flessorio. Inoltre si evidenziava marcata iperestesia alla palpazione del rachide lombare (L4- L6) e cervicale. Gli esami ematici effettuati dal veterinario referente non rilevavano alterazioni significative.

L'animale è stato sottoposto ad anestesia generale gassosa per l'esecuzione di radiografie ortogonali del rachide (che sono risultate normali) e prelievo del LCR. Dato che l'aspetto macroscopico del liquor era alquanto anomalo non sono stati effettuati ulteriori accertamenti (mielografia) in attesa dell'esito dell'analisi del LCR.

LCR

Il campione si presentava xantocromico ma quasi limpido dopo centrifugazione, con notevole aumento di globuli rossi e marcata pleocitosi mononucleata (vedi figura 3). Le proteine risultavano notevolmente aumentate. La IEF ha dimostrato presenza di una banda di sintesi intratecale e questo concorda con quanto riportato in letteratura sull'aumento di IgG Index nel liquor di soggetti affetti da questa patologia (Tipold et al., 1994).

Parametri	Lombare
ASPETTO	Xantocromico ma quasi limpido dopo centrifugazione
GL. ROSSI / mm³	3723
GL. BIANCHI / mm³	515
Piccoli mononucleati%	49
Grandi mononucleati%	48
Neutrofilii %	3
GLUCOSIO mg/dl	50 (glicemia non pervenuta)
PROTEINE mg/dl	170.34
PESO SPECIFICO	1.007
IEF	Presenza di una banda di sintesi intratecale

DIAGNOSI E TERAPIA

Data la gravità della patologia, la nota intolleranza del soggetto ai corticosteroidi ed il sopraggiungere di gravi complicanze anestesilogiche, si è optato per l'eutanasia. Il SNC è stato asportato immediatamente per eseguire l'esame anatomopatologico.

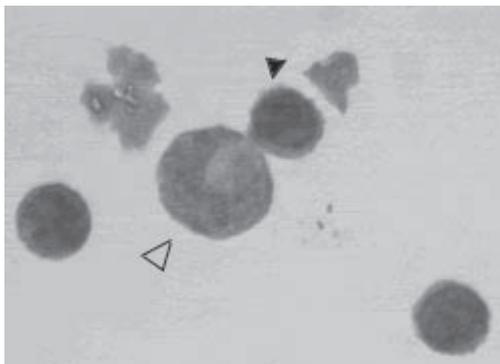


Figura 3: particolare dell'aspetto citologico del liquor del paziente affetto da GME: presenza di piccoli mononucleati (freccia nera) e di un grosso mononucleato (freccia bianca). (Colorazione May Grunwalds Giemsa. Ingrandimento 100X).

All'esame macroscopico, le sezioni trasversali dell'encefalo mostravano confini sfumati tra la corteccia cerebrale e al sostanza bianca. Istologicamente l'encefalo ed il midollo spinale mostravano gravi lesioni infiammatorie multifocali a carico di tutte le aree esaminate, in particolare delle porzioni di sostanza bianca a livello di telencefalo, di cervelletto e del tronco encefalico caudale. Le lesioni erano costituite da spessi manicotti infiammatori perivascolari, spesso confluenti, composti da linfociti, plasmacellule e numerosi istiociti frequentemente raggruppati in nidi a disposizione asimmetrica rispetto alla popolazione infiammatoria perivascolare. Nelle aree maggiormente colpite, il tessuto nervoso compreso tra i focolai infiammatori confluenti risultava edematoso e degenerato. Le lesioni infiammatorie erano presenti anche a livello delle meningi encefaliche e midollari. Il cervelletto risultava moderatamente malacico con piccoli focolai emorragici a livello dell'uvula e del nodulo. Il quadro istopatologico ha permesso di diagnosticare GME in forma multifocale.

MENINGITE-ARTERITE SENSIBILE AI CORTICOSTEROIDI (SRMA)

L'eziologia della SRMA resta tuttora sconosciuta, ma sicuramente un ruolo importante è giocato da meccanismi immunopatogenetici, responsabili di un'eccessiva risposta immunitaria locale (Hess e Sellon, 1997; Burgener, 1998). Sono colpiti prevalentemente cani di grossa taglia di età inferiore ai 2 anni, una predisposizione è stata riscontrata nel Boxer e nel Bovaro del bernese (Tipold e Jaggy, 1994). Questa patologia può presentarsi in due forme, quella acuta o classica caratterizzata da rigidità e iperestesia cervicale, febbre e pleocitosi neutrofila del sangue e del LCR, e quella cronica o atipica caratterizzata da ulteriori deficit neurologici e pleocitosi mista del LCR (Burgener, 1998; Tipold, 1994). In entrambe le forme di SRMA quantità elevate di IgA vengono prodotte sia a livello sistemico che intratecale (Tipold, 1994).

La diagnosi basa essenzialmente sui risultati dell'esame del LCR e, in particolare, sul riscontro di valori elevati di IgA, sia nel siero sia nel LCR. La diagnosi di SRMA è inoltre supportata dalla repentina remissione dei sintomi a seguito della terapia steroidea, soprattutto nei casi di forma acuta (Hess e Sellon, 1997). Nei soggetti con SRMA il LCR generalmente appare torbido e xantocromico, ovvero di colore

giallo – arancio, ed ha peso specifico superiore alla norma. I globuli bianchi sono notevolmente aumentati e possono superare le 500 cellule/mm³ (Chrisman, 1992). Similmente a quanto avviene per le meningiti batteriche, si riscontra la presenza di un 75-100% di neutrofili i quali, però, sono intatti e non degenerati (Chrisman, 1992); in alcuni casi si trova anche qualche eosinofilo (Hess e Sellon, 1997).

La concentrazione proteica liquorale è notevolmente aumentata (> 300 mg/dL) (Chrisman, 1992) e lo stesso vale per l'IgG index, che può arrivare fino a 6 (Hess e Sellon, 1997). Sono stati riscontrati anche alti livelli di IgM e di IgA di produzione intratecale (Hess e Sellon, 1997).

La terapia si basa sull'utilizzo di dosi immunosoppressive di corticosteroidi (prednisone). Nella maggior parte dei casi sono necessari trattamenti di lunga durata (circa 6 mesi), ma la prognosi è generalmente favorevole, soprattutto nelle forme acute trattate in modo corretto e tempestivo. Dato che un'interruzione troppo rapida della terapia può determinare recidive e addirittura refrattarietà al trattamento, alcuni autori consigliano di monitorare mensilmente i pazienti sotto terapia cortisonica ripetendo gli esami ematici e quelli del LCR fino a completa normalizzazione di questi ultimi (Tipold, 1994; Cizinauskas, 2000). Nelle forme croniche, tuttavia, la risposta al trattamento con corticosteroidi può essere parziale o nulla (Tipold, 1994; Cizinauskas, 2000). Nei casi refrattari si può far ricorso ad una terapia immunosoppressiva più aggressiva a base di azatioprina (Nelson e Couto, 1998).

CASO CLINICO

SEGNALAMENTO

Boxer, maschio, di 10 mesi.

ANAMNESI

Sette giorni prima della visita, il paziente aveva improvvisamente iniziato a manifestare andatura rigida e atteggiamento di iperestesia cervicale (testa abbassata con collo esteso), inarcamento laterale del dorso, contrazioni muscolari, forte dolore in diversi punti del rachide (in particolare nel tratto cervicale) ed episodi febbrili. Un quadro clinico simile si era già verificato un mese prima ma si era risolto spontaneamente. Al momento della visita era già stata messa in atto terapia antibiotica con amoxicillina (Zimox®) e antinfiammatoria con carprofen (Rimadyl®). Il piano vaccinale del paziente resta sconosciuto in quanto il soggetto è stato adottato dagli attuali proprietari all'età di 5 mesi.

INFORMAZIONI CLINICHE

Al momento della visita la temperatura era nella norma (38.6°C). Il paziente mostrava stato mentale vigile, ma palesemente sofferente, testa bassa ed inarcamento del dorso con contrazione dei muscoli dell'addome. L'andatura si presentava rigida sul bipede posteriore. Alla visita neurologica le reazioni posturali ed i nervi cranici non hanno mostrato alterazioni. Il paziente manifestava, infine, iperestesia di tutto il rachide, soprattutto della regione cervicale e lombare.

I parametri ematici sono risultati nella norma fatta eccezione per una notevole leucocitosi (21.900 cellule/mm³, valori di riferimento: 6.000-15.000 cellule/mm³). Le radiografie dirette del rachide e del torace non hanno rilevato alcuna alterazione. I test sierologici per *Neospora* e *Toxoplasma* sono risultati negativi.

LCR

Il cane è stato sottoposto ad anestesia generale gassosa per prelevare il LCR a livello di cisterna magna. Il campione si presentava fortemente xantocromico, con notevole aumento dei globuli rossi e marcata leucocitosi neutrofila (vedi figure 4-5-6). Le proteine liquorali erano notevolmente aumentate. La IEF non ha dimostrato presenza di bande di sintesi intratecale nonostante per questa patologia sia stata dimostrato aumento dell'IgG Index (Tippold et al., 1995). Vista l'imponente infiammazione delle meningi il prelievo di LCR è stato difficoltoso e non è stato possibile prelevarne una quantità sufficiente per calcolare il titolo di IgA.

Parametri	Cisterna
ASPETTO	Fortemente xantocromico anche dopo centrifugazione
GL. ROSSI / mm³	432.000
GL. BIANCHI / mm³	4.266
Piccoli mononucleati %	17
Grandi mononucleati %	29
Neutrofil %	54
GLUCOSIO mg/dl	57%
PROTEINE mg/dl	800
PESO SPECIFICO	1.009
IEF	Assenza di bande di sintesi intratecale

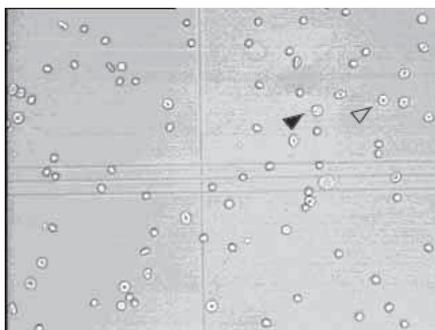


Figura 4: aspetto microscopico del LCR nell'emocitometro (nessuna colorazione. Ingrandimento 20X). Gli eritrociti (freccia bianca) possono essere identificati per l'assenza di nucleo e strutture interne, mentre i leucociti (freccia nera) per la presenza del nucleo hanno un aspetto granulare.

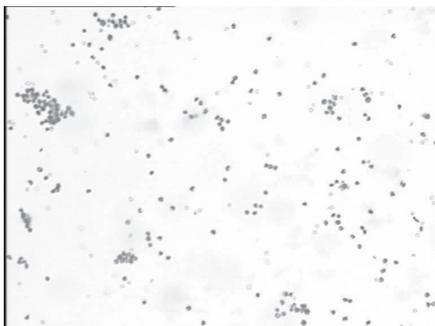


Figura 5: aspetto citologico del liquor di cane affetto da SRMA: notare l'elevata quantità di leucociti presenti. (Colorazione May Grunwalds Giemsa. Ingrandimento 10X).

DIAGNOSI E TERAPIA

Visto il quadro clinico e le caratteristiche del liquido cefalorachidiano è stato avanzato un forte sospetto di SRMA. Per tale motivo è stata consigliata una terapia cortisonica con prednisone (Deltacortene forte®) a dosi immunosoppressive secondo il protocollo consigliato da Tipold e Jaggy (Tipold, 1994) da continuare fino al momento della visita di controllo fissata a distanza di un mese. Dopo i primi giorni di terapia si è notata una repentina remissione dei sintomi la quale ha avvalorato il sospetto diagnostico emesso. Il proprietario di sua iniziativa ha, tuttavia, sospeso la terapia alcuni giorni prima dalla visita di controllo.

Al momento della visita di controllo il cane era clinicamente normale, ma l'analisi del LCR ha premesso di rilevare il persistere dello stato infiammatorio a livello meningeo, anche se in forma molto più lieve rispetto ad un mese prima. Tale reperto potrebbe essere stato influenzato dalla prematura sospensione della terapia.

Esame	Cisterna
ASPETTO	Xantocromico
GL. ROSSI / mm³	1.984
GL. BIANCHI / mm³	30
Piccoli mononucleati %	23
Grandi mononucleati %	17
Neutrofili %	60
GLUCOSIO mg/dl	87
PROTEINE mg/dl	> 200

In base all'esito dell'analisi del LCR il paziente è stato messo nuovamente sotto terapia cortisonica.

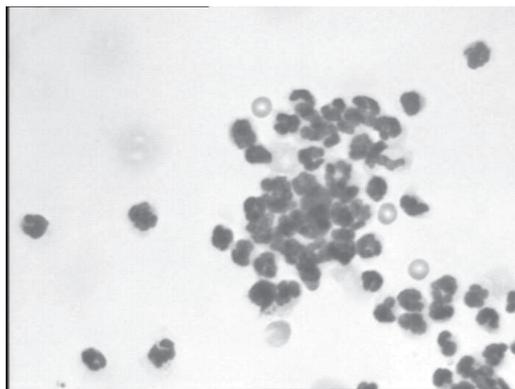


Figura 6: particolare del vetrino precedente ad ingrandimento maggiore. (Colorazione May Grunwalds Giemsa. Ingrandimento 100X).

CONCLUSIONI

Come riportato in precedenza esistono diverse forme di meningo-encefalomielite infiammatoria nel cane e, come si evince dai casi clinici trattati in questo articolo, effettuare una diagnosi eziologica il più accurata possibile è molto import-

ante per la scelta della terapia e per l'emissione di una prognosi. Per fare questo è necessaria un'analisi completa del LCR, accompagnata ad altre metodiche quali l'immunofluorescenza e la PCR per il CDV, la titolazione delle IgA per la SRMA, l'esclusione di altre patologie mediante sierologia, immunofluorescenza, PCR, in associazione a TAC/ RM ed esame istologico di biopsia cerebrale per la GME.

L'esame del LCR, inoltre, come si può vedere nell'ultimo caso clinico, risulta molto utile anche per monitorare il decorso della patologia in atto e per poter stabilire come modulare e quando interrompere la terapia.

Va aggiunto, inoltre, che negli ultimi anni sono stati intrapresi numerosi studi per quanto riguarda le frazioni proteiche ed in particolare le IgG liquorali. La IEF (isoelectric focusing o focalizzazione isoelettrica) ne è un esempio. Essa è una tecnica di laboratorio che permette di separare le molecole proteiche in base al loro punto isoelettrico e, applicata alle IgG del LCR, è stata usata per studiare diverse patologie neurologiche dell'uomo. Rende infatti possibile la ricerca di IgG di sintesi intratecale, ovvero bande oligoclonali di IgG che sono presenti nel LCR, ma non nel siero (Paolino et al., 1990; Andersson et al., 1994; Sellebjerg et al., 1996; Marchetti et al., 1999; Lunding et al., 2000). Tali studi sono ancora in fase iniziale ma i risultati preliminari sono incoraggianti.

Parole chiave: cane, liquido cefalorachidiano, LCR, neurologia, meningite, sintesi intratecale, IgG, Immunoglobuline G, IEF, focalizzazione isoelettrica, cimurro, CDV, meningoencefalite granulomatosa, GME, meningo arterite sensibile ai corticosteroidi, SRMA.

Key words: dog, cerebrospinal fluid, CSF, neurology, meningitis, intrathecal synthesis, IgG, Immunoglobulin G, IEF, isoelectric focusing, distemper, CDV, granulomatous meningoencephalomyelitis, GME, steroid-responsive meningitis-arteritis, SRMA.

RIASSUNTO

Dopo una breve trattazione di tre delle più frequenti forme di meningo-encefalomieliti infiammatorie del cane ad eziologie infettiva e non (cimurro, meningoencefalite granulomatosa e meningo-arterite sensibile ai corticosteroidi), gli autori presentano tre casi clinici per dimostrare l'utilità dell'analisi del liquido cefalorachidiano nella diagnosi di tali patologie.

SUMMARY

Following a brief review of three of the most common inflammatory meningo-encephalo-myelitis of the dog (canine distemper virus, granulomatous meningoencephalomyelitis and steroid-responsive meningitis-arteritis), the authors present three clinical cases to demonstrate the usefulness of cerebrospinal fluid analysis for the diagnosis of these diseases.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersson M., Alvarez-Cermeño J., Bernardi G., Cogato I., Fredman P., Frederiksen J., Fredrikson S., Gallo P., Grimaldi L. M., Grønning M., Keir G.,

- Lamers K., Link H., Magalhães A., Massaro A. R., Öhman S., Reiber H., Rönnbäck L., Schlupe M., Schuller E., Sindic C. J. M., Thompson E. J., Trojano M., Wurster U. (1994) – Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 57, 897-902.
2. Bailey C. S., Higgins R. J. (1986) – Characteristic of cerebrospinal fluid associated with canine granulomatous meningoencephalomyelitis: a retrospective study. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 4 (188), 418-421.
 3. Barone G., Mikszewski J., Vite C. (2002) – Diagnosis of intra-cranial disease based on the combination of MRI and cerebrospinal fluid analysis in 46 dogs and cats. *J Vet Intern Med*; 16: 369.
 4. Bernardini M. (2002) – *Neurologia del cane e del gatto*. Poletto Editore.
 5. Birchard S. J., Sherding R. G. (1994) – *Saunders Manual of Small Animal Practice*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
 6. Burgener I., Van Ham L., Jaggy A., Vandeveldel M., Tipold A. (1998)– Chemotactic activity and IL-8 levels in the cerebrospinal fluid in canine steroid responsive meningitis-arteritis. *Journal of Neuroimmunology* 89, 182-190.
 7. Callegari D., De Risio L., Bianchi E., Martelli P., Cogato I. (2002) – Dogs Cerebrospinal Fluid: Total Protein Concentrations and IgG Isoelectrofocusing (IEF) Patterns. WSAVA – FECAVA – AVEPA Congress 2002, Free Communications Book, 238.
 8. Callegari D., De Risio L., Bianchi E., Martelli P., Cogato I. (2003) – The use of isoelectric focusing to detect oligoclonal IgG of intrathecal synthesis in dogs' CSF: preliminary results. 16th Annual Symposium ECVN “Neurosurgery”
 9. Cauznille L. (1999) – *Sindrome meningo-encefalo-mielitica non infettiva*. SUMMA (7), 9-14.
 10. Chrisman C. L (1991) - *Problems in Small Animal Neurology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
 11. Chrisman C. L. (1992) - *Cerebrospinal Fluid Analysis*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 22(4), 781-810.
 12. Cizinauskas S., Jaggy A., Tipold A. (2000) – Long-term treatment of dog with steroid-responsive meningitis-arteritis: clinical, laboratory and therapeutic result. *Journal of Small Animal Practice*, 41: 295.
 13. Coates J. R. (2000) - *Cerebrospinal Proteins*. In: Schalm's *Veterinary Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins.
 14. Cook J.R., Denicola D.B (1988) - *Cerebrospinal Fluid*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(3), 475-499.
 15. Demierre S., Tipold A., Griot-Wenk M. E., et al. (2001) – Correlation between the clinical course of granulomatous meningoencephalomyelitis in dogs and the extent of mast cell infiltration. *Vet Rec*; 148: 467-472.
 16. Hess P. R., Sellon R. K. (1997) – Steroid-Responsive, Cervical, Pyogranulomatous Pachymeningitis in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 33, 461-468.
 17. Kipar A., Baumgarther W., Vogl C., et al. (1998) – Immunohistochemical char

- acterization of inflammatory cells in brains of dogs with granulomatous meningoencephalitis. *Vet Pathol*; 35: 43-52.
18. Lunding J., Midgard R., Velder C.A. (2000) – Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurologica Scandinava* 102: 322-325.
 19. Nuhsbaum M. T., Powell C. C., Gionfriddo J. R., et al. (2002) – Treatment of granulomatous meningoencephalomyelitis in a dog. *Vet Ophthalmol*; 5: 29-33.
 20. Marchetti P., Gutierrez J., Velia P., Faucompre J.L., Onraed B, Formstecher P., Hennache B. (1999) – Identification of IgG-specific oligoclonal banding in serum and cerebrospinal fluid by isoelectric focusing: description of a simplified method for the diagnosis of neurological disorders. *Clin Chem Lab Med* 37:7, 735-758
 21. Munana K. R. (1996) – Encephalitis and Meningitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 4 (26), 857-874.
 22. Munana K. R., Luttgren P. J. (1998) – Prognostic factors for dogs with granulomatous meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996). *J Am Vet Med Assoc* 212: 1902-1906.
 23. Nelson R. W., Couto C. G. (1998) – *Small Animal Internal Medicine*, Molsby.
 24. Paolino E., Granieri E., Tola M.R., Govoni V., Casetta I., Monetti V.C., Carreras M. (1990)- The combined use of instrumental and laboratory examinations in multiple sclerosis: is the diagnostic facilitation real? *Riv. Neurol* 60:2, 73-81
 25. Saito T., Alfieri A., Alfieri A., et al. (2001) – Detection of canine distemper virus by RT-PCR in serum, leukocytes, cerebrospinal fluid (CSF), end urine in dogs with distemper encephalitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 15:315.
 26. Sarfaty D., Carrillo J. M., Greenlee P. G. (1986) – Differential diagnosis of granulomatous meningoencephalomyelitis, distemper, and suppurative meningoencephalitis in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 4 (188), 387-392.
 27. Sellebjerg F., Christiansen M., Rasmussen L.S., Jaliachivili I., Nielsen P.M., Fredriksen J.L. (1996) - The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. Quantitative assessment of intrathecal immunoglobulin synthesis by empirical formulae. *Eur J Neurol* 3: 548-559
 28. Speciale J., Steinberg S. A., Worrman J. A. (1992) – Computed tomography in the diagnosis of focal granulomatous meningoencephalitis: retrospective evaluation of three cases. *J Am Anim Hosp Assoc*, 28: 327.
 29. Tipold A., Jaggy A. (1994) – Steroid responsive meningitis-arteritis in dogs: Long-term study of 32 cases.
 30. Tipold A., Pfister H. Zurbriggen A., Vandeveld M. (1994) – Intrathecal synthesis of major immunoglobulin classes in inflammatory disease of the canine CNS. *Veterinary Immunology and immunopathology*, 42, 149-159.
 31. Tipold A., Vandeveld M., Zurbriggen A. (1995) – Neuroimmunological studies in steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs. *Research in Veterinary Science*, 58, 103-108.

32. A. Tipold (1995) – Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. *J Vet Internal Medicine*, 9: 304-314
33. Vandavelde M., Fatzer R., Frankhauser R. (1981) – Immunohistological studies on primary reticulosis of the canine brain. *Vet Pathol*; 18: 577-588.

LA VISIONE NEL CANE

Pier Luigi Dodi

*Sezione Clinico Medico Veterinaria
Dipartimento di Salute Animale
Università degli Studi di Parma
pierluigi.dodi@unipr.it*

Premessa

L'occhio del cane, se confrontato con quello dell'uomo presenta delle caratteristiche anatomofisiologiche simili, le differenze, invece, sono legate al diverso "stile di vita". L'occhio umano, infatti, si è evoluto verso una visione diurna, mentre l'occhio del cane presenta una migliore visione crepuscolare e notturna. Il primo inoltre è dotato di maggiore acuità visiva e percezione dei colori. Queste diverse caratteristiche sono dovute alle dimensioni della pupilla dei mezzi diottrici e dalla struttura fotosensoriale. La specie canina infatti è dotata di una ampia cornea e di una pupilla grande e possiede una struttura riflettente denominata tappeto lucido. Queste caratteristiche, però, limitano il potere di discriminare i particolari.

Cenni di morfo-fisiologia della visione

L'occhio può essere paragonato ad una macchina fotografica dove le lenti sono rappresentate dai mezzi diottrici cornea e lente, il diaframma è l'iride e la pellicola è la retina.

Il cristallino, secondo mezzo diottrico per importanza dopo la cornea, è una lente biconvessa, avvolta da una capsula, posta fra iride e corpo vitreo in cui è possibile distinguere una faccia anteriore e una posteriore, due poli ed un equatore. I poli rappresentano il centro delle facce e la linea circonferenziale, posta tra la faccia anteriore e posteriore, sulla quale si fissano le fibre della zonula, è detta l'equatore della lente. Il cristallino è sospeso dalla zonula di Zinn che risulta costituita da sottili fibre che si estendono dai corpi ciliari all'equatore della lente per 360° (Severin, 1990).

Il cristallino svolge due importantissime funzioni: la prima è quella di focalizzare i raggi sulla retina attraverso il meccanismo dell'accomodazione; la seconda è quella di proteggere la retina dai dannosi raggi ultravioletti. L'accomodazione è determinata dalle contrazioni del muscolo ciliare. La contrazione di tale muscolo determina il rilasciamento della zonula del cristallino, che a sua volta consente alla capsula lenticolare di contrarsi e rendere il cristallino più sferico. L'aumento della curvatura del lente, causa un maggior potere rifrattivo, pertanto i raggi divergenti originati da oggetti vicini vengono focalizzati sulla retina.

Il cane rispetto all'uomo presenta una scarsa accomodazione, in quanto il muscolo ciliare risulta meno sviluppato e pertanto ha una maggiore difficoltà di messa fuoco da vicino. La dimensione e la curvatura della cornea, però, compensa in parte questo problema.

La retina è una complessa struttura fotosensoriale multistratificata che delimita il segmento posteriore dell'occhio (Millichamp, 1992) ed è collegata al cervello

attraverso il nervo ottico (II NC). La retina è costituita da una parte neurale, formata da dieci strati, e dall'epitelio pigmentato. I fotorecettori, bastoncelli e coni, costituiscono lo strato più esterno della retina neurale. I bastoncelli sono molto sensibili alla luce e pertanto risultano importantissimi per la visione notturna o con poca luce (visione scotopica). I coni a differenza dei bastoncelli sono poco sensibili alla luce (visione fotopica), ma la loro funzione principale è quella della differenziazione dei dettagli e dei colori (Stades, 1998). I bastoncelli sono più numerosi dei coni che rappresentano solo il 5% del totale dei recettori. Nella retina del cane non vi è nessuna parte libera da bastoncelli, come nell'uomo (macula e fovea), anche se nella parte centrale della retina troviamo un'area molto sensibile ai colori per la maggiore presenza di coni (Lignereux, 1997). I fotorecettori si appoggiano sull'epitelio pigmentato della retina che è a stretto contatto con la coroide, seconda tunica dell'occhio. Le cellule che costituiscono l'epitelio pigmentato svolgono alcune funzioni metaboliche importantissime per la funzione dei fotorecettori. Infatti risintetizzano i pigmenti visivi e fagocitano l'estremità del segmento esterno dei fotorecettori, facilitandone il ricambio. L'epitelio pigmentato ricco di melanina serve anche a "schermare" la parte interna dell'occhio limitando così la diffrazione della luce. Una struttura cellulare extraretinica che non troviamo nell'uomo ma di fondamentale importanza per la visione notturna del cane è il tappeto lucido. E' di forma triangolare a base orizzontale, è assente nei soggetti albinici e nei neonati in cui si sviluppa dopo la nascita (Monti, 1985). Nel cane consta di 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. La funzione del tappeto lucido è quella di amplificare la luce, pertanto risulta indispensabile nelle condizioni di scarsità di luce. Proprio per questa caratteristica il cane è in grado di vedere in poca luce.

La luce che arriva sulla retina è assorbita dai pigmenti visivi, e trasformata così in una risposta elettrofisiologica (fototrasduzione); tale risposta viene inviata attraverso le vie ottiche alla corteccia visiva del sistema nervoso centrale. La retina del cane raggiunge la sua maturità morfologica all'età di 6-7 settimane.

Ottica fisiologica: emmetropia, miopia o astigmatismo

L'occhio è uno strumento ottico pertanto attraverso la rifrazione (proprietà fisica per la quale un raggio luminoso viene deviato quando passa da un mezzo a un altro di differente densità) è in grado di mettere a fuoco i raggi luminosi sulla retina.

L'occhio normale è definito emmetrope. Nei casi in cui i raggi luminosi, per diversi motivi, non vengono focalizzati sulla retina vi è un vizio o errore di rifrazione: miopia, ipermetropia e astigmatismo.

Nella miopia, caratterizzata da un occhio "lungo", i raggi si fermano prima della retina, a differenza della ipermetropia ovvero occhio "corto", dove l'immagine si forma dopo la retina. La retinoscopia o schiastoscopia è la tecnica che si utilizza per lo studio della rifrazione o lo stato diottrico dell'occhio, quindi permette di valutare la cornea normale da quella patologica (Davidson e coll., 1993). Lo studio dei vizi di rifrazione in oftalmologia veterinaria è eseguito solo a scopo di ricerca, in quanto non è possibile applicare lenti correttive, divergenti o convergenti o eseguire la chirurgia rifrattiva come accade nell'uomo.

L'errore di rifrazione più comunemente riscontrabile nel cane è la miopia in cui è riconosciuta una predisposizione di razza nel Pastore Tedesco (- 0.86 D) e nel Rottweilers (- 1.77 D) (Miller, 2001). La miopia inoltre si riscontra nel cane anziano in quanto è associata alla nucleosclerosi della lente, ovvero alla perdita di elasticità del cristallino.

L'ipermetropia così come l'astigmatismo (errore di rifrazione caratterizzato da una irregolarità della sfericità corneale per cui un punto viene percepito allungato) sono poco comuni nel cane.

Sensibilità al movimento e percezione della profondità

L'occhio del cane e dell'uomo presentano una buona percezione del movimento. Rispetto al cane l'uomo in presenza di luce ha una capacità dieci volte superiore per localizzare ed identificare un oggetto in movimento. Questa capacità è legata, come già accennato, alla porzione maculare della retina che essendo costituita solo da coni è in grado di discernere i particolari ed i colori. Questa capacità va a favore del cane in situazioni di scarsità di luce.

In una ricerca condotta in Inghilterra nel 1936 utilizzando 14 cani in forza alla polizia britannica è stato valutato che questi animali erano capaci di riconoscere un oggetto in movimento da 900 metri ma erano incapaci di riconoscere lo stesso oggetto immobile ad una distanza molto inferiore, a meno di 585 metri (Miller, 2001).

La percezione binoculare della profondità o visione stereoscopia ("fusione" in una unica immagine) oltre ad essere legata, ovviamente, alla presenza di entrambi gli occhi risulta essere maggiore negli animali che hanno questi in posizione frontale. I cani quindi, che possiedono un solo occhio hanno una certa difficoltà a percepire la profondità.

La sensazione dei colori

La luce è costituita da particelle chiamate fotoni, ognuna delle quali è formata da più onde elettromagnetiche. La lunghezza d'onda (distanza tra i due picchi successivi dell'onda) di un raggio di energia elettromagnetica distingue la luce dalle onde radio o da una radiazione X. Pertanto la luce è un'onda di energia elettromagnetica che presenta una lunghezza compresa tra 400 e 700 nm.

Il pigmento è quella sostanza in grado di assorbire e riflettere una parte della luce che lo colpisce (Hubel, 1989)

La retina dell'occhio umano è caratterizzata da quattro tipi di fotorecettori: i bastoncelli e tre tipi di coni che contengono ognuno un pigmento differente. La visione dei colori nei primati, incluso l'uomo, è tricromatica in quanto è legata alla presenza nella retina di tre tipi di coni. Tali coni vengono identificati con le lettere L, M e S (impropriamente chiamati coni rossi, verdi e blue) ed hanno pigmenti fotosensibili diversi con massimo assorbimento, rispettivamente, a radiazioni di lunghezza d'onda 560, 530, e 440 nm. I coni L e M sono più numerosi rispetto ai coni S (assenti nel centro della fovea). La risposta elettrica di ogni singolo cono è correlata dal numero di fotoni che sono assorbiti e non dalla lunghezza d'onda ad essi associata, pertanto i singoli coni sono "ciechi al colore". La visione dei colori risulta garantita quindi dalla risposta dei diversi tipi di coni. La mancanza di un tipo di coni nell'uomo è causa

della cosiddetta dicromia, difetto di visione dei colori; tale mancanza è di origine genetica (Fiorentini, 1999).

Il riconoscimento dei colori richiede la presenza di almeno due tipi di fotorecettori con sensibilità spettrale diversa. Diversi Autori hanno studiato la visione dei colori del cane ma i risultati sono spesso in conflitto fra di loro (Miller e coll., 1995). Si può affermare comunque che il cane vede i colori ma non allo stesso modo dell'uomo.

I coni, come già accennato, sono i fotorecettori utilizzati nella visione dei colori e il cane ne ha un numero minore rispetto all'uomo. Il cane presenta due tipi di coni. Un tipo maggiormente sensibile alla lunghezza d'onda da 429 a 435 nm definita del violetto, un secondo tipo sensibile alla lunghezza d'onda di 555 nm, del giallo. I cani sembrano non avere i coni di tipo verde e pertanto sono incapaci a distinguere alcune tonalità dal verde al rosso. Presumibilmente lo spettro visibile del cane varia dal viola al blue-viola ed al giallo. Il cane sembrerebbe incapace di distinguere l'arancione ed il rosso.

Per stabilire quali colori vede il cane si sono utilizzati due tecniche, una basata sullo studio del comportamento ed una elettrofisiologica. Il primo metodo consiste nel condizionamento dell'animale, ad associare la ricerca o l'attesa di cibo con la stimolazione di luci monocromatiche modificandone durata ed intensità. Il secondo metodo è rappresentato dall'elettroretinografia. Con quest'ultima metodica si sottopone la retina a luce artificiale (flash), di varia intensità che determinerà rapide variazioni del potenziale delle cellule che costituiscono la retina: questi cambiamenti, opportunamente acquisiti, costituiscono l'elettroretinogramma (ERG).

Quindi l'ERG deriva dalla somma algebrica dell'attività elettrica delle diverse risposte dello strato dei fotorecettori e cellule bipolari che costituiscono la retina (si tratta di un potenziale di massa o field potential). Tale test valuta la retina e non la funzione visiva.

L'equipaggiamento necessario per l'esecuzione del test è costituito da tre elettrodi, una fonte luminosa flash (lampada allo xenon) e un apparecchio di registrazione (Cordella e coll., 1991).

Il primo elettrodo, a contatto corneale (lente a contatto modificata) è applicato sulla superficie corneale previa interposizione di idrossipropilmetilcellulosa, un mezzo viscoso che garantisce una maggiore adesione. La palpebra viene tenuta aperta con un blefarostato. Il secondo elettrodo, di riferimento è infisso nel tessuto sottocutaneo, a livello zigomatico; il terzo elettrodo di terra viene applicato alla base dell'orecchio. I potenziali d'azione sviluppati in seguito alla stimolazione luminosa (flash posto a circa 30 cm dall'occhio da esaminare) vengono registrati dall'elettroretinografo ed evidenziati graficamente sotto forma d'onda.

La retina è stimolata sia dopo l'adattamento al buio (scotopico), sia dopo l'adattamento alla luce (fotopico). La stimolazione luminosa può essere variata in intensità, colore e frequenza ed in questo modo diventa selettiva rispettivamente sull'attività dei bastoncelli o coni. Infatti la risposta primaria all'adattamento alla luce riflette la funzione dei coni, mentre a seguito all'adattamento al buio si ha quella dei bastoncelli. La stimolazione luminosa rapida o "flicker ERG" è altamente specifica per la funzione dei coni (Komaromy e coll., 1998/a).

Il tracciato elettroretinografico normale è costituito da tre onde: “a”, “b” e “c”. L’onda “a” si presenta come una deflessione negativa e riflette l’attività dei fotorecettori. 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 (piccole onde). L’onda “c” invece è generata dall’epitelio pigmentato della retina (Sims, 1999; Komaromy e coll., 1998/b).

Valutazione della visione

L’esame obiettivo particolare dell’occhio è distinto in due momenti: valutazione della visione ed esame fisico dell’occhio.

La prima parte della visita oculistica quindi è volta alla valutazione della visione, e cioè si verifica la capacità visiva dell’animale. Appena l’animale entra nella sala da visita si studierà il suo comportamento. Un animale che non vede ha molta difficoltà nel muoversi in ambiente non conosciuti; utilizza molto il senso dell’olfatto, si muove lentamente ed urta eventuali oggetti presenti nella stanza (tavoli, sedie ecc.). Il proprietario può riferire che nell’ambiente domestico l’animale vede. Questo atteggiamento è normale in quanto il soggetto memorizza l’ambiente in cui vive.

A tal fine è utile valutare la visione dell’animale in una stanza con scarsità di luce o buia e/o la creazione di un percorso ad ostacoli.

La reazione alla minaccia, il “cotton balls test” e il riflesso pupillare rappresentano un ulteriore e valido aiuto per il veterinario per la valutazione della capacità visiva. La reazione alla minaccia deve essere condotta coprendo un occhio con una mano mentre con l’altra mano si esegue un movimento veloce, tangenzialmente o frontalmente all’occhio controlaterale. Se l’animale vede ammiccherà le palpebre. E’ necessario porre molta attenzione all’esecuzione del test della minaccia in quanto un semplice movimento d’aria può stimolare le ciglia e falsare il risultato; per ovviare a questo inconveniente è possibile interporre uno schermo di plexiglass fra la mano in movimento e l’occhio da valutare. Va precisato che il test della minaccia eseguito in soggetti eccessivamente paurosi può scatenare una risposta abnorme. Al contrario alcuni animali giovani possono non rispondere alla minaccia pur vedendo. In questi soggetti può essere utile eseguire il “cotton balls test” che consiste nel fare passare davanti al campo visivo dell’animale un piccolo batuffolo di cotone ovviamente l’animale vedente seguirà il tragitto del batuffolo in movimento.

Il riflesso pupillare diretto e consensuale deve essere valutato in una stanza buia, utilizzando una penna luminosa o un transilluminatore di Finoff. La risposta positiva (miosi) diretta e consensuale è presente nei soggetti normali. E’ necessario ricordare che una scarsa risposta pupillare non è indice di cecità come è vero il contrario, cioè la presenza della risposta pupillare non è indice di capacità visiva.

La seconda parte della visita oculistica è rappresentata dall’esame fisico dell’occhio. Attraverso l’utilizzo di occhiali ingraditori, lampada a fessura ecc si valuta le varie strutture anatomiche dell’occhio. Lo studio del fondo oculare si esegue con l’oftalmoscopio diretto ed indiretto, previa midriasi della pupilla, che permette di diagnosticare le patologie retiniche che causano la cecità nell’animale.

Parole chiave: cane, occhio, visione, colori.

Riassunto: L'occhio del cane, se confrontato con quello dell'uomo presenta delle caratteristiche anatomofisiologiche simili, le differenze, invece, sono legate al diverso "stile di vita". In Oftalmologia Veterinaria lo studio dei vizi di rifrazione è eseguito solo scopo di ricerca, in quanto non è possibile applicare lenti correttive, divergenti o convergenti o eseguire la chirurgia refrattiva come accade nell'uomo. Dalle ricerche svolte emerge che i cani mediamente si avvicinano alla emmetropia. L'errore di rifrazione maggiore riscontrabile nel cane è la miopia in cui è riconosciuta una predisposizione di razza nel Pastore Tedesco e nel Rottweilers. L'occhio del cane presenta una migliore percezione degli oggetti in movimento rispetto a quelli stazionari. Diversi Autori hanno studiato la visione dei colori del cane ma i risultati sono spesso in conflitto fra di loro. Si può affermare comunque che il cane vede i colori ma non allo stesso modo dell'uomo. Presumibilmente lo spettro visibile del cane varia dal viola al blue-viola ed al giallo. I cani non possiedono i coni di tipo verde e pertanto sono incapaci a distinguere alcune tonalità dal verde al rosso.

Key words: dog, eye, vision, colours.

Summary: A comparison between dog's and man's eye shows similarities from an anatomic point of view and differences relating to the different way of life. In veterinary ophthalmology the study of refraction habits is made for research purposes only because there are no means to apply lenses or refractive surgery as in the human being. According to the latest studies dogs are very close to the emmetropia. The biggest refraction mistake to be found in dogs is that of short sight, although predisposition is known in some races such as German Shepherds and Rottweilers. The dog's eye seems to have a better discerning of moving objects than static ones. Many authors have studied dog's colour vision but the results are often conflicting. Dog can see colours but not the same spectrum as the human being. Generally it can be said that dog's spectrum varies from violet to blue violet and yellow. It hasn't got green cones therefore it cannot perceive the difference of some tones from green to red.

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.
- Cordella M., Franchi A., Baratta G., Macaluso C.: Guida all'esecuzione delle indagini elettrofisiologiche in oftalmologia. Casa Editrice Mattioli, Fidenza, 1991.
- Davidson MG, Murphy CJ, Nasiss MP: Refractive state of aphakie and pseudoaphakie of dogs. Am J Vet Res 54:174-177, 1993.
- Fiorentini A.: Fisiologia della sensazione dei colori. Atti del secondo corso di elettrofisiologia oculare, Istituto di Clinica Oculistica dell'Università di Padova, 1999.

- Hubel D. H.: Occhio, cervello e visione. Ed. Zanichelli Bologna, 1989.
- Koch S.A. : 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.: Electrorretinography 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.: Electrorretinography in dogs and cats. Part II. Technique, interpretation, and indications. The Compendium 20:3, 355.- 366, 1998/b.
- Lignereux Y.: E'lèments d'anatomie ophtalmologique du chien. Prat. Mèd. Chir. Anim. Comp. 32:(Supp.):7-20, 1997.
- Miller P.E., Murphy C.J.: Vision in a dog. JAVMA, 207:12,1623,1995.
- Miller P.E.: Vision in Animals – What do Dogs and Cats See?. Waltham/OSU Symposium, Small Animal Ophthalmology, 2001.
- Monti F., Peruccio C., Solarino A. : La retina e il nervo ottico. In Peruccio (Ed.): Atalante di oftalmologia veterinaria. Edizioni 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.
- Stades F.C. Wyman M. Boevé M.H.,Neumann W.: Ophthalmology for the veterinary practitioner. Schluterssche Hannover, 1998.

LE PATOLOGIE OCULARI NEL BULLDOG INGLESE: STUDIO RETROSPETTIVO

(Barbara Simonazzi, Stefano Zanichelli)

Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

INTRODUZIONE

Il Bulldog Inglese discende con molta probabilità dall'antico Molosso dell'Epiro, cane da guerra, parente del Bull Mastiff ed antenato dei Mastini. E' stato introdotto in Inghilterra quasi sicuramente dai navigatori Fenici nel VI secolo a.C. e denominato "Pugnaces Britannie" dai Romani. Era un cane selezionato ed addestrato per combattere nelle arene e nei circhi contro orsi, leoni, tori ed altri mastini. Questi "combattimenti dell'orrore" continuarono per secoli, fino a quando nel 1835, Re Guglielmo IV, disgustato dalla loro crudeltà, li vietò con un decreto. La razza, non più utilizzata, ebbe un crollo improvviso e, verso la metà del XIX secolo, rischiò addirittura l'estinzione. Gli allevatori allora decisero di intervenire e dopo, accurate selezioni, ottennero un cane più massiccio e dal muso più corto e prognato, ma dal carattere tranquillo, dolce, affettuoso, pur conservando un coraggio impareggiabile. Nel 1875 fu pubblicato il primo standard di razza (6).

Il Bulldog ha una struttura del corpo particolare, la circonferenza del cranio (misurato "a cerchio" davanti alle orecchie), ad esempio, deve essere più o meno pari all'altezza dell'animale al garrese. La testa è decisamente sproporzionata rispetto al corpo, anche se nelle esposizioni canine questa sproporzionata viene considerata un pregio: più grossa è la testa dell'animale, più il soggetto viene ritenuto di valore. La testa del Bulldog Inglese deve essere massiccia, la faccia corta ed il cranio largo. Il muso deve essere corto, largo e retratto, le narici larghe, le labbra pendenti e spesse. La mascella deve essere larga e quadrata e la mandibola curvarsi verso l'alto. Il dorso è corto e non diritto in quanto forma un arco accentuato. Questo particolare, denominato "dorso di capra", costituisce un difetto in gran parte delle razze canine, mentre nel Bulldog è considerato una qualità. Gli arti del Bulldog devono essere forti e molto muscolosi, quelli anteriori molto distanti tra loro con i piedi leggermente mancini (6).

La selezione e la ricerca degli allevatori, per avere Bulldog Inglese sempre più vitali e sani, hanno indotto a sottoporre molti soggetti a controlli sanitari di vario tipo. Oggi esistono soggetti, sottoposti a controllo veterinario specialistico, in possesso di certificazioni di assenza di patologie tipiche della razza. Lo stesso ENCI sta avvertendo l'esigenza di migliorare sempre più le varie razze con certificazioni che ne comprovino la salute e la riproduzione di qualità. Esiste, infatti, da qualche anno, il problema dei soggetti provenienti da paesi non convenzionati o poco attenti alla salute degli animali: in genere paesi dell'est europeo o paesi extraeuropei. In questo caso, per un'economia di acquisto, si portano in casa, spesso e volentieri, elementi malati o destinati a malattie anche molto gravi. Gli allevatori seri e appassionati della razza proseguono nel tentativo di tutela, anche se con difficoltà; molti altri invece si ritirano

e lasciano il passo al business e alla speculazione, con danni terribili e irreparabili.

Gli occhi del Bulldog, il cui standard di razza descrive come “molto distanti, di media grandezza, rotondi e molto scuri”, presentano spesso patologie correlate alla struttura ed alla conformazione della testa (6).

Il College Americano degli Oftalmologi Veterinari ha riportato come patologie oculari supposte di natura ereditaria nel Bulldog Inglese, la distichiasi (Foto 1), le ciglia ectopiche, l'ectropion, l'entropion, il prolasso della ghiandola della terza palpebra, la cheratocongiuntivite secca, la cataratta e la displasia retinica (1, 3, 10, 12, 13). Scopo di questo studio è stato quello di segnalare la nostra esperienza, relativamente alle patologie oculari riscontrate nei Bulldog Inglese presentati alla nostra attenzione per visita specialistica. In particolare abbiamo cercato di evidenziare e differenziare le patologie oculari di sospetta origine ereditaria da quelle definite di natura acquisita.



Foto 1: distichiasi palpebra superiore occhio destro (caso n. 7)

MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati inclusi 34 cani di razza Bulldog Inglese sottoposti a visita specialistica per una patologia oftalmica.

Tutti gli animali sono stati sottoposti a visita oculistica.

Sono stati valutati la reazione di ammiccamento alla minaccia, i riflessi pupillari diretti e consensuali, la produzione delle lacrime (Schirmer tear test, Schering Plough Animal Health) e la pressione intraoculare mediante tonometria per applanaione (Tono-Pen XL, Mentor). E' stato inoltre eseguito il test di colorazione con fluoresceina (Fluorescein sterile strips, HS International). L'esame del segmento anteriore è stato condotto mediante biomicroscopia, il segmento posteriore è stato valutato mediante oftalmoscopia diretta previa dilatazione pupillare con tropicamide 0,5% e fenilefrina 10% (Visumidriatic Fenilefrina collirio, Visufarma).

Sono state quindi esaminate le palpebre e la terza palpebra, sia mediante un semplice esame esterno, sia mediante biomicroscopia, prestando attenzione alla loro integrità, posizione e movimenti. Sono state esaminate la superficie esterna cutanea, quella interna congiuntivale ed il margine palpebrale. In primo luogo sono stati osser-

vati l'aspetto del tegumento, la posizione reciproca delle palpebre, l'orientamento delle ciglia e poi, con maggiore attenzione, la fessura palpebrale: la simmetria delle due fessure, la dimensione della loro apertura e la posizione dei due canti.

La superficie esterna è stata esaminata per evidenziare eventuali difetti di malposizionamento (entropion ed ectropion), alterazioni, infiammazioni, peli maldirezionati (trichiasi), movimenti anomali e corpi estranei. A questo punto sono stati presi in esame i margini palpebrali, sono state esplorate la linea grigia, i pori delle ghiandole tarsali, i punti e le caruncole lacrimali al fine di evidenziare eventuali ulcere, rigonfiamenti, masse o distichie. Infine, è stata esaminata la faccia congiuntivale della palpebra mediante eversione della stessa per osservare la congiuntiva palpebrale e le ghiandole tarsali alla ricerca di possibili neoplasie, calazi, ciglia ectopiche e corpi estranei. La terza palpebra è stata ispezionata nelle sue facce esterna ed interna mediante l'ausilio di una pinza apposita previa applicazione di anestetico locale a base di ossibuprocaina cloridrato (Novesina collirio, Mipharm).

RISULTATI

L'età media dei 34 soggetti presi in esame è risultata di 21 mesi, con un minimo di 1 mese ed un massimo di 84 mesi (7 anni). Sono stati esaminati 25 maschi e 9 femmine. In 9 casi è stato colpito l'occhio destro, in 5 il sinistro (14 casi monolaterali) ed in 20 cani la lesione si è presentata bilateralmente (Foto 2). Otto cani hanno presentato contemporaneamente patologie oculari diverse tra loro (Tabella 1).



Foto 2: prolasso bilaterale della ghiandola della terza palpebra (caso n. 12)

Complessivamente sono stati diagnosticati 9 casi di cheratocongiuntivite secca (KCS), di cui sette monolaterali (3 probabilmente conseguenti ad asportazione della ghiandola della terza palpebra) e solo 2 bilaterali, 5 casi di prolasso della ghiandola della terza palpebra (3 bilaterali), 4 casi di congiuntivite follicolare (2 bilaterali) ed un caso di alterazione qualitativa del film lacrimale. Per quanto riguarda le palpebre, invece, 8 cani erano interessati bilateralmente da entropion (in 3 casi dorsale e ventrale, in 3 mediale inferiore e superiore, in uno dorsale ed in un altro ventrale) ed uno da ectropion

bilaterale (Foto 3). Otto cani presentavano distichiasi (in sette casi bilaterale) e 3 ciglia ectopiche (2 monolaterali).

In 2 casi è stata diagnosticata un'erosione corneale epiteliale di tipo recidivante monolaterale, in un caso un'ulcera ed in un altro un descemetocele (Foto 4). Solo in un cane è stata diagnosticata una patologia del segmento posteriore, nel caso specifico una displasia retinica (Tabella 1).

Complessivamente le patologie oculari riportate sono 44 di cui 35 di natura ereditaria o presunta tale e 9 di tipo acquisito (congiuntivite follicolare, erosione corneale epiteliale di tipo recidivante, ulcera e descemetocele). Tra queste ultime rimane comunque il dubbio che l'ulcera ed il descemetocele fossero patologie secondarie, correlate, nel primo caso, ad entropion, e nel secondo a cheratocongiuntivite secca.



Foto 3: entropion mediale ed ectropion ventrale occhio sinistro (caso n. 24)



Foto 4: descemetocoele occhio destro (caso n. 8)

Il valori osservati dei test di Shirmer hanno presentato una media di 9 mm/min con un range da 1 a 13 mm/min.

I casi di cheratocongiuntivite secca ed alterazione qualitativa del film lacrimale, sono stati trattati con una terapia a base di sostituti delle lacrime (localmente 3-4 volte al giorno) e ciclosporina locale (mattino e sera) continuata nel tempo. Nei casi di KCS secondaria ad asportazione della terza palpebra è stato proposto l'intervento di trasposizione del Dotto di Stenone (3).

I casi di congiuntivite follicolare sono stati trattati con cortisone locale (1 goccia 3-4 volte al giorno per 15 giorni), associato a ciclosporina locale (mattino e sera per 15 giorni) (11) (Foto 5).

I soggetti interessati da prolasso della ghiandola della terza palpebra sono stati poi sottoposti ad intervento chirurgico di riposizionamento della suddetta ghiandola mediante tecnica "pocket" (3, 7, 9).

I casi di entropion ed ectropion sono stati trattati tutti con terapia chirurgica, gli entropion dorsali sono stati corretti mediante tecnica di Stades, quelli ventrali mediante tecnica di Hotz-Celsus e quelli mediali mediante cantoplastica mediale. Il caso di ectropion è stato sottoposto ad intervento correttivo mediante tecnica "a cuneo" (3, 4).

Nei cani che presentavano distichie multiple evidenti e responsabili di manifesto fastidio oculare, si è provveduto all'esecuzione della criochirurgia (7 cani). I soggetti sono stati tutti sottoposti ad intervento di crioepilazione eseguito con 2 cicli di congelamento uno dopo l'altro (11).

I soggetti interessati da ciglia ectopiche sono stati trattati mediante asportazione chirurgica dell'intero ciglio compreso il follicolo pilifero ectopico.

Le erosioni corneali epiteliali recidivanti sono state sottoposte ad intervento combinato di debridement e cheratotomia a griglia, seguito da terapia locale fino a guarigione, a base di antibiotico in collirio (1 goccia 3-4 volte al giorno) e atropina solfato collirio 1% (una goccia mattino e sera per i primi 3 giorni e poi 1 goccia al mattino per i giorni restanti). L'ulcera è stata sottoposta a trattamento con antibiotico in collirio (1 goccia 3-4 volte al giorno fino a guarigione) e atropina solfato collirio 1% (una goccia mattino e sera per i primi 3 giorni e poi 1 goccia al mattino per i giorni restanti). In quest'ultimo caso è risultato determinante l'intervento di correzione dell'entropion che era probabilmente la causa della lesione corneale. Il cane con descemetocèle è stato trattato mediante l'esecuzione di un flap congiuntivale peduncolato e la KCS, probabile responsabile della patologia è stata gestita come sopra indicato. Per quanto riguarda il cane coinvolto da displasia retinica, non è stato effettuato nessun tipo di trattamento. I cani sottoposti sia a terapia farmacologica che chirurgica hanno presentato la completa risoluzione del quadro clinico. Un miglioramento significativo, ma non una guarigione definitiva si è avuto nei cani interessati da KCS e alterazione qualitativa del film lacrimale.

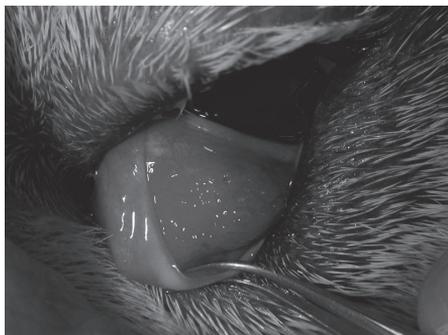


Foto 5: congiuntivite follicolare occhio sinistro (caso n. 25)

Tabella n°1

	SESSO	ETA'	OCCHIO (mesi)	PATOLOGIA
1	M	8	OU	Entropion dors. e vent., distichiasi, prolasso gh. os
2	M	72	OU	Cheratocongiuntivite secca
3	M	84	OU	Cheratocongiuntivite secca
4	F	24	OU	Entropion dors. e vent.
5	F	8	OU	Entropion mediale sup. ed inf.
6	M	6	OU	Prolasso ghiandola della terza palpebra
7	M	3	OU	Distichiasi
8	M	5	OD	Cheratocongiuntivite secca, descemetocoele
9	M	3	OD	Prolasso ghiandola della terza palpebra
10	M	7	OU	Congiuntivite follicolare, distichiasi
11	M	7	OD	Congiuntivite follicolare
12	F	8	OU	Prolasso ghiandola della terza palpebra
13	F	30	OU	Distichiasi, ciglio ectopico od palpebra sup.
14	F	60	OD	Cheratocongiuntivite secca
15	M	3	OD	Prolasso ghiandola della terza palpebra
16	M	20	OS	Cheratocongiuntivite secca
17	M	15	OD	Erosione corneale epiteliale
18	M	1	OS	Cheratocongiuntivite secca (asportazione ghiandola)
19	F	24	OS	Cheratocongiuntivite secca
20	M	36	OS	Cheratocongiuntivite secca (asportazione ghiandola)
21	F	4	OD	Erosione corneale epiteliale
22	M	24	OU	Entropion mediale sup. ed inf., ectropion ventrale
23	F	60	OS	Congiuntivite follicolare
24	M	24	OU	Alterazione qualitativa del film lacrimale
25	M	18	OU	Congiuntivite follicolare
26	M	41	OU	Distichiasi
27	M	4	OD	Cheratocongiuntivite secca (asportazione gh. e terza palpebra)
28	M	3	OU	Distichiasi, ciglio ectopico od palpebra sup.
29	M	18	OU	Entropion dorsale
30	M	18	OD	Distichiasi
31	M	30	OU	Displasia retinica
32	M	12	OU	Entropion mediale sup. ed inf.
33	M	12	OU	Entropion ventrale
34	F	24	OU	Distichiasi, ciglia ectopiche palpebra sup.

Legenda OD: occhio destro; OS: occhio sinistro; OU: entrambi gli occhi

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Da questo lavoro emerge come la maggior parte delle patologie oculari nel Bulldog Inglese siano patologie di tipo ereditario (79,5%) e a carico del segmento anteriore dell'occhio (97%). Trentatré dei 34 casi esaminati hanno, infatti, presentato patologie palpebrali, della terza palpebra, dell'apparato lacrimale e corneali, mentre in un solo cane si è avuta una patologia a carico del segmento posteriore dell'occhio. Le patologie più frequenti sono state osservate a carico delle palpebre, della terza palpebra e del sistema lacrimale.

Le razze brachicefaliche, come il Bulldog Inglese hanno la larghezza della testa maggiore della mezza lunghezza del cranio. Sono razze caratterizzate da testa massiccia, orbite poco profonde ed occhi situati in posizione frontale che possono facilitare lo sviluppo di patologie oculari, ed in particolare modo di quelle palpebrali. In questa razza, inoltre, l'abnorme sviluppo delle pieghe cutanee frontali spesso pesanti ed eccessive, e la cute facciale lassa, concorrono a favorire quest'aspetto. Poiché anche per quanto riguarda il prollasso della ghiandola della terza palpebra, sembra esservi una propensione per i soggetti appartenenti alle razze brachicefale, è possibile che all'insorgenza della patologia contribuisca anche la conformazione dell'orbita.

L'elevato numero di soggetti di sesso maschile (73,5%), ci induce a pensare come questo dato possa essere correlato allo sviluppo dei caratteri sessuali secondari quali l'aumento e la conformazione particolare delle pieghe facciali attorno all'orbita. E' possibile quindi pensare come la spinta delle pieghe facciali sulle palpebre possa creare alterazioni di posizione del margine palpebrale e portare ad esacerbare minime alterazioni di conformazione o relative ai disordini ciliari. Questo dato oggettivo è chiaramente riferito ai soggetti che sono stati presi in considerazione nel nostro lavoro.

Per quanto riguarda l'età, possiamo evidenziare come la media sia piuttosto bassa (21 mesi). Pur non presentandosi direttamente alla nascita, infatti, molte patologie compaiono nei primi mesi o anni di vita, poiché la predisposizione alla patologia può manifestarsi in concomitanza con il completo sviluppo morfologico dell'animale.

Le patologie palpebrali ereditarie sono in genere correlate a conformazioni particolari del cranio, delle orecchie ed alla struttura della testa tipiche di alcune razze selezionate. Molte anomalie ereditarie delle palpebre sono associate alla conformazione, alle dimensioni ed alla forma della fessura palpebrale, nonché alla posizione o alle dimensioni del globo

Entropion, ectropion, distichiasi, ciglia ectopiche, prollasso della ghiandola della terza palpebra e cheratocongiuntivite secca sono spesso il risultato di intensi programmi di incrocio basati su soggetti portatori di tali patologie.

Le modificazioni genetiche nel Bulldog, come anche nelle altre razze canine, sono state prodotte sia in modo inconsapevole, sia al fine di ottenere determinate caratteristiche morfologiche, esasperandone alcune particolarità. Pertanto, i problemi sono insorti sia accidentalmente, associati a questo processo di selezione, sia come conseguenza di una precisa volontà nell'esasperare lo standard. Mentre le malattie acquisite non si possono evitare, i problemi patologici ereditari con le loro gravi manifestazioni cliniche, devono essere prevenuti. I difetti ereditari si possono, infatti, eliminare o si può ridurre al massimo la loro incidenza, mediante misure di controllo efficaci fonda-

te su accoppiamenti tra soggetti sani.

Al fine della prevenzione delle malattie ereditarie del segmento anteriore, dell'occhio del Bulldog come anche nelle altre razze canine, sarebbe interessante una politica di sensibilizzazione in allevamento, tra i giudici ed i proprietari, per la selezione di soggetti esenti da questo tipo di patologie, come si sta verificando ad esempio per il controllo delle patologie della lente, della retina e per il glaucoma (8).

Nonostante le oculopatie palpebrali ereditarie come l'entropion, l'ectropion e la distichiasi non rappresentino un'urgenza, poiché non comportano gravi rischi di cecità, andrebbero comunque prevenute e non sottovalutate ai fini di preservare l'integrità della cornea ed evitare i pericoli di perforazioni corneali ad esse correlate. Purtroppo patologie quali l'entropion ed il prollasso della ghiandola della terza palpebra sono ormai ritenute malattie comuni nel Bulldog Inglese, per cui si ripone quasi più fiducia nell'abilità del chirurgo veterinario a correggere il difetto, piuttosto che nello sforzo prolungato della selezione genetica volto ad ottenere miglioramenti attraverso variazioni nella politica d'allevamento (2).

Vi sono casi in cui le patologie vengono trattate in modo assolutamente non corretto. Nella nostra esperienza, infatti, abbiamo osservato ben 3 casi di KCS (sui 9 segnalati) probabilmente dovuti all'asportazione della ghiandola della terza palpebra (in un caso era stata asportata anche la terza palpebra) effettuata impropriamente dal veterinario referente, o addirittura dallo stesso allevatore (5).

In alcuni programmi d'allevamento, infatti, non si perseguono abbastanza vigorosamente queste tendenze al miglioramento, e le malattie ereditarie non solo sopravvivono, ma divengono sempre più radicate.

Un passo importante sarebbe quindi il garantire l'assenza di segni di malattie oculari ereditarie nei cani utilizzati per la riproduzione (12). Per ottenere questo risultato, è importante non solo che tutti i cani destinati a tale impiego vengano esaminati nell'ambito del progetto, indipendentemente dal fatto che nella razza sia nota o meno la presenza di disordini oculari ereditari, ma anche che il progetto stesso sia sottoposto a continue revisioni. Per molte patologie si parla di "predisposizione razziale", poiché non sempre sono disponibili i dati necessari a dimostrare il comportamento ereditario di determinate oculopatie. La crescente incidenza di alcune forme, all'interno di specifiche razze, e il Bulldog ne è un esempio, può indicare come tali manifestazioni patologiche possano essere determinate geneticamente.

BIBLIOGRAFIA

1. ACVO Genetics Committee: Ocular disorders or suspected to be hereditary in dogs. ACVO ed., 2nd ed., 1996.
2. Bedford P.G.C.: Malattie oculari ereditarie del cane e loro controllo in Gran Bretagna. Vet. Int., 1990, 1, 23-46.
3. Gelatt K.N.: Veterinary ophthalmology. 3rd ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1999.
4. Gelatt K.N., Gelatt J.P.: Handbook of Small Animal Ophthalmic Surgery. Vol. 1: Extraocular Procedures", Oxford, Pergamon, 1994.
5. Gionfriddo J.R., McIlroy T., Powell C.: An English bulldog with a red, squinting Vet. Med., 2003, 7, 556-566.

6. Grandjean D.: Enciclopedia del cane. Parigi, Ed. Aniwa Publishing, 77, 2001.
7. Guandalini A., Rovesti G., D'Anna N.: Studio retrospettivo sulla tecnica di ancoraggio alla rima periorbitale per il prollasso della ghiandola della terza palpebra nel cane in 49 casi. *Veterinaria*, 1997, 11, 4, 7-11.
8. Jégou J.P.: Patologie ereditarie e congenite del cane e del gatto. *Summa*, 1997, 43-70.
9. Morgan R.V., Duddy J.M., McClurg K.: Prolapse of the Gland of the Third Eyelid in Dogs: A Retrospective Study of 89 Cases (1980 to 1990). *J Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1993, 29, 56-60.
10. Peiffer R.L.: Inherited ocular diseases of the dog and cat. *The Comp. on Cont. Ed.*, 1982, 2, 152-168.
11. Severin G.A.: *Veterinary ophthalmology notes*. 2 nd ed. Ft. Collins, Colorado State University, 1996.
12. Stades F.C., Wyman M., Boevé M.H., Neumann W.: *Ophthalmology for the Veterinary Practitioner*. Hannover, Schlütersche GmbH & Co., 1998.
13. Whitley R.D., McLaughlin S.A., Gilger B.C.: Update on eye disorders among purebred dogs. *Vet. Med.*, 1995, 577-592.

Con la collaborazione tecnica di Giuseppe Bertaccini

Parole chiave: cane, occhio, Bulldog Inglese, malattia

Key words: dog, eye, English Bulldog, disease

Mots Clés: chien, oeil, Bulldog Anglais, maladie

Riassunto

In questo studio vengono presi in considerazione 34 cani di razza Bulldog Inglese sottoposti a visita specialistica per un problema oculare. Vengono esaminati 25 maschi e 9 femmine, l'età media è di 21 mesi con un minimo di 1 ed un massimo di 84 mesi. La patologia è bilaterale in 20 casi. Complessivamente sono state diagnosticate le seguenti patologie oculari: cheratocongiuntivite secca (KCS, 9 casi), prollasso della ghiandola della terza palpebra (5 casi), congiuntivite follicolare (4 casi), alterazione qualitativa del film lacrimale (un caso), entropion (8 casi), ectropion (un caso), distichiasi (8 casi), ciglia ectopiche (3 casi), erosione corneale recidivante (2 casi), ulcera (un caso), descemetocoele (un caso), displasia retinica (un caso). Le patologie oculari ereditarie sono risultate il 79,5% delle patologie complessivamente diagnosticate in questa razza.

Summary

In this study we considered 34 English Bulldog referred to a specialistic visit for an ocular problem. We examined 25 males and 9 females, the average age was 21 months with a range of 1 to 84 months. Pathology is bilateral in 20 cases. Overall, the following ocular pathologies were diagnosed: keratoconjunctivitis sicca (KCS, 9 cases), prolapse of the gland of the third eyelid (5 cases), follicular conjunctivitis (4 cases), qualitative tear deficiency (a case), entropion (8 cases), ectropion (a case), distichiasis (8 cases), ectopic cilia (3 cases), recurrent epithelial corneal erosion (2 cases), ulcer

(one case), descemetocele (one case), retinal dysplasia (a case). Hereditary ocular pathologies have turned out to be 79.5% of all pathologies diagnosed in this breed.

Résumé

Dans cette étude nous avons soumis 34 Bulldog Anglais à une visite specialistic pour un problème oculaire. Nous avons examiné 25 mâles et 9 femelles, l'âge moyen est de 21 mois, la plus bas est de 1 mois et la plus grande est de 84 mois. La pathologie est bilatérale dans 20 cas. En conclusion, on a diagnostiqué: kératoconjonctivite sèche (KCS, 9 cas), prolapsus de la glande de la troisième paupière (5 cas), conjonctivite folliculaire (4 cas), alteration qualitative de larme (un cas), entropion (8 cas), ectropion (un cas), distichiasis (8 cas), cils ectopiques (3 cas), érosion cornéenne récurrente (2 cas), ulcère (un cas), descemétocèle (un cas), dysplasie rétinienne (un cas). Les pathologies oculaires héréditaires sont résultées le 79.5% de toutes les pathologies diagnostiquées dans cette race.

L'UVEITE FACOCLASTICA NEL CONIGLIO: ESPERIENZA PERSONALE

(Barbara Simonazzi, Stefano Zanichelli)

Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza, Dipartimento di Salute Animale,
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

PREMESSA

L'*Encephalitozoon cuniculi* è un comune microrganismo, parassita intracellulare obbligato, appartenente alla famiglia dei microsporidi ed in genere repertato nei conigli da laboratorio (6). E' spesso responsabile, nei soggetti affetti, di forme subcliniche di tipo cronico (3).

Le vie di trasmissione riportate sono quella intravenosa, intracerebrale, orale, rettale, respiratoria e transplacentare (3). La maggior parte delle lesioni da esso sostenute sono a carico del sistema nervoso centrale (45,1%) e dei reni (31,4%), più raramente si manifesta con lesioni oculari spesso confondibili con infezioni di tipo batterico (13,7%) (2, 3, 7).

Recentemente in letteratura sono stati riportati nel coniglio casi di uveite facoclastica attribuibili ad *Encephalitozoon cuniculi* (9). L'uveite facoclastica, in questi casi, si osserva come evento eccezionale, in quanto la capsula anteriore della lente non sembra essere rotta da un insulto di tipo traumatico, ma si lesiona in modo spontaneo, probabilmente indotto dalle stesse larve del parassita (4, 11, 12). Intimamente associata alla rottura della lente è stata spesso riportata un'inflammazione di tipo granulomatoso che la accomuna all'endofalmitide facoanafilattica (PE) descritta nell'uomo (3, 45, 12). A differenza dell'uveite indotta da *Pasteurella multocida*, in questo tipo di patologia non si repertano raccolte intraoculari di materiale infiammatorio simil purulento (11).

In genere questo tipo di affezione non risponde alla terapia medica di tipo sintomatico, il glaucoma è spesso una conseguenza inevitabile, per cui l'enucleazione è in una buona parte dei casi l'evento conclusivo dell'uveite facoclastica (3, 5, 6, 11). La facoemulsificazione, unitamente al trattamento di tipo medico sembra essere l'unico trattamento di successo per questo genere di patologia (3, 4, 9, 11).

MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati inclusi 16 conigli nani sottoposti a visita specialistica per un problema di tipo oftalmologico.

Tutti gli animali sono stati sottoposti a visita oftalmologica completa. Sono stati valutati la reazione di ammiccamento alla minaccia, i riflessi pupillari diretti e consensuali e la pressione intraoculare mediante tonometria per appianazione (Tono-Pen XL, Mentor). E' stato inoltre eseguito il test di colorazione con fluoresceina. L'esame del segmento anteriore è stato condotto mediante biomicroscopia, il segmento posteriore è stato valutato mediante oftalmoscopia diretta previa dilatazione pupillare, quando possibile, con tropicamide 0,5% e fenilefrina 10% (Visumidriatic Fenilefrina, Visufarma).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la percentuale di soggetti affetti da uveite facoclastica e di descrivere le caratteristiche cliniche proprie di questa patologia.

RISULTATI

In undici dei sedici conigli nani affetti da problemi oculari è stata diagnosticata una sospetta uveite facoclastica associata a rottura della lente. I restanti cinque, in cui è stata riscontrata un'altra patologia oculare (ascesso retrobulbare, ostruzione dei dotti nasolacrimali, ecc.), sono stati esclusi da questo studio.

L'età media dei soggetti presi in esame è risultata di 10,27 mesi con un minimo di 5 ed un massimo di 24 mesi. Sono stati esaminati 6 maschi e 5 femmine. In 7 casi è stato colpito l'occhio destro ed in 4 il sinistro (Tabella 1) (Fig.1).

Per quanto riguarda la presentazione clinica, in quattro casi i riflessi pupillari erano presenti, in cinque assenti ed in due lenti ed incompleti. La reazione di ammiccamento alla minaccia era presente solamente in tre casi ed in otto è stata valutata positivamente la risposta alla stimolazione luminosa o dazzle reflex (per "dazzle reflex" si intende quel riflesso sottocorticale che un paziente manifesta con il parziale ammiccamento delle palpebre e che viene evocato da uno stimolo luminoso intenso). In sei conigli era presente edema corneale, in due neovascolarizzazione corneale stromale ed in uno sono stati evidenziati abbondanti precipitati cheratici.

La pressione intraoculare (IOP) ha presentato una media di 20,63 mm/Hg con un range da 9 a 40 mm/Hg. Quattro conigli hanno presentato un glaucoma secondario conseguente ad uveite facoclastica. In sei casi era presente "flare" di diversa entità ed in tre è stata evidenziata la presenza di un granuloma irideo. Otto casi presentavano neovascolarizzazione iridea e nei quattro con rialzo pressorio era presente un'iride bombè. In quattro conigli sono state repertate sinechie posteriori di tipo estensivo. In cinque casi è stata diagnosticata la presenza di cataratta, ed in sette è stato possibile evidenziare una rottura a carico della capsula anteriore della lente.

In tutti i soggetti è stata consigliata l'esecuzione dell'immunofluorescenza indiretta o del metodo ELISA per l'identificazione dell'*Encephalitozoon cuniculi*, ma senza nessun consenso da parte dei proprietari.

Nei soggetti affetti da glaucoma è stata prescritta una terapia topica a base di timololo maleato 0,5% (una goccia due volte al giorno) e desametasone 0,1% (una goccia quattro volte al giorno). E' stata inoltre consigliata una terapia chirurgica risolutiva a carico dell'occhio patologico mediante enucleazione o protesin intrasclerale (ISP).

Nei restanti conigli è stata consigliata una terapia topica a base di desametasone 0,1% (una goccia quattro volte al giorno) e tropicamide 0,5% e fenilefrina 10% (una goccia due volte al giorno). È stato inoltre proposto un eventuale intervento di asportazione della lente mediante facoemulsificazione (Tabella 1).

Tabella n.1.

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sesso	F	F	F	M	M	F	M	M	F	M	M
Età											
mesi	13	12	6	8	9	5	12	5	24	7	12
Occhio	SN	DX	DX	SN	DX	DX	DX	SN	DX	SN	DX
PLR	ASS	ASS	PRES	PRES	Lenti	PRES	ASS	ASS	Lenti	PRES	ASS
Reaz.											
min.	ASS	ASS	PRES	PRES	ASS.	PRES	ASS	ASS	ASS	ASS	ASS
Dazzle	ASS	PRES	PRES	PRES	PRES	PRES	ASS	ASS	PRES	PRES	PRES
Cornea	/	Edema	/	Prec. cher.	/	Edema vasi st.	Edema	Edema vasi st.	Edema	/	Edema
IOP											
(mm/hg)	25	39	12	9	13	13	40	15	19	9	33
Aq flare	++++	/	++	/	/	/	++++	/	+	+	+++
Granul.	PRES	ASS	PRES	ASS	ASS	PRES	ASS	ASS	ASS	ASS	ASS
Iride	Neov. bombè	Neov. bombè	/	Neov.	Neov.	/	Neov. bombè	/	Neov.	Neov.	Neov. bombè

Legenda PLR: riflessi pupillari
 Dazzle: dazzle reflex
 Reaz. min.: reazione di ammicciamento alla minaccia
 Aq. flare: aqueous flare
 ASS: assente
 PRES: presente

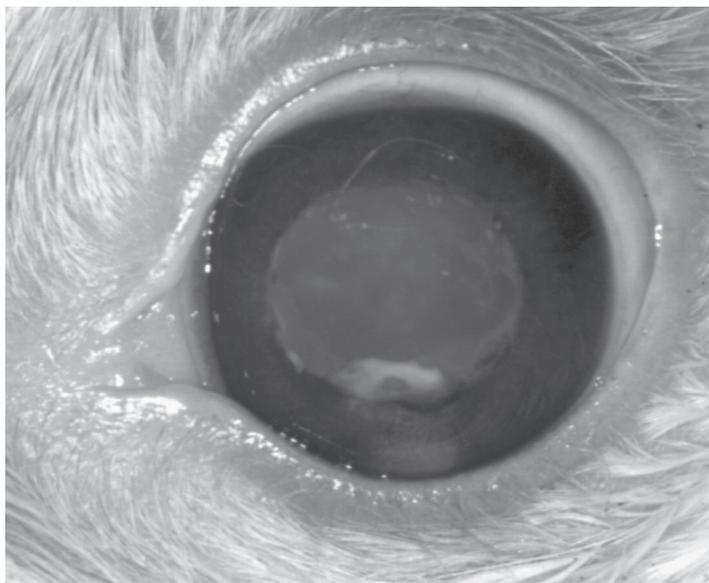


Fig.1: Uveite facoclastica in un coniglio nano (occhio sinistro)

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'eziopatogenesi dell'uveite facoclastica del coniglio, come sopra descritto, non è ancora ben definita. Questa patologia è stata descritta in genere in soggetti piuttosto giovani, senza riscontrare una predisposizione per quanto riguarda il sesso. La presenza dell'*Encephalitozoon cuniculi* all'interno del cristallino suggerisce un ruolo fondamentale di questo microrganismo nello sviluppo della patologia. Fino ad oggi, infatti, il coniglio è l'unica specie in cui si verifica un'uveite facoclastica senza la contemporanea presenza di un evento di tipo traumatico (6).

Le uveiti cosiddette "lente indotte" sono il risultato di un eccesso di anticorpi prodotti dall'organismo nei confronti delle proteine della lente. Si possono avere uveiti facolitiche od uveiti facoclastiche (10).

L'uveite facolitica, meno grave della seconda e frequente nel cane, si verifica in genere in corso di cataratta ipermatura o a rapida evoluzione (frequente ad esempio nelle cataratte di tipo diabetico). In questo tipo di infiammazione si ha un rilascio delle proteine della lente attraverso la capsula del cristallino intatta, durante la maturazione della cataratta ed il suo riassorbimento. La risposta da parte dell'organismo è di tipo linfocitico-plasmocitico (6, 10).

Con il termine facoclastico, invece, vengono descritte gravi uveiti associate ad un rilascio massivo di proteine da parte della lente. Questo genere di uveite si verifica solitamente dopo un evento traumatico di tipo penetrante o conseguentemente ad intervento chirurgico per cataratta se la lente non viene asportata in modo completo (8). Ciò esita spesso nella formazione di aderenze iridee estensive e nell'insorgenza di un glaucoma secondario di tipo ostruttivo (8). Sia nell'uomo che nel cane, il tipo di risposta da parte dell'organismo è in genere di tipo granulomatoso (6). Nel

coniglio, invece, l'uveite facoclastica sembra essere associata alla presenza di *Encephalitozoon cuniculi* all'interno della lente.

Recentemente è stata proposta nel coniglio una terapia a base di Albendazolo, un antelmintico benzimidazolico che ha dimostrato una buona efficacia nei confronti dei microsporidi. Questo farmaco è stato utilizzato in medicina veterinaria per le endoparassitosi ed in medicina umana viene somministrato con successo nei pazienti malati di AIDS ed interessati da microsporidiosi diffuse. Il dosaggio consigliato nel coniglio è di 30 mg/kg PO al giorno anche per lunghi periodi di tempo (3, 9).

Come già riportato precedentemente, la facoemulsificazione precoce è l'unico trattamento in grado di risolvere l'uveite facoclastica eliminando le proteine lenticolari; ciò nonostante, esiste una possibilità di recidiva dell'infiammazione anche dopo l'intervento chirurgico (9). Questo tipo di trattamento chirurgico viene consigliato per l'uveite facoclastica del coniglio, ma anche in caso di uveiti facoclastiche nel cane e nel gatto conseguenti ad insulto di tipo traumatico (1).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di riportare l'esperienza di undici casi clinici di uveite facoclastica del coniglio, probabilmente riconducibili ad infezione da *Encephalitozoon cuniculi*. La percentuale relativa all'incidenza dell'uveite facoclastica all'interno delle patologie oculari nel coniglio è stata, nella nostra esperienza, del 68,75%.

La sintomatologia osservata in questi casi ed il decorso stesso della malattia ci hanno fatto sovrapporre questi quadri clinici a quelli descritti in letteratura. Purtroppo nella nostra esperienza abbiamo osservato una notevole difficoltà nella gestione del caso clinico in quanto i proprietari non ci hanno consentito di effettuare ulteriori esami al fine di ottenere una conferma diagnostica, né tantomeno interventi di facoemulsificazione per cercare di risolvere chirurgicamente il quadro patologico.

L'aspetto più interessante di questa patologia è soprattutto in considerazione del fatto che sono state segnalate microsporidiosi dovute a *Encephalitozoon cuniculi* anche in pazienti umani immunodepressi (ad es. malati di AIDS) (13). Sarebbe quindi molto importante, in futuro, riuscire ad ottenere una diagnosi di certezza mediante sierologia nei soggetti in cui si sospetta la presenza dell'*Encephalitozoon cuniculi* come agente responsabile dell'uveite facoclastica.

BIBLIOGRAFIA

1. Davidson M.G., Nasisse M.P., Jamieson V.E., English R.V., Olivero D.K. Traumatic anterior lens capsule disruption. JAAHA, 1991, 27, 410-414.
2. Ewringmann A., Gobel T. Clinical examination and therapy of encephalitozoonosis in pet rabbits. Kleintierpraxis, 1999, 44, 5, 357-372.
3. Felchle L.M., Sigler R. L. Phacoemulsification for the management of Encephalitozoon cuniculi-induced phacoclastic uveitis in a rabbit. Vet. Ophth., 2002, 5, 3, 211-215.
4. Gelatt K.N. Veterinary ophthalmology. 3 rd ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 399, 771, 816-817, 1999.
5. Grahn B., Wolfer J., Keller C. Diagnostic Ophthalmologie, Ophthalmologie Diagnostique. Can. Vet. J., 1991, 32, 372-373.
6. Guandalini A., Ratto A. Phacoclastic uveitis in the rabbit: a case report. Veterina-

- ria, 1996, 6, 1, 39-41.
7. Raphael B.L. Pet rabbit medicine. The Comp. on Cont. Ed., 1981, 3, 1, 60-64.
 8. Severin G.A. Veterinary ophthalmology notes. 2 nd ed. Ft. Collins, Colorado State University, 372, 1996.
 9. Stiles J., Didier E., Ritchie B., Greenacre C., Willis M., Martin C. Encephalitozoon cuniculi in the lens of a rabbit with phacoclastic uveitis: confirmation and treatment. Vet. & Comp. Opth., 1997, 7, 4, 233-238.
 10. Wilcock B.P., Peiffer R.L. The pathology of lens-induced uveitis in dogs. Vet. Pathol., 1987, 24, 549-553.
 11. Williams D.L., Barrie K., Evans T.F. Veterinary Ocular Emergencies. Oxford, Butterworth Heinemann, 77-78, 2002.
 12. Wolfer J., Grahn B., Wilcock B., Percy D. Phacoclastic uveitis in the rabbit. Prog. in Vet. and Comp. Opth., 1993, 3, 3, 92-97.
 13. Zidier E. S., Visvesvara G. S., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., De Groote M. A., and Vossbrinck C. R.. A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to Encephalitozoon cuniculi III, originally isolated from domestic dogs. J. Clin. Microbiol., 1996, 34, 11, 2835-2837.

Parole chiave: occhio, coniglio, uveite facoclastica

Key words: eye, rabbit, phacoclastic uveitis

Mots Clés: oeil, lapin, phacoclastic uveitis

Riassunto

L'uveite facoclastica spontanea del coniglio è una patologia descritta di recente. La maggior parte dei casi presenti in letteratura ha riportato la presenza di un microrganismo intralenticolare identificato con il nome di *Encephalitozoon cuniculi*. Negli animali domestici le uveiti lente-indotte sono riportate frequentemente e si presentano in due forme: quella facoclastica e quella facolitica. Nelle altre specie animali, escluso il coniglio, la rottura del cristallino è in genere associata a trauma. Gli Autori hanno preso in considerazione sedici conigli con patologie oculari ed hanno descritto undici casi di sospetta uveite facoclastica indotta da *Encephalitozoon cuniculi*.

Summary

Spontaneous phacoclastic uveitis in the rabbit is a recently recognized disease entity. The majority of the cases reported in literature revealed the presence of an intralenticular micro-organism, identified as *Encephalitozoon cuniculi*. Lens-induced uveitis in domestic animals is commonly encountered and occurs in two forms: phacoclastic and phacolytic. In other species apart from the rabbit lens rupture is generally associated with trauma.

The Authors examined sixteen rabbits with ophthalmic diseases and described eleven clinical cases of suspected phacoclastic uveitis induced by *Encephalitozoon cuniculi*.

Résumé

L'uvéïtis phacoclastic spontanée chez le lapin c'est une pathologie récemment identifiée. La plupart des cas rapportés en littérature a indiquée la présence d'un micro-organisme intralenticular; il a été identifié par *Encephalitozoon cuniculi*. Les uveïtis lente-induit chez les animaux domestiques sont fréquemment indiquées et elles se produisent sous deux formes: phacoclastic et phacolytic. Dans les autres espèces sauf le lapin la rupture est généralement associée au trauma. Les auteurs ont examinés seize lapins avec des pathologies ophtalmiques et décrivent onze cas cliniques d'uveïtis phacoclastic suspecte induit par *Encephalitozoon cuniculi*.

IL VANADIO: DISTRIBUZIONE TISSUTALE A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE CRONICA NEL SUINO

VANADIUM: TISSUE DISTRIBUTION AFTER CHRONIC ADMINISTRATION IN THE PIG

G. Delbono¹, A. Fusari¹, A. Ubaldi¹, A. Bonomi², E. Bignetti³

Parole chiave: vanadio, suino, tossicità, distribuzione tissutale.

Key words: vanadium, pig, toxicity, tissue disposition.

RIASSUNTO

Il vanadio è un elemento di dubbia essenzialità per gli organismi viventi ed è diventato un importante metallo emergente nell'ambiente. Negli ultimi decenni è stato osservato un incremento dei livelli di vanadio nell'ambiente aereo a causa di sorgenti antropogeniche. Il vanadio è un inquinante potenzialmente tossico che può produrre effetti pericolosi per gli organismi viventi. Questa ricerca studia la distribuzione di vanadio in alcuni organi del suino dopo supplementazione cronica dell'elemento nella dieta. Due gruppi di maiali sono stati trattati con differenti livelli di V_2O_5 nel mangime, mentre un altro gruppo costituiva il controllo. Campioni di sangue, plasma, fegato, milza e rene sono stati analizzati tramite GF-AAS. Le concentrazioni di vanadio sono risultate rilevabili nel fegato, nella milza e nel rene, mentre negli altri tessuti erano al di sotto del limite di quantificazione. I risultati mostrano che le concentrazioni di vanadio, per effetto del trattamento, aumentano in tutti gli organi. Nei suini del gruppo di controllo, il più alto valore medio è risultato quello del fegato con 63,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di vanadio; nei gruppi di suini trattati, le concentrazioni sono invece risultate di 74,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e di 103,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nel rene la media delle concentrazioni di vanadio per il gruppo di controllo è stata di 22,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mentre per i due gruppi di suini trattati è aumentata a 142,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ed a 147,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nella milza i valori medi sono stati di 51,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per il gruppo di controllo, di 57,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e di 69,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per i gruppi trattati. Le differenze tra i gruppi sono significative per il fegato ed il rene ma non per la milza. Non sono state evidenziate correlazioni significative tra le concentrazioni di vanadio nei tre organi.

SUMMARY

Vanadium is a doubt essentiality metal for living organisms and has become an increasingly important environmental metal. In the last decades an increase of vanadium levels in the ambient air is observed, because of the anthropogenic sources. The vanadium is a potentially dangerous chemical pollutant that can produce adverse effects on living organisms. This research studies the distribution of vanadium in some

¹ Sezione di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale - Dipartimento di Salute Animale - Università di Parma

² Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione - Dipartimento di Produzioni animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e sicurezza degli alimenti - Università di Parma

³ Dipartimento di Fisica - Università di Parma

organs after chronic supplementation of vanadium levels in feed. Two groups of pig were treated with different levels of V_2O_5 in the feed, another group of animals was the control. Blood, plasma, liver, spleen, lung, kidney and heart were analysed by GF-AAS. Vanadium levels were detectable only in liver, spleen and kidney, while in the other tissues were below the quantification limit. The results show that vanadium levels increase in all organs in the treated groups. The highest mean value in the control group was in the liver with 63,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of vanadium; in the treated groups the mean value were of 74,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and of 103,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In the kidney the mean of the concentration of vanadium value for the control group was 22,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, but in the treated groups increased at the levels of 142,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 147,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In spleen the mean value were 51,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the control groups, and 57,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 69,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the treated groups. Differences between groups are significant in liver and kidney but not for spleen. They are not significant correlation between vanadium levels in the organs.

INTRODUZIONE

Il vanadio ed i suoi composti si trovano nella crosta terrestre e nelle rocce, in alcuni minerali e nei depositi di petrolio greggio. Il vanadio è un comune componente degli acciai utilizzati nella produzione di macchinari e attrezzature. L'incremento dei livelli di vanadio nell'aria è dovuto principalmente alla combustione dei derivati del petrolio, del carbone ed alle immissioni delle industrie che coinvolgono l'elemento¹.

L'esposizione ad alti livelli di vanadio nell'aria può causare effetti tossici pericolosi al tratto respiratorio, osservati sia nei lavoratori esposti che attraverso studi sugli animali². I composti del vanadio vengono prontamente assorbiti dai polmoni con percentuali del 20-25%, mentre vengono scarsamente assorbiti dall'apparato digerente (0,5%-2% dell'ammontare nella dieta)³. Gli effetti sull'uomo del vanadio ingerito con gli alimenti non sono conosciuti ma numerosi studi hanno evidenziato effetti tossici dei composti del vanadio introdotti nella dieta attraverso l'acqua o gli alimenti¹. Non ci sono evidenze che qualche composto del vanadio sia cancerogeno, anche se per tale valutazione sono disponibili pochi studi adeguati.

Alcuni studi sugli animali hanno suggerito che il vanadio sia essenziale; sulla base di ciò sono state stimate assunzioni giornaliere con la dieta necessarie per prevenire carenze o per fornire azioni benefiche⁴. Per l'uomo, attraverso estrapolazione dagli studi animali, tale livello è di 10 μg , mentre l'assunzione giornaliera con la dieta calcolata è di 10-20 μg di vanadio⁵. Si può ragionevolmente affermare, quindi, che le richieste dell'elemento possono essere pienamente soddisfatte da una dieta normale. Per gli animali da allevamento viene proposta l'integrazione con composti del vanadio degli alimenti zootecnici, allo scopo di prevenire effetti da carenza o per migliorare il metabolismo glucidico e indirettamente quello proteico⁶. Tra gli effetti del vanadio particolare interesse ha assunto quello insulino-simile. Alte concentrazioni di vanadio possono essere presenti nei mangimi, come risultato dell'utilizzo di fosfati con alti contenuti dell'elemento o per l'utilizzo di composti del vanadio come promotori di crescita⁷. Per alcune specie, come quelle aviari, a causa di effetti tossici importanti, il livello massimo tollerabile è fissato a 10 mg/kg di mangime, mentre il vanadio è meglio tollerato dai ruminanti, per i quali viene proposta una concentrazione massima

nella dieta di 50 mg/kg⁸. Numerosi studi hanno evidenziato tossicità riproduttiva e dello sviluppo per questo metallo⁹. Livelli relativamente bassi di vanadio nell'acqua di animali gravidi hanno portato ad anomalie alla nascita¹⁰. Alcuni animali che hanno respirato o ingerito vanadio per un lungo periodo hanno evidenziato alterazioni epatiche e renali. Esperimenti sull'uomo e sugli animali hanno mostrato che il vanadio si accumula principalmente nell'osso, nel rene, nel fegato e nella milza. L'escrezione della frazione assorbita di vanadio è renale, mentre la frazione non assorbita viene eliminata con le feci. La milza è un organo di redistribuzione del vanadio assorbito oltre i livelli normali¹¹.

L'unico caso descritto in letteratura di esposizione prolungata al vanadio, è stato quello di bovini allevati in Svezia che avevano accidentalmente ingerito grandi quantità dell'elemento¹². Gli animali avevano ingerito foraggio contaminato da vanadio, a causa della concimazione dei terreni con Scorie Thomas. Alcune manze sono morte dopo circa un mese, mentre altre sono decedute anche dopo la sospensione dell'impiego di foraggio contaminato. Le analisi hanno evidenziato la presenza di concentrazioni di vanadio elevate negli organi: superiori a 5 mg/kg in fegato e rene e superiori a 1 mg/kg nella milza. La contaminazione accidentale presentava, quindi, sia una fase acuta che una cronica. Le manze, inoltre, sono risultate più influenzate dall'esposizione rispetto alle vacche. Dopo qualche mese tutti i bovini sono stati macellati e sono state eseguite le determinazioni analitiche del vanadio negli organi. Le mediane delle concentrazioni nelle manze erano di 0,224 mg/kg nel fegato, di 0,213 mg/kg nella milza e di 0,058 mg/kg nel rene, mentre nelle vacche i corrispondenti valori erano di 0,012 mg/kg, 0,095 mg/kg e di 0,013 mg/kg. Gli autori hanno osservato che nella prima fase dell'intossicazione cronica l'eliminazione del vanadio attraverso il fegato era più veloce che non quella dalla milza, quindi nei bovini intossicati le concentrazioni in questo organo rimanevano alte, mentre diminuivano nel fegato ed in particolare nel rene. E' probabile che negli animali più giovani il fegato si sovraccarichi di vanadio e che il metallo non venga eliminato facilmente. I segni clinici di danni permanenti, rilevati sui bovini, come una maggiore suscettibilità alle malattie e la depressione della produzione di latte sono spiegabili con gli elevati livelli di vanadio nella milza.

E' probabile, quindi, che perfino concentrazioni relativamente basse di vanadio possano causare disturbi agli animali attraverso effetti cumulativi. L'analisi su bovini di diverse regioni della Svezia ha evidenziato che per il fegato i valori normali, di animali non esposti, sono tra 0,011 e 0,019 mg/kg. In Germania è stato trovato un valore normale per il fegato bovino di 0,015 mg/kg¹². Le conclusioni cui sono giunti i ricercatori svedesi, evidenziano l'importanza della conoscenza dei livelli normali presenti in tessuti e organi e dei livelli negli stessi dopo esposizione a differenti livelli di vanadio.

Queste informazioni sono di fondamentale importanza per la valutazione del rischio per la salute, sia per gli animali che per l'uomo.

La ricerca si propone di studiare la distribuzione del vanadio nei tessuti ed organi del suino, la cui dieta è stata arricchita di pentossido di vanadio. L'allevamento contemporaneo di animali trattati e di soggetti di controllo, permette di confrontare i dati relativi alle analisi dell'elemento nei vari tessuti ed organi e di valutare il profilo di accumulo dopo somministrazione cronica per via orale.

MATERIALI E METODI

Per la sperimentazione che ha avuto una durata di 180 giorni, sono stati utilizzati 15 suini meticci F1 Large White X Landrace di sesso maschile. Gli animali del peso medio di 35 kg, sono stati suddivisi in tre gruppi, stabulati in box e alimentati con mangime commerciale e acqua della rete idrica. I suini del 1° gruppo fungevano da controllo, mentre ai suini del 2° e del 3° gruppo veniva somministrato mangime addizionato di V_2O_5 , con concentrazioni di vanadio di 5 mg/Kg e di 10 mg/kg, rispettivamente.

Prima della macellazione è stato prelevato il sangue ed il peso vivo medio era intorno ai 160 kg. Dopo il sacrificio sono stati prelevati il fegato, la milza, il polmone, il rene ed il cuore. I campioni sono stati conservati a -18°C , fino alla fase di preparazione per l'analisi. La mineralizzazione, è avvenuta per via secca con l'incenerimento di una quantità pari a circa 5 g di campione. Le ceneri sono state dissolte con una soluzione allo 0,5% di acido solforico su piastra riscaldata e, dopo il recupero, sono state portate al volume di 2-4 ml.

L'analisi è stata condotta con uno Spettrofotometro di Assorbimento Atomico Shimadzu equipaggiato di atomizzatore elettrotermico, secondo una metodica precedentemente pubblicata¹⁴.

Il metodo di preparazione e le condizioni operative hanno permesso le determinazioni in fegato, rene e milza, mentre i livelli di polmone e cuore erano al di sotto del limite di quantizzazione (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). La rilevazione del vanadio nel sangue, che richiede metodi molto più sensibili, non è stata al momento eseguita.

I dati sono stati elaborati statisticamente tramite programma SPSS.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nelle tabelle 1 e 2 vengono riportati i risultati sperimentali d'analisi.

Gruppo	n. suino	Fegato ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Milza ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Rene ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	1	61,9	61,3	19,2
	2	52,6	32,0	20,7
	3	55,6	58,7	18,3
	4	44,0	51,6	21,9
	5	102,6	53,2	33,0
	6	70,4	48,8	125,0
2	7	86,8	87,0	74,1
	8	73,1	35,3	217,5
	9	68,1	40,4	230,9
	10	74,3	75,3	62,7
	11	94,9	57,5	77,6
3	12	92,0	56,7	86,6
	13	101,9	71,8	199,3
	14	82,4	108,0	231,9
	15	145,5	52,0	144,2

Tabella 1: Concentrazioni di vanadio nei singoli suini.

GRUPPO	Fegato ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Milza ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Rene ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	63,3 \pm 22,9	51,3 \pm 11,5	22,6 \pm 6,0
2	74,5 \pm 7,3	57,4 \pm 22,7	142,0 \pm 78,7
3	103,3 \pm 24,6	69,2 \pm 22,9	147,9 \pm 67,9

Tabella 2: Medie e deviazione standard per i tre gruppi.

Nella Figura 1 i dati vengono rappresentati graficamente.

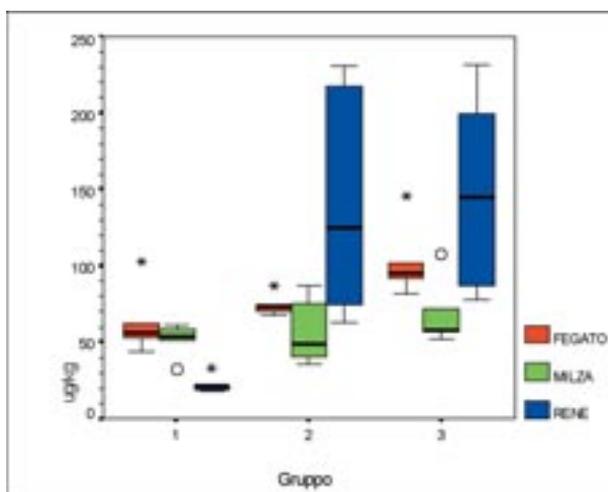


Figura 1: Rappresentazione “Box plot” dei dati.

Nella tabella 3 con l’analisi della varianza vengono messe in evidenza le differenze tra i gruppi.

Organo	F	Sig.
Fegato	5,405	0,021
Milza	1,060	0,377
Rene	6,922	0,010

Tabella 3: Significatività delle differenze tra i gruppi.

Nelle tabelle 4 e 5 sono riportati i confronti multipli con il test “post hoc” Waller-Duncan.

Gruppo	Sottoinsieme	
	1	2
1	X	
2		X
3		X

Tabella 4: Sottoinsiemi omogenei per il fegato ($\alpha=0,05$).

Gruppo	Sottoinsieme	
	1	2
1	X	
2		X
3		X

Tabella 5: Sottoinsiemi omogenei per il rene ($\alpha=0,05$).

Da queste elaborazioni, emerge che per il fegato il gruppo con la somministrazione di vanadio più elevata appartiene ad un sottoinsieme diverso rispetto agli altri due gruppi. Probabilmente oltre un certo livello del metallo l'organo non riesce a provvedere ad un'eliminazione efficace. Per il rene, i gruppi degli animali trattati appartengono ad un sottoinsieme diverso rispetto al gruppo di controllo e questo evidenzia che l'organo è la sede di accumulo del vanadio assorbito oltre i livelli fisiologici. Per la milza le differenze tra i gruppi non sono significative.

Abbiamo poi eseguito l'analisi delle correlazioni di Pearson tra le concentrazioni nei tre organi per tutti gli esemplari. Non sono emerse significatività elevate ($p<0,05$), ma il dato non può essere considerato definitivo per l'esiguità del campione analizzato. Tuttavia, la stessa analisi effettuata per gruppi, evidenzia che per il gruppo 1 i livelli di vanadio del fegato e quelli del rene sono correlati positivamente ($p=0,049$), mentre per il gruppo 2 si osserva una correlazione negativa tra le concentrazioni di vanadio nella milza e quelle nel rene ($p=0,034$).

Per effettuare considerazioni sulle dosi di vanadio somministrate, abbiamo calcolato per ogni gruppo di suini le ingestioni giornaliere e le ingestioni giornaliere per kg di peso corporeo. Dall'analisi chimica del mangime di base non addizionato, è emersa una concentrazione di vanadio pari a 0,71 mg/kg, mentre i mangimi addizionati avevano concentrazioni di 8,6 mg/kg (2° gruppo) e di 15,2 mg/kg (3° gruppo). Sulla base di questi dati, considerando il peso vivo medio alla macellazione di 160 kg ed ipotizzando che un suino ingerisca giornalmente 3,5 kg di mangime, le ingestioni di vanadio sono quelle riportate in Tabella 6.

Gruppo	Concentrazione nel mangime (mg/kg)	Ingestione giornaliera (mg/d)	Ingestione giornaliera (mg/kg b.w./d)
1	0,71	2,49	0,016
2	8,6	30,1	0,188
3	15,2	53,2	0,333

Tabella 6: Concentrazioni di vanadio nel mangime ed ingestioni giornaliere per i tre gruppi.

Dalle osservazioni effettuate durante la sperimentazione sullo stato di salute degli animali non sono state registrate deviazioni dalla norma.

Alcuni studi riportati in letteratura hanno riguardato l'utilizzo di pentossido di vanadio nella dieta. Per i ratti livelli di 2000 mg/kg di vanadio somministrati attraverso questo sale portano alla morte¹. Studi di tossicità cronica con il pentossido di vanadio, somministrato ai ratti attraverso la dieta con livelli di supplementazione di

10 mg/kg e 100 mg/kg, come effetti hanno evidenziato soltanto una riduzione dei livelli di cisteina. Da questi studi sono stati ricavati i N.O.A.E.L. (No Observed Adverse Effect Level) e per il ratto un NOAEL di 10 mg/kg di vanadio nella dieta corrisponde ad un'ingestione di 0,9 mg/kg b.w./d². Altri studi di tossicità cronica su ratti gravidi che hanno utilizzato metavanadato di sodio corrispondenti a 2,1 mg/kg b.w./d di vanadio hanno portato ad effetti avversi sui nascituri¹⁵. Questo livello di vanadio, pertanto, viene considerato il L.O.A.E.L. (Lowest Observed Adverse Effect Level) ed è stato utilizzato per calcolare un limite massimo giornaliero raccomandato per l'uomo. Il risultato, di 0,1mg/d di vanadio, è stato ottenuto tramite la divisione per un fattore di incertezza che tiene conto dell'estrapolazione degli studi dall'animale all'uomo e delle differenze nella sensibilità umana⁶.

Negli studi sull'uomo è stato accertato che livelli fino a 0,3 mg/kg b.w./d non portano ad effetti avversi¹⁶. Pertanto, i livelli somministrati ai suini del 3° gruppo di 0,333 mg/kg b.w./d verosimilmente non hanno provocato effetti tossici. Tuttavia, il livello di assunzione giornaliera di vanadio per i suini è particolarmente alto anche per il gruppo di controllo (2,49 mg/d), se raffrontato a quello di 0,1mg/d raccomandato per l'uomo. Ciò non è spiegabile unicamente con le differenze nelle quantità di alimento assunte, ma piuttosto con i diversi contenuti di vanadio degli alimenti umani rispetto ai mangimi commerciali per suini. I cereali e derivati, che sono tra gli alimenti più ricchi di vanadio, hanno concentrazioni dell'elemento intorno a 0,010 mg/kg, valore notevolmente inferiore a quello di 0,71 mg/kg rilevato nel mangime per i suini di controllo di questa sperimentazione¹.

Per quanto riguarda le concentrazioni di vanadio negli organi, quelle più elevate sono state rilevate nei reni degli animali trattati, mentre quelle più basse in assoluto erano quelle dei reni degli animali del gruppo di controllo. Il vanadio assorbito, infatti, viene escreto tramite il rene ed alti contenuti di vanadio sono stati trovati in questo organo sia in seguito alle dosi di esposizione che alla somministrazione protratta¹.

Per la milza, per i gruppi di suini trattati si osserva un debole aumento delle concentrazioni, anche se, come osservato in precedenza, non significativo. In alcuni studi è stato osservato un aumento dei livelli in questo organo come risultato della redistribuzione del vanadio tra gli organi, dopo somministrazione cronica¹⁷. La milza è ricca di ferritina, importante per lo scambio di vanadio con la transferrina e quindi per la ritenzione del metallo. Le concentrazioni trovate nell'organo sono relativamente elevate anche nel gruppo di controllo e tali da indicare la possibilità di un'esposizione cronica al vanadio attraverso un normale mangime commerciale.

Per il fegato, le concentrazioni di vanadio nei gruppi dei suini trattati sono più elevate rispetto a quelle dei controlli, in particolare per il gruppo con la dose di somministrazione più elevata. Da notare che per il gruppo di controllo i livelli di vanadio più alti, tra i diversi organi, sono quelli del fegato. Questo organo, anch'esso ricco di ferritina, è luogo di accumulo privilegiato per il vanadio assorbito e spesso nei mammiferi terrestri troviamo nel fegato le concentrazioni più elevate del metallo.

I livelli di vanadio, riscontrati nei tre organi dei suini del nostro studio, sono più bassi rispetto a quelli dei bovini svedesi esposti accidentalmente, ma sono più alti rispetto a quelli considerati normali per il bovino.

Nell'ottica di indicare i livelli basali tissutali del vanadio per la specie suina

è utile ricordare che esistono alcune importanti differenze fisiologiche tra le due specie animali. La diversità osservata nei riscontri analitici non rappresenta di per sé un dato di raffronto, per cui i risultati della presente ricerca costituiscono al momento l'unico riferimento su cui basare i futuri studi di impiego del metallo nell'allevamento suino.

CONCLUSIONI

La somministrazione cronica ai suini di ossido di vanadio a livelli moderatamente alti (5 mg/kg e di 10 mg/kg di vanadio), produce significativi fenomeni di accumulo nel fegato e nel rene. Nella milza, organo considerato bersaglio per l'intossicazione cronica dell'elemento, gli incrementi sono modesti, probabilmente per effetto della concentrazione elevata di vanadio nell'alimento del gruppo di controllo. L'evidenza mostrata in questa ricerca della presenza di livelli di vanadio piuttosto alti nei mangimi commerciali, solleva la necessità di comprendere meglio la problematica dell'essenzialità del vanadio per le specie zootecniche, anche in relazione ai residui presenti nelle derrate alimentari. La constatazione che alcune sostanze minerali utilizzate in zootecnia, sottoforma di integratori, contengano concentrazioni elevate di vanadio, introduce perplessità sugli effetti che tale pratica può provocare. I regimi alimentari su soggetti in allevamento intensivo possono, in varie occasioni, assumere l'aspetto della "forzatura", oltre le richieste fisiologiche.

La necessità di estendere gli studi a carattere metabolico e tossicologico alle specie animali "da reddito", ci ha portato a prospettare altri studi sulla specie suina. Il parallelismo, tracciato in precedenti studi tra gli effetti del metallo negli animali e nell'uomo, dimostra, anche in questo caso, come le sostanze ad attività tossica possono assumere la caratteristica della specie-specificità. Al fine dell'indicazione di concentrazioni normali di vanadio per gli organi delle varie specie zootecniche è di fondamentale importanza tener nella dovuta considerazione le differenze metaboliche e fisiologiche, nonché considerare le diverse composizioni degli alimenti zootecnici.

Questa ricerca, inoltre, indica che per ulteriori studi è importante disporre di diete con livelli di vanadio normali e che le indagini sui livelli di accumulo devono essere estesi su numerosi organi e tessuti attraverso la messa a punto di metodiche accurate e sensibili.

I dati inerenti i parametri ematici e le analisi anatomo-patologiche, unitamente alle determinazioni analitiche, possono offrire una panoramica più esauriente sugli effetti cronici delle basse dosi per tempi prolungati, la situazione più comune considerata la potenzialità attribuita ai composti del vanadio di essere delle sostanze tossiche emergenti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) WHO. Vanadium. Environment Health Criteria. 81. IPCS International Program on Chemical Safety. WHO, Geneve, 1988.
- 2) EPA working group (1987) Health effects assessment for Vanadium and compounds. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, U.S.A., PB 88176383.
- 3) ATSDR (1992) Toxicological Profile for Vanadium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Dis-

ease Registry, Atlanta, Georgia.

4) HARLAND B.F., HARDEN-WILLIAMS B.A. (1994) Is vanadium of human nutritional importance yet? *J. Am. Diet Assoc.*, 94, 891-894.

5) UTHUS E.O. and SEABORN C.D. (1996) Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for dietary recommendations of the other trace elements. *J. Nutr.* 126 (Suppl), 2452S-2459S.

6) UNDERWOOD, E.J. (1977) Vanadium. In: *Trace elements in human and animal nutrition*, 4th ed., New York, Academic Press, pp. 388-397.

7) SULLIVAN T.W., DOUGLAS J.H., GONZALEZ N.J. (1994) Levels of various elements of concern in feed phosphates of domestic and foreign origin. *Poult. Sci.*, 73, 520.

8) HENRY P.R., MILES R.D. (2001) Heavy metals-Vanadium in poultry. *Ciencia animal Brasileira* 2(1), 11-26.

9) DOMINGO J.L. (1996) Vanadium: A Review of the reproductive and developmental toxicity. *Reprod. Toxicol.*, 10(3), 175-182.

10) AL-BAYATI M.A., GIRI O.G., RAABE L.S., ROSENBLATT L.S., SHIFRINE M. (1989) Time and dose-response study of the effects of vanadate on rats: morphological and biochemical changes in organs. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 9 (5-6), 435-455.

11) WILLSKY G.R., GOLDFINE A.B., KOSTYNIK P.J. (1998) Vanadium Compounds - Chemistry, Biochemistry and Therapeutic Applications. In: *ACS Symposium Series 711, Tracey and Crans (Eds)*, American Chemistry Society, Washington, 279-296.

12) FRANK A., MADEJ A., GALGAN V., PETERSSON L.R. (1996) Vanadium poisoning of cattle with basic slag. Concentrations in tissues from poisoned animals and from a reference, slaughter-house material. *The Science of The Total Environment*, 181, 73-92.

13) ILLING H., ANKE M., MOLLER M. The vanadium content of animal foodstuffs. In: *M.Anke, D.Meissner, H.Bergmann, Bitsch, W.Dorn, G. Flachowsky, B.Groppel, H.Gurtel, I.Lombeck, B.Luckas, W.Merbach, H.J.Schneider (Eds), Defizite und Uberschusse an Mengen-und Spurenelemente e.V. and 14. Arbeitstagung Mengen-und Spurenelemente. Kongress- und Werbedruck. Gebr. Mugler GmbH, Oberlungwitz, Germany, 1994, p. 260 (ISBN 3-929526-17-4).*

14) DELBONO G., FUSARI A., UBALDI A. Validazione di una metodica di analisi in Spettrrofotometria AA per il vanadio in matrici biologiche. *Atti V Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, Pisa, 20-21 Novembre 2003, pp. 173-174.

15) DOMINGO J.L., PATERNAIN J.L., LLOBET J.M., CORBELLA J. (1986) Effects of vanadium on reproduction, gestation, parturition, and lactation in rats upon oral administration. *Life Sci.* 39(9), 819-824.

16) GOLDFINE A.B., PATTI M.E., ZUBERI L., GOLDSTEIN B.J., LEBLANC R., LANDAKER E.J., JIANG Z.Y., WILLSKY G.R., KAHN C.R. (2000) Metabolic effects of vanadyl sulfate in humans with non-insulin-dependent diabetes mellitus: in vivo and in vitro studies. *Metabolism*, 49,400-410.

17) PARKER R.D.R., SHARMA R.P., OBERG S.G. (1980) Distribution and accumulation of vanadium in mice tissues. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 9, 393-403.

IL VANADIO: ASPETTI CHIMICI E TOSSICOLOGICI

VANADIUM: CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ASPECTS

G. Delbono¹, A. Fusari¹, A. Ubaldi¹

Parole chiave: vanadio, elementi ultratraccia, metalli pesanti, tossicità, inquinamento.

Key words: vanadium, ultratrace elements, heavy metals, toxicity, pollution.

RIASSUNTO

La presenza di numerose ricerche sul vanadio in svariati settori, come quelli dell'ecotossicologia, dell'igiene occupazionale, della biochimica, della clinica tossicologica, riflette la complessa natura chimica di questo metallo.

Il vanadio è un metallo di colore argenteo; è resistente alla corrosione e per la sua durezza e la capacità di formare leghe è un comune elemento delle leghe acciainose, utilizzate nella produzione di macchine e attrezzature. Nei combustibili fossili sono presenti alti livelli di vanadio, di conseguenza la combustione di derivati petroliferi e carbone, aumentata negli ultimi decenni, ha portato ad inquinamento da vanadio dell'aria.

Sorgenti di esposizione occupazionale al vanadio sono la pulizia delle caldaie, la produzione di pentossido di vanadio e molti processi metallurgici. Mentre l'essenzialità dell'elemento per gli organismi viventi deve ancora essere stabilita con certezza, il vanadio è diventato un importante metallo emergente nell'ambiente. Il vanadio è un inquinante chimico potenzialmente pericoloso che può provocare danni alla produttività agricola. L'elemento è presente nei vegetali, specialmente i cereali, ed in tutti i tessuti ed organi animali, anche se a bassi livelli. Il metallo si accumula specialmente nell'osso, nel rene, nel fegato e nel polmone.

Il vanadio interferisce con numerosi processi biochimici ed il suo ruolo fisiologico dovrebbe essere attentamente valutato. Il vanadio penetra la barriera emato-encefalica, è presente nel latte materno e viene trasferito attraverso la barriera placentare. Le informazioni sugli effetti avversi sull'uomo provengono da esposizioni controllate, terapeutiche od occupazionali a concentrazioni che non sono presenti in condizioni normali. I lavoratori esposti possono soffrire di irritazioni agli occhi ed al tratto respiratorio. Gli studi indicano che il vanadio interferisce con il metabolismo del glucosio ed assistiamo ad un certo interesse per l'ipotetica utilizzazione del vanadio come terapia alternativa all'insulina per i pazienti diabetici. Studi recenti hanno indicato che il vanadio possiede proprietà lipoperossidative ed hanno indagato la sua azione sugli organi linfatici.

¹ Sezione di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale - Dipartimento di Salute Animale - Università di Parma.

Numerosi effetti, come quelli sui livelli di colesterolo, sul metabolismo del ferro, sull'ematopoiesi e quelli cancerogeni o mutageni, riportati per il vanadio, richiedono ulteriori ricerche. Altre ricerche hanno evidenziato per il vanadio tossicità riproduttiva e dello sviluppo. Sebbene ci siano stati progressi nelle conoscenze sugli effetti e sul ruolo biologico del metallo negli organismi animali, ci sono poche informazioni sull'esposizione, sul metabolismo e pochi dati sulle concentrazioni tissutali, anche a causa di difficoltà analitiche nella determinazione del vanadio in campioni contenenti bassi livelli dell'elemento. Per la valutazione dell'esposizione degli organismi viventi e del rischio tossicologico dovrebbero, innanzi tutto, essere accertati gli effetti avversi del vanadio sulla salute e stabiliti dei valori di riferimento nei tessuti biologici degli organismi non esposti.

SUMMARY

The waste researches about vanadium in different fields, such as ecotoxicology, hygiene occupational, biochemistry, clinical toxicology, reflects the complex chemical nature of this metal.

Vanadium is a steel-grey, corrosion resistant metal and because of its hardness and its ability to form alloys, is a common component of hard steel alloys used in machine and tools. High amounts of vanadium are present in fossil fuels. The combustion of fuel oils and coal, which has increased in the last decades, yields vanadium air pollution.

Well-known occupational vanadium exposure sources are boiler cleaning, production of vanadium pentoxide and many metallurgic processes. While the essentiality of vanadium for living organisms has yet to be established, the element has become an increasingly important environmental metal. The vanadium is a potentially dangerous chemical pollutant that can play havoc with the agricultural productivity. Vanadium is present in the vegetables, especially in the grains, and, at low level, in all animal tissues and organs. The metal accumulates mainly in bone, kidney, liver and lung.

Vanadium interferes with a multitude of biochemical processes and its physiological role should be carefully assessed. Vanadium penetrates the blood-brain barrier, is present in breast milk and is transferred across the placental barrier. The information about the adverse effects on human beings has been derived from controlled, therapeutic or occupational exposure to concentrations that do not occur under normal conditions. Exposed workers may suffer from irritation of the eyes and the respiratory tract. Studies indicate that vanadium interacts with glucose metabolism and there is interest for the hypothetical utilization of oral vanadium as an alternative therapy to parenteral insulin in diabetic patients. Recent study has indicated that vanadium has lipoperoxidative properties and has investigated on its action on lymphatic organ.

Several reported effects of vanadium need further research, including the effects on cholesterol levels, iron metabolism, haematopoiesis, carcinogenic and mutagenic effects. Many researches studied the reproductive and developmental vanadium toxicity. Although progress have been made in knowledge about effects and biological role of the metal in animal organism, there are few information with re-

spect to exposure, metabolic and analytical data also because analytical problems in the determination of vanadium in samples containing low levels of the element. For the evaluation of human exposure and its toxicological risks the assessment of adverse effects of vanadium on health should be scrutinized and vanadium reference values in biological tissue for non-exposed organism should be established.

PROPRIETA' CHIMICHE E FISICHE DEL VANADIO

L'elemento è stato scoperto nel 1830 da Nils Sefstrom; il nome deriva da "Vanadio", una divinità scandinava. Il vanadio è un metallo leggero, duttile, di colore argenteo, molto resistente alla corrosione acida e basica¹.

Il vanadio ha numero atomico 23 e si trova sottoforma di due isotopi naturali ⁵⁰V e ⁵¹V. A temperatura ambiente l'elemento è solido; la temperatura di fusione è di 1890°C ± 10 °C, mentre quella di ebollizione è di 3407°C; la densità è di 5,8 g/cm³. Per quest'ultima proprietà dovrebbe essere considerato un metallo pesante, ma viene più frequentemente definito un elemento ultratraccia.

Il vanadio ha stati di ossidazione che vanno da -1 a +5 ma i più comuni sono +3, +4 e +5. L'elemento si trova legato all'ossigeno come ossianione polimerico caricato negativamente che tende a complessare i leganti polarizzabili, come quelli fosforici e solfurei. La capacità del vanadio di comportarsi come un elemento elettronegativo od elettropositivo, porta alla formazione di una grande varietà di composti. Il vanadio, infatti, come numero di composti chimici che forma, è secondo soltanto al carbonio.

Normalmente l'elemento si trova allo stato pentavalente, stato nel quale in soluzione acquosa è stabile per un ampio intervallo di pH. La formazione di composti isopoli ed eteropoli in soluzione acquosa è la caratteristica più importante del vanadio pentavalente. La tendenza dei composti del vanadio a formare legami V-O-V-O è dovuta all'elettronegatività dell'elemento ed alla sua ibridazione elettronica². La forma commerciale di vanadio più comune è il pentossido di vanadio (V₂O₅), che si dissolve in acqua per dare una soluzione acida giallo pallido, contenente specie di vanadio che fungono da agenti ossidanti. Questo ossido si dissolve negli acidi e forma vanadati con le basi. La riduzione da V⁺⁵ a V⁺⁴ avviene tramite leggeri agenti riducenti.

Lo stato +4 è il più stabile e quasi tutti i composti V⁺⁴ sono derivati da ioni vanadilici (VO₂⁺). Molti di questi complessi sono anionici e pochi sono non-elettroliti. Il V⁺⁴ forma molti penta o esa complessi coordinati, come il vanadil acetilacetato e le porfirine vanadiliche presenti nel petrolio greggio. Il vanadio nello stato di ossidazione +3, (come ad es. in V₂O₃) è basico e si dissolve negli acidi formando ioni verdi esa-idrati. I sali di vanadio⁺³ sono forti agenti riducenti, attaccano lentamente l'acqua con liberazione di idrogeno e produzione di V⁺⁴. Lo ione (V(H₂O)₆)⁺³ è facilmente ossidato a V⁺⁴.

I composti organici del vanadio sono generalmente instabili.

UTILIZZI PRODUTTIVI DEL VANADIO

Il vanadio metallico non si trova in natura. Sono conosciuti più di settanta minerali contenenti vanadio, ma i più importanti dal punto di vista estrattivo sono la vanadinite (Pb₅(VO₄)₃Cl), che contiene il 19% di pentossido di vanadio e la carnotite (K₂(UO₂)₂(VO₄)₂·x 3H₂O). I più estesi depositi di minerali del vanadio sono in Canada,

Finlandia, Perù e Sud Africa³. La vanadinite era utilizzata soprattutto in passato per estrarre il vanadio, mentre attualmente il metallo viene estratto principalmente da minerali ferrosi. La carnotite invece è utilizzata prevalentemente per l'estrazione dell'uranio. L'estrazione di vanadio dai combustibili fossili (ceneri di petrolio e di carbone, sabbie bituminose) è importante in numerosi paesi, tra i quali anche l'Italia. Il vanadio si può anche estrarre dalle scorie che derivano dalla produzione metallurgica di catalizzatori.

I più grandi produttori di vanadio sono la Cina, la Finlandia, il Sud-Africa e gli Stati Uniti. I paesi europei, il Giappone e gli Stati Uniti sono i più grandi utilizzatori di vanadio.

La produzione di vanadio è associata a quella di altri metalli, come ferro, uranio, titanio e alluminio. Per la durezza, la resistenza agli acidi e la capacità a formare leghe, il vanadio è utilizzato nella produzione di ferro-vanadio, una lega d'acciaio duro impiegata nella fabbricazione di macchinari e utensili. L'aggiunta dell'elemento rimuove dall'acciaio le occlusioni di ossigeno e azoto, incrementandone la resistenza alla trazione e l'elasticità³. La maggior parte del vanadio viene utilizzata come additivo per la produzione di acciai speciali al carbonio molto resistenti. La percentuale di vanadio in questi materiali metallici può arrivare al 5%.

Tra gli utilizzi del vanadio nella produzione di materiali metallici non ferrosi si ricordano quelli legati all'industria dell'energia nucleare, quelli dell'industria aeronautica e quelli delle tecnologie spaziali.

Alcuni composti del vanadio hanno impieghi industriali, come il pentossido di vanadio e l'ammonio metavanadato, utilizzati come catalizzatori nell'industria chimica per la sintesi di acido solforico e di plastiche, per l'ossidazione di sostanze organiche, per il cracking del petrolio e per la purificazione dei gas esausti. Il pentossido di vanadio è anche un componente di base per la produzione delle leghe d'acciaio. Piccole quantità di vanadio vengono utilizzate in svariate altre applicazioni, tra le quali si ricordano le produzioni di scambiatori ionici, di composti luminescenti, di gomme sintetiche, di termistori, di commutatori, di colori, di vernici e di vetri.

IL VANADIO NELL'AMBIENTE

Il vanadio si trova nella crosta terrestre in percentuali stimate dello 0,02-0,03%². L'elemento è presente principalmente nel petrolio, nei materiali carboniferi e bituminosi, dove è associato alla frazione pesante. Alcuni depositi petroliferi hanno un alto contenuto dell'elemento.

Il contenuto di vanadio nei suoli varia considerevolmente (3-310 mg/kg) in relazione al tipo di roccia madre che lo origina: le più alte concentrazioni sono state trovate nelle argille e negli scisti. Nelle rocce fosfatiche sono stati trovati livelli di vanadio fino a 6000 mg/kg; ciò può essere importante per le ripercussioni sul contenuto del metallo nei mangimi contenenti fosfati utilizzati in particolare negli allevamenti avicoli⁵. Il vanadio è uniformemente distribuito negli orizzonti del suolo, ma a volte i livelli più elevati si trovano nell'orizzonte A, probabilmente per l'azione delle piante.

I livelli di vanadio nell'acqua dolce possono arrivare a 220 mg/l; le diversità geografiche sono dovute a differenze di piovosità od alla presenza di effluenti industriali. Nell'acqua potabile i livelli dell'elemento sono generalmente inferiori a

10 µg/l, con un range da 1 a 30 µg/l ed una media di 5 µg/l². Nell'acqua il vanadio può esistere sia in forma solubile sia come precipitato. Il vanadio presente in acqua, derivante da deposizioni secche o umide, rientra nell'atmosfera come aerosol di particelle di sali marini generati sulla superficie dell'oceano⁶. I dati del monitoraggio, che mostrano concentrazioni almeno 100 volte più alte nel sedimento rispetto a quelle della soluzione acquosa, indicano che l'elemento può precipitare e accumularsi nei sedimenti.

La maggior parte del vanadio che entra nell'acqua marina risulta essere in sospensione o assorbita sui colloidali, non reagisce chimicamente e passa meccanicamente attraverso l'acqua stessa. Questo fenomeno è evidenziato dalla distribuzione dell'elemento sul fondale marino: il vanadio è in prevalenza sottoforma di sedimento mentre soltanto il 10% è in forma solubile. Le basse concentrazioni nell'acqua marina, indicano che il metallo viene continuamente rimosso dall'acqua; ciò avviene sia per assorbimento sia per processi biochimici effettuati dagli organismi. Il vanadio che si accumula in alcuni organismi planctonici come gli ascidiacei (Phylum Tunicati), gli oloturiani (Phylum Echinodermi) e le alghe marine si concentra nel sedimento quando questi muoiono. Il vanadio dell'acqua può essere assunto e accumulato dai pesci: sono stati trovati fattori di accumulo (BCF) di 365-630 in differenti specie di pesce⁶. Il pentossido di vanadio è sufficientemente solubile nell'acqua da indicare potenzialità per la mobilità dal suolo per lisciviazione, ma è possibile che il fenomeno venga impedito tramite la formazione di complessi chimici tra il vanadio ed i componenti del suolo. Il pentossido di vanadio, inoltre, può venir depositato nel suolo dalla pioggia.

Le sorgenti naturali di emissione aerea di vanadio sono gli aerosol marini e le polveri continentali, mentre le emissioni vulcaniche danno un contributo modesto. Nelle aree rurali più remote i livelli di vanadio sono al di sotto di 1 ng/m³, ma si può arrivare a concentrazioni di 75 ng/m³ nelle aree dove vengono bruciati i combustibili fossili. In questi prodotti, infatti, il vanadio è il principale elemento in traccia e di conseguenza i livelli ambientali di vanadio sono aumentati proprio in relazione al rilascio nell'atmosfera da sorgenti antropogeniche, in particolare il riscaldamento⁷. Il metallo viene immesso nell'ambiente aereo in grandi quantità con la combustione di petrolio grezzo, gasolio, benzina, oli, carbone e lignite. Il vanadio presente nell'aria poi ricade a terra, quindi le concentrazioni dell'elemento nell'atmosfera variano considerevolmente in funzione delle richieste di riscaldamento e delle differenti condizioni climatiche stagionali⁸.

Le concentrazioni tipiche dell'aria urbana variano in un range da 0,25 a 300 ng/m³². Le grandi città possono avere livelli di vanadio medi annuali di 20-100 ng/m³, con concentrazioni marcatamente più alte nel periodo invernale. Assumendo una concentrazione media di 50 ng/m³, circa 1000 ng di vanadio possono entrare giornalmente attraverso il tratto respiratorio.

Le emissioni di vanadio nell'atmosfera vengono prodotte anche nelle aree intorno alle industrie siderurgiche ed alle raffinerie di petrolio, dove i livelli possono arrivare intorno a 1000 ng/m³. La combustione di residui e polveri carboniose nelle zone di estrazione è un'altra sorgente di vanadio nell'atmosfera. Con la distillazione e la purificazione del petrolio greggio la maggior parte del vanadio rimane nei residui, quindi i livelli di vanadio nell'aria possono essere ridotti utilizzando frazioni distillate

del petrolio. I processi di inquinamento in alcune aree petrolifere sono parzialmente associate alla presenza dei composti del vanadio, come nel caso della costa Est del lago Maracaibo in Venezuela: alcune ricerche hanno riportato un'alta incidenza di malformazioni congenite a livello di SNC e questo è stato associato alle attività petrolifere della regione⁹.

L'emissione aerea di vanadio può essere elevata in prossimità dei grandi impianti di produzione di leghe d'acciaio. Il vanadio viene immesso nell'aria durante la rifusione dei rottami di acciaio e la trasformazione dei minerali ferro magnetici e ferro-titanici contenenti vanadio in acciaio. Altre fonti industriali sono l'arrostimento delle scorie vanadiche, le fornaci di fusione del pentossido di vanadio e le fornaci elettriche nelle quali il ferro-vanadio viene fuso. Il vanadio presente nelle emissioni del particolato proveniente dalle attività industriali è stimato essere il 53% di quello totale dell'atmosfera⁷.

Dal punto di vista chimico, l'inquinamento aereo da vanadio è principalmente dovuto al pentossido di vanadio, i cui fumi, a causa del basso punto di ebollizione (690 °C) entrano nell'aria, condensano e formano un aerosol con particelle fino a 2 µm. In alcuni studi è stato documentato sia il trasporto di vanadio di origine antropica sopra aree oceaniche sia l'incremento negli ultimi decenni della presenza del metallo nei ghiacciai europei².

Il vanadio si trova in piccole quantità in tutti i vegetali a concentrazioni di pochi mg/g sul peso secco. In una determinata specie le variazioni nelle concentrazioni, comunque contenute, dipendono dai livelli di vanadio nel suolo, dall'acidità del suolo e dalle condizioni di crescita. I livelli di vanadio sono più bassi nelle porzioni aeree della pianta e non sono correlati ai livelli del suolo⁴. Il vanadio nelle piante è legato a sostanze lipidiche complesse ad alta stabilità che persistono anche dopo la morte delle cellule. Questi lipidi persistono anche nel suolo e sono una sorgente di metalli nelle rocce sedimentarie. In varie specie di piante la relazione proporzionale tra i livelli di ferro e quelli di manganese, rame, titanio, nickel, cromo, cobalto e vanadio decresce nel corso dell'evoluzione ed è meno significativa nelle foglie delle piante superiori.

Il vanadio è presente in tutte le specie animali, ma i livelli più elevati sono stati trovati negli invertebrati marini. Nei mammiferi terrestri i livelli più alti si rilevano nel fegato e nei tessuti scheletrici.

Gli animali che pascolano possono essere esposti a quantità tossiche di vanadio per l'ingestione accidentale di terreno¹⁰. L'utilizzo commerciale nella produzione di mangimi zootecnici del fosfato tricalcico proveniente da depositi di rocce fosfatiche molto ricchi di vanadio può portare a livelli molto elevati nella dieta. Le scorie basiche dell'industria siderurgica, dette anche scorie Thomas, estesamente utilizzate in agricoltura da più di un secolo, hanno alti contenuti di fosforo e calcio, ma contengono impurità metalliche, tra cui il vanadio che può raggiungere anche valori del 10%. Gli effetti tossici dell'ingestione accidentale delle scorie Thomas sono state osservate principalmente per i ruminanti ed alcune di queste intossicazioni sono state attribuite all'attività fortemente basica dell'ossido di calcio, pericolosa quando allo spargimento non segue la reazione con la pioggia, l'umidità o l'anidride carbonica dell'aria. Le ricerche sui contenuti dei tradizionali metalli pesanti come piombo, ferro e mangane-

se per l'attribuzione degli effetti tossici sono state vane e molti casi fatali avvenuti per decenni sono rimasti insoluti. E' probabile che alcune di queste intossicazioni possano essere attribuite al vanadio, specialmente quando i segni clinici erano simili a quelli descritti per l'intossicazione tipica del metallo¹¹.

L'intossicazione da vanadio è considerata un rischio occupazionale industriale. Alte concentrazioni di vanadio nell'aria possono essere presenti nei settori dove vengono effettuate le pulizie delle caldaie per il riscaldamento. In passato è stato accertato che le polveri che derivano da questa operazione possono contenere il 5-17% di pentossido di vanadio ed il 3-10% di altri ossidi del vanadio². Le concentrazioni nella polvere andavano da 50 a 100 mg/m³ ma a volte si è arrivati a 500 mg/m³. Negli impianti industriali moderni i livelli sono usualmente molto più bassi. Un'altra sorgente di esposizione occupazionale è quella conseguente alla produzione di pentossido di vanadio, durante la quale la concentrazione di vanadio nella polvere può variare da 0,1 a 30 mg/m³. Concentrazioni intorno a 0,5- 5 mg/m³ non sono invece insolite nella produzione del vanadio metallico e dei catalizzatori al vanadio. Inoltre molti processi metallurgici coinvolgono vapori contenenti vanadio che condensano per formare aerosol respirabili¹².

Dal punto di vista medico è quindi importante acquisire maggiori conoscenze sui possibili effetti del vanadio sulla salute e dovrebbero essere indagati e stabiliti i valori di riferimento in sangue, siero, urine delle persone occupazionalmente non esposte e utilizzate come base per la valutazione dell'esposizione umana e dei rischi tossicologici¹³.

Dal punto di vista ambientale, il vanadio è stato dichiarato un inquinante potenzialmente pericoloso che può causare effetti devastanti per la produttività delle piante e per l'intero sistema agricolo¹². Il metallo è stato anche segnalato come elemento indicatore dell'inquinamento ambientale urbano, specialmente dell'aria¹⁴.

IL VANADIO NEGLI ALIMENTI E NELLA DIETA

Sebbene la maggior parte degli alimenti contenga basse concentrazioni di vanadio, il cibo e l'acqua rappresentano le principali sorgenti di esposizione per la popolazione umana. Le concentrazioni di vanadio riportate per gli alimenti tendono ad essere più elevate nei primi studi rispetto a quelli più recenti; le differenze sono attribuibili alle diverse tecniche e metodiche analitiche utilizzate.

Si possono rilevare alcune interessanti differenze tra alimenti specifici. Per esempio tra i vegetali i livelli più bassi si trovano nella frutta e negli ortaggi con valori intorno a 1 µg/kg, mentre livelli più alti si riscontrano nei cereali, in particolare la farina ed il pane che possono superare i 10 µg/kg¹⁵. Concentrazioni di vanadio elevate si trovano nei ravanelli, nell'aneto, nel prezzemolo e nel pepe nero². Tra i grassi e gli oli le concentrazioni di vanadio più elevate sono state rilevate nella margarina con 4 µg/kg¹⁵. Le carni di pesce e quelle di pollo hanno concentrazioni di vanadio di qualche decina di µg/kg, più alte rispetto a quelle delle carni suine e bovine. Le uova ed il latte hanno livelli modesti, mentre certi funghi, i crostacei e la birra sono ricchi di vanadio¹⁶. E' stato evidenziato che i processi tecnologici possono incrementare le concentrazioni di vanadio negli alimenti (riso bianco, burro d'arachidi, succhi di frutta, mortadella)¹⁵.

Si stima che la popolazione umana, su base giornaliera, sia esposta a 10-60

$\mu\text{g/d}$ di vanadio, con la dieta che contribuisce per 10-20 $\mu\text{g/d}$. In uno studio, effettuato nel 1979 in cinque località italiane, riguardante l'assunzione quotidiana di vanadio con la dieta, è emersa una media di 10,4 $\mu\text{g/d}$ ¹⁵. L'utilizzo di vitamine, come integratori, può contribuire per 10 $\mu\text{g/d}$ ¹⁷. Non ci sono prove che l'ingestione di vanadio giornaliera a questi livelli porti ad effetti pericolosi per la salute.

Le linee guida nutrizionali più recenti propongono un limite superiore ed un limite inferiore di vanadio nella dieta. I dietisti hanno dibattuto per gli anni se il vanadio sia o meno una sostanza nutriente essenziale per la salute umana. Mentre la carenza di vanadio per gli esseri umani non è stata accertata, l'estrapolazione dagli studi animali indica che la E.D.D.I. (Estimated Daily Dietary Intake) debba essere di 10 $\mu\text{g/d}$, un livello che si crede, ma non si può dimostrare sia quello necessario per assicurare le funzioni fisiologiche. E' inoltre stato stimato un limite raccomandato superiore quotidiano di 100 μg di vanadio, che indica che questo valore non dovrebbe essere oltrepassato "tranne che sotto controllo medico." Una rivisitazione tossicologica del vanadio, basata su un riesame degli studi tossicologici effettuati sugli animali, compresi quelli riguardanti lo sviluppo, ha stabilito un limite superiore stimato di 200 $\mu\text{g/d}$ di vanadio, inteso come livello "di sicurezza" di assunzione per l'uomo. Di conseguenza, il range superiore di esposizione di 100-200 $\mu\text{g/d}$ di vanadio, è da considerare l'intervallo protettivo per i feti in sviluppo, i neonati e le altre fasce sensibili della popolazione. Infatti, le ricerche sull'esposizione degli adulti umani indicano che dosi fino a 0,3 mg/kg di peso corporeo al giorno di vanadio non sono associate ad effetti avversi sulla salute¹⁷.

In U.S.A. il Food and Nutrition Board della National Academy of Sciences ha fissato una L'E.S.A.D.D.I. (Estimate Safe and Adequate Daily Dietary Intake) per il vanadio di 100 $\mu\text{g/d}$ ed alcuni nutrizionisti ritengono utile aggiungere alla lista degli oligoelementi anche il vanadio. Inoltre in U.S.A., il vanadil-solfato è integratore comune utilizzato per aumentare il peso e le prestazioni degli atleti a dosi fino a 60 mg/d¹. Si osserva, però, che per gli elementi ultratraccia con ipotizzate azioni benefiche per l'uomo sulla base di estrapolazioni di studi animali, potrebbe essere fuorviante utilizzare i termini "sicuro" ed "adeguato", ma sarebbe più corretto parlare di A.B.I. (Apparent Beneficial Intake).

Dal punto di vista legislativo non ci sono limiti massimi di vanadio negli alimenti, ad eccezione dell'acqua.

Nel 1997, L'Environmental Protection Agency ha proposto per l'acqua potabile un livello massimo di vanadio raccomandato di 50 $\mu\text{g/L}$ ¹⁸. In Italia, per motivi precauzionali, con decreto del 10/11/99 è stato integrato il D.P.R. 24 maggio 1988 n. 236 in attuazione della direttiva CEE 80/778 (concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano), attraverso l'inserimento di tale valore come concentrazione massima ammissibile. Un ente degli U.S.A., lo E.H.H.A. (Office of Environmental Health Hazard Assessment), non concorda con questo livello ed ha determinato che la concentrazione limite dell'acqua potabile, protettiva per la sanità pubblica, dovrebbe essere di 15 $\mu\text{g/L}$.

In Italia, è presente un elenco che comprende i nutrienti che il Comitato scientifico dell'alimentazione umana ha considerato essenziali, dove il vanadio non è presente; di conseguenza nel nostro paese non sono previsti livelli di assunzione raccomandati con la dieta (L.A.R.N.).

Infine, in relazione agli integratori alimentari, per alcuni elementi come vanadio, nichel, cobalto, boro e stagno, a livello U.E., è in corso un riesame dei dati più recenti della letteratura al fine di una più approfondita valutazione della loro valenza nutrizionale.

RUOLO BIOLOGICO E METABOLISMO DEL VANADIO

Il vanadio è essenziale per la muffa *Aspergillus niger* e per l'alga verde *Scenedesmus obliquus* nella quale svolge un ruolo per la fotosintesi. Il metallo ha effetti sulla crescita anche di alcuni batteri azotofissatori².

Tra gli effetti biologici descritti per il vanadio, il più importante è quello insulino-simile, mentre vengono descritti ruoli biologici nella fosforilazione della tiroxina, nell'assorbimento del potassio, nella riduzione e nell'idrolisi dei trigliceridi e nella degradazione proteica¹⁹.

Negli ultimi decenni le ricerche riguardanti il ruolo biologico del vanadio negli organismi si sono particolarmente estese. Nei primi anni '70 il vanadio è stato prospettato essere un elemento essenziale per polli e ratti e questo ha portato a speculazioni circa la sua essenzialità per l'uomo²⁰. Studi più recenti hanno interpretato questa indicazione come inattendibile ed al vanadio è stato dato un ruolo soltanto in un contesto farmacologico²¹. Alcune ricerche sulla carenza suggeriscono che l'elemento possa essere essenziale per gli animali superiori e l'uomo. In particolare le prove dell'esistenza di un controllo omeostatico, al di sopra di determinate basse concentrazioni di vanadio, suggeriscono che possa essere essenziale per l'uomo²². Tuttavia, poiché le diete di controllo di questi studi contengono quantitativi elevati di vanadio che possono aver dato effetti sconosciuti e per la presenza di interazioni iodio-vanadio, attualmente si considera l'essenzialità del vanadio una questione irrisolta¹³. Il vanadio è probabilmente un elemento in traccia essenziale, anche se la sindrome da carenza nell'uomo deve ancora essere evidenziata con certezza²³.

Gli studi *in vitro* e sugli animali indicano che il vanadato e gli altri composti del vanadio fanno incrementare l'attività di trasporto del glucosio¹. Il vanadio regola l'azione dell'insulina, responsabile del trasporto di aminoacidi e glucosio all'interno delle cellule muscolari. Evidenze epidemiologiche e di laboratorio hanno suggerito che il vanadio può giocare un ruolo nella prevenzione dell'infarto ed è stato accertato che le morti per questo disturbo sono più basse nei paesi in cui c'è più vanadio nell'ambiente²⁴.

I polmoni assorbono bene i composti solubili del vanadio (V_2O_5), mentre l'assorbimento dei sali di vanadio dal tratto gastrointestinale è basso. L'assorbimento dei composti del vanadio tramite la pelle è estremamente limitato.

Il vanadio assorbito viene trasportato dal sangue, prevalentemente legato alle transferrine del siero. In presenza di alcuni fattori biologici nel plasma e nel citoplasma, avviene un lento scambio del vanadio tra transferrina e ferritina. La forma pentavalente, il vanadato (VO_3^- , V^{+5}), predomina nei fluidi corporei extracellulari mentre la forma tetravalente, il vanadil (VO^{+2} , V^{+4}), è la più comune forma intracellulare². Le specie chimiche di vanadio che entrano nelle cellule sono in relazione a quelle presenti nell'ambiente. I liquidi extracellulari con il loro contenuto, così come i compartimenti intracellulari, possono influenzare le specie di vanadio che alla fine interagiscono con

i costituenti cellulari per produrre effetti avversi.

Il vanadato che entra nelle cellule viene ridotto a vanadio tramite il glutatione ed altri agenti e stabilizzato da numerosi leganti, come proteine, aminoacidi, acidi nucleici, fosfati, fosfolipidi, glutatione, citrato, ossalato, lattato e ascorbato²⁵. Sia le forme vanadiliche che quelle vanadiche hanno mostrato di manifestare molti effetti insulino-simili in varie cellule.

Il vanadio si lega fortemente al citoplasma, al nucleo ed ai mitocondri. Negli esperimenti con chelanti questi legami sono stati trovati in particolare nella milza, organo ricco di ferritina, così come nella matrice ossea, nel fegato, nel rene, nella mucosa intestinale e nei testicoli. La presenza di ferritina è quindi importante per la ritenzione del vanadio insieme alla capacità del vanadio di legare i fosfati organici. Il vanadato essendo un analogo del fosfato si accumula nell'osso e nei denti².

Negli esperimenti effettuati attraverso la somministrazione di vanadio si è osservato che a livelli di escrezione normale le concentrazioni negli organi decrescono fino a livelli residuali e con velocità di escrezione che rallentano lentamente. Nel caso dell'osso l'ammontare della frazione residua è dose-dipendente: più si eccede rispetto al livello di equilibrio più aumenta questa frazione. L'eliminazione attraverso la milza avviene specialmente per la frazione residua¹¹.

Il vanadio si accumula, oltre che nell'osso, nel rene, nel fegato e nel polmone, organi nei quali può arrivare a livelli di qualche decina di $\mu\text{g}/\text{kg}$ ²; piccole quantità sono state trovate nella placenta, nella saliva e nel latte materno. L'elemento può oltrepassare la barriera emato-encefalica. I livelli di vanadio nel sangue dell'uomo, come risulta dagli studi meno recenti sono molto variabili; la maggior parte degli studi più recenti riporta livelli al di sotto di $10 \mu\text{g}/\text{l}$, ma viene indicato, in assenza di valori di riferimento, che valori normali per sangue e siero siano intorno a $0,05 \mu\text{g}/\text{l}$ ¹³.

L'accumulo del vanadio nell'organismo dipende dalla specie, dall'età, dal composto del vanadio, dalla dose e dalla durata dell'esposizione. Negli animali giovani l'assorbimento intestinale è alto a causa della permeabilità non selettiva della barriera intestinale in via di sviluppo. Con il procedere dell'età le concentrazioni epatiche di vanadio rimangono costanti, ma nel rene crescono in concomitanza con i livelli di assorbimento e di escrezione più bassi. Alti contenuti di vanadio sono stati trovati nel rene associati all'esposizione acuta od alla somministrazione protratta nel tempo. Le concentrazioni negli organi e nei tessuti sono influenzate fortemente dal tempo trascorso dalla somministrazione: quando questa cessa l'eliminazione dagli organi continua e le concentrazioni in sangue, urine e rene diminuiscono. Un aumento dei livelli di vanadio si osserva nella milza come risultato della redistribuzione dell'elemento tra gli organi. In alcuni studi sull'uomo è stato osservato che nel polmone i livelli di numerosi metalli, compreso il vanadio, aumentano con l'età e ciò indicherebbe accumulo dei composti insolubili.

Al termine dell'esposizione, il vanadio viene eliminato prima nelle forme diffusibili, quindi con le frazioni residue dopo riequilibrio con la transferrina; infine viene escreto tramite il rene, la principale via di escrezione per la frazione dell'elemento assorbita. Nell'uomo l'escrezione renale è rapida con tempo di semivita biologica di 20-40 ore nelle urine¹. Le concentrazioni normali dell'elemento nelle urine sono intorno a $0,5 \mu\text{g}/\text{l}$, ma nei lavoratori esposti i livelli aumentano di decine di volte¹³. Il vanadio

ingerito che invece non viene assorbito è eliminato con le feci.

TOSSICITA' DEL VANADIO

In generale la tossicità dei composti del vanadio è bassa, con aumento in relazione all'incremento della valenza: i composti pentavalenti, infatti, sono quelli più tossici¹. Sia i composti vanadici che quelli vanadilici, possono causare svariati effetti tossici nei mammiferi, anche a basse dosi per un lungo periodo. Gli ossidi di vanadio, come già evidenziato, possono causare effetti pericolosi per l'uomo.

I principali effetti osservati della tossicità del vanadio sono: alterazioni ematologiche, alterazioni renali, alterazioni del sistema immunitario, mutagenicità, danni alla sfera riproduttiva e danni allo sviluppo. Gli effetti tossici sono in gran parte la conseguenza delle marcate proprietà ossidative del metallo. Una correlazione diretta è stata trovata tra l'estesa perossidazione lipidica e gli effetti epatotossici e neurotossici. Sono stati riportati effetti tossici del vanadio cumulativi ed un'alta sensibilità al vanadio dei tessuti linfatici. Gli effetti tossici delle basse dosi ripetute di vanadato alla matrice ossea portano ad anemia, linfotossicità e riduzione della risposta immunitaria.

Sono stati descritti numerosi sintomi della tossicità del vanadio, sia per l'uomo che per gli animali: inappetenza, diarrea nera, letargia, disidratazione, aborti spontanei, lesioni polmonari, congiuntiviti, depressione nervosa, scoordinamento degli arti, paralisi facciale, anemia e aumento del rischio di cancro al polmone.

I più comuni effetti tossici dei composti del vanadio portano ad irritazioni locali degli occhi ed alle alte vie respiratorie piuttosto che tossicità sistemica. Per l'uomo, l'effetto tossico più documentato dell'esposizione alla polvere di vanadio è l'irritazione del tratto respiratorio superiore con riniti, respiro affannoso, emorragia nasale, congiuntivite, tosse, mal di gola e dolore di petto. A dosi di esposizione elevate si può arrivare ad effetti broncospastici, e ciò può essere di estremo interesse per le popolazioni che sono a contatto con alto inquinamento dell'aria. Una ricerca ha descritto un inizio d'asma dopo una pesante esposizione ai composti del vanadio, ma gli studi clinici non hanno rilevato un incremento della prevalenza dell'asma nei lavoratori esposti al vanadio¹.

Sebbene non ci siano evidenze dirette sui livelli tossici per l'esposizione continua, fonti britanniche riportano una relazione statistica tra concentrazioni di vanadio nell'aria inquinata di aree urbane e rurali e l'incidenza di cancro al polmone, bronchiti e polmoniti²⁶. Non sono stati riportati effetti pericolosi dell'esposizione alle polveri di vanadio per SNC, sistema gastrointestinale e sangue. Il vanadio ed i suoi composti inalati vengono escreti con le feci e le urine.

In pratica tutte le informazioni sugli effetti avversi del vanadio sulla salute umana derivano dall'esposizione occupazionale a concentrazioni solitamente molto più alte rispetto a quelle presenti per la popolazione generale.

Gli effetti neurotossici del vanadio sono: difficoltà di movimento delle labbra, disturbi motori, convulsioni, asfissia, atassia grave, letargia e diarrea.

Relativamente agli effetti su riproduzione, gestazione e lattazione, è stato stabilito che il grado di tossicità dipende da una serie di fattori come la forma chimica, lo stato di ossidazione, la quantità di vanadio, la via di esposizione ed il periodo di

dosaggio²⁵. Mentre mancano informazioni sulla tossicità riproduttiva del vanadio in seguito ad inalazione, il metallo dimostrato di essere un tossico riproduttivo ed embriofetale quando somministrato oralmente. In uno studio sulle femmine di ratto diabetiche e gravide il vanadato influenza negativamente la capacità riproduttiva e la capacità di portare a termine la gravidanza, perciò l'uso del composto viene controindicato. Il vanadio attraversa la membrana placentare del gatto e quando somministrato per via intraperitoneale ha effetti embriotossici e teratogeni. Le scarse evidenze degli effetti gonadotossici e spermatotossici richiedono conferma.

Gli effetti tossici sono stati osservati soltanto a livelli notevolmente più elevati di quelli che normalmente vengono ingeriti con la dieta dell'uomo, quindi sembra che il vanadio non conduca a rischi di effetti pericolosi per la salute nella popolazione che vive in condizioni normali di esposizione nutrizionale ed ambientale. Tuttavia, gli studi sugli animali non possono riprodurre fedelmente le situazioni di esposizione a basse dosi per periodi prolungati.

Alcune ricerche riportano correlazioni tra alti livelli nel siero e sindromi depressive o disfunzioni renali². Numerosi effetti riportati per il vanadio, per esempio quelli sui livelli di colesterolo, sull'ematopoiesi o gli effetti cancerogeni e mutageni, richiedono ulteriori investigazioni. Nessun incremento nel numero di tumori è stato osservato negli studi animali di lungo termine con esposizione al vanadio nell'acqua potabile. Il Department of Health and Human Services, l'International Agency for Research on Cancer e l'Environmental Protection Agency (EPA) non hanno classificato il vanadio come un carcinogeno umano.

Relativamente al settore zootecnico, nel 1990 in una regione della Svezia, si è verificato un grave caso di intossicazione che ha coinvolto centinaia di bovini. Gli animali avevano pascolato e si erano alimentati con foraggio proveniente da un terreno fertilizzato in superficie con scorie d'altoforno contenenti il 3% di vanadio¹¹. I sintomi comprendevano progressivamente inappetenza, diarrea nera, letargia, disidratazione, aborti spontanei, lesioni polmonari, congiuntiviti, disturbi neurologici, scoordinamento degli arti, paralisi facciali e morte.

Infine, l'acido ascorbico sembra essere il più rapido ed efficace antidoto per l'intossicazione sperimentale da vanadio²².

CONCLUSIONI

L'incompletezza dei dati sperimentali in possesso del mondo medico-scientifico, mette in evidenza l'attualità degli studi sul vanadio, elemento per il quale assistiamo ad una crescente diffusione ambientale. La problematica dell'essenzialità intrecciandosi a quella della tossicità fa assumere grande interesse alla conoscenza dei livelli presenti nella dieta e di quelli tissutali per questo elemento ultratraccia.

Le informazioni raccolte in questa ricerca e la loro discussione costituiscono la base per studi che abbiamo intrapreso dapprima con la messa a punto di una metodica analitica per la determinazione del vanadio nelle matrici biologiche ed in seguito sulla presenza dei livelli di vanadio negli organi delle specie zootecniche da reddito.

L'esistenza di alcuni punti critici analizzati, come l'importanza della via di assunzione aerea, la presenza anche soltanto ipotizzata di effetti tossici a carico del

sistema immunitario, di danni alle sfere riproduttive e dello sviluppo, gli effetti cancerogeni, ma soprattutto l'importanza delle basse dosi per tempi prolungati, suggerisce la necessità di studi di monitoraggio dell'elemento nell'ambiente urbano. Le città, infatti, possono essere interessate da un'importante ricaduta di ossidi di vanadio, presenti nelle frazioni più piccole delle polveri sottili. In questo senso è interessante la possibilità per i ricercatori del settore veterinario, zoologico ed ecologico, di studiare la presenza del metallo nei tessuti dei colombi (*Columba livia*). La specie, infatti, presente nell'ambiente urbano in numerose colonie è considerata un buon marcatore biologico dell'inquinamento e nostri precedenti studi hanno evidenziato che nei tessuti dei colombi di città sono rilevabili vari metalli, compresi quelli considerati tossici.

Le osservazioni sperimentali che ne scaturirebbero, potrebbero rappresentare un corredo di conoscenze utile nello studio della cinetica dell'inquinamento dei centri urbani ed un contributo per la valutazione dell'efficacia delle misure di riduzione dell'inquinamento nelle città. La presenza di vanadio si somma a quella di altri metalli e sostanze pericolose per la salute ed esprime con esse possibili casi di sinergismo, il cui studio è di estremo interesse sia per il settore medico e veterinario, sia per quello dell'ecotossicologia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BARCELOUX D.G. (2000) Vanadium. *Journal of Clinical Toxicology*, 38(7), 813.
- 2) WHO. Vanadium. *Environment Health Criteria*. 81. IPCS International Program on Chemical safety. WHO, Geneve, 1988.
- 3) SYMANSKI H.J. *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety*. 1983, Vol.2 pp 2240-2241.
- 4) BERTRAND D. (1950) Survey of contemporary knowledge of biochemistry. II. The biogeochemistry of vanadium. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 94(7), 407-455.
- 5) ROMOSER G.L., LOVELESS L., MACHLIN L.J., GORDON R.S. (1960) Toxicity of vanadium and chromium for the growing chicken. *Poult. Sci.* 39, 1288.
- 6) U.S. EPA (1987) *Health Effects Assessment for Vanadium and Compounds*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, Ohio. EPA/600/8-88/061.
- 7) HOPE B.K. (1994) A global biogeochemical budget for vanadium. *The Science of the Total Environment*, 141, 1-10.
- 8) SOLDI T., RIOLO C., ALBERTI G., GALLORINI M., PELOSO G.F. (1996) Environmental vanadium distribution from an industrial settlement. *The Science of the total Environment*, 181, 45-50.
- 9) TUDARES C. (1998) Physical and chemical properties of vanadium and its compounds. *Invest. Clin.*, 39 Suppl 1, 3-16.
- 10) THORNTON I. Biogeochemical and soil ingestion studies in relation to the trace element nutrition of livestock. In: W.G. Hoekstra, J.W. Suttie, H.E. Ganther and W. Mertz (Eds) *Trace element metabolism in animals-2*. University Park press, Baltimore. Butterworths, London, 1974, pp. 451-454.
- 11) FRANK A., MADEJ A., GALGAN V., PETERSSON L.R. (1996) Vanadium poisoning of cattle with basic slag. Concentrations in tissues from poisoned animals and

from a reference, slaughter-house material. *The Science of The Total Environment*, 181, 73-92.

12) CLAYTON G.D. CLAYTON F.E. In: *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, vol 2A, 3rd ed., Wiley, New York, 1981, p. 2013.

13) SABBIONI E., KUÈERA J., PIETRA R., VESTERBERG O. (1996) A critical review on normal concentrations of vanadium in human blood, serum, and urine. *The Science of The Total Environment*, 188, 49-58.

14) LANGARD S., NORSETH T. In: Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. (Eds), *Handbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier, Amsterdam, 1986.

15) MYRON D.R., GIVAND S.H., NIELSEN F.H. (1977) Vanadium content of selected foods as determined by flameless atomic absorption spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 25(2), 297-299.

16) BYRNE A.R., KOSTA L. (1978) Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Science of the Total Environment*, 10, 17-30.

17) O.E.H.H.A. Proposed action level for Vanadium, California, 24 August 2000.

18) U.S. EPA Health Effects Assessment Tables, FY 1997 Update. Office of Solid Waste and Emergency Response, U.S. Environmental Protection Agency. 9200.6-303 (97-1), EPA 540-R-97-036, July 1997.

19) DOMINGO J.L. (1996) Vanadium: A Review of the reproductive and developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*, 10(3), 175-182.

20) HOPKINS L.L., MOHR H.E. The biological essentiality of vanadium. In: W. Mertz and W. Cornatzer (Eds), *Newer Trace Elements in Nutrition*, Marcel Decker, New York, 1971, pp. 195-213.

21) NECHAY B.R., NANNINGA L.B., NECHAY P.S.E., POST R.L., GRANTHAM J.J. MACARA I.G., KUBENA L.F., PHILIPS T.D., NIELSEN F.H. (1986) Role of vanadium in biology. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 45, 123-132.

22) CREWS M.G., HOPKINS L.L. *Systemic aspects of Biocompatibility*. Vol 1, Williams D.F. Editor, CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, 1981, pp. 179-186.

23) HARLAND B.F., HARDEN-WILLIAMS B.A. (1994) Is vanadium of human nutritional importance yet? *J. Am. Diet Assoc.*, 94, 891-894.

24) SHAMBERGER R.J., GUNSCH M.S., WILLIS C.F., McCORMACK I.J. In: D.D. Hemphil (Eds), *Trace Substances in Environmental Health XII*, University of Missouri, Columbia, 1978.

25) DOMINGO J.L., GOMEZ M., SANCHEZ D.J., LIOBET J.M., KEEN C.L., (1995) Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agent on vanadium accumulation. *Mol. Cell. Biochem.*, 153, 233-240.

26) STOCKS P. (1960) On the relation between atmospheric pollution in urban and rural localities and mortality from cancer, bronchitis and pneumonia with particular reference to beryllium, molybdenum, vanadium and arsenic. *Brit. J. Cancer*, 4, 937.

VALUTAZIONI ELEMENTALI SU MOLLUSCHI TERRESTRI APPARTENENTI AL GENERE *Helix*

Ghidini S.[°], Novelli E.* , Battaglia A.[°], Campanini G.[°], Balzan S.* , Bracchi P.G.[°]

Introduzione

In passato la nostra unità di ricerca si è già occupata delle caratteristiche nutrizionali delle lumache. Particolare attenzione è stata posta nello studio delle componenti lipidiche (Novelli E. et al; 2003). I risultati ottenuti hanno messo in evidenza differenze nel contenuto in proteine e sali minerali soprattutto legate alla specie. Questa ricerca deve essere intesa come un completamento della precedente. Sugli stessi campioni analizzati in passato, infatti, è stato determinato il contenuto in macro e micro elementi.

In particolare sono state determinate le concentrazioni di 31 elementi: calcio (Ca), sodio (Na), potassio (K), zolfo (S), fosforo (P), magnesio (Mg), bario (Ba), rame (Cu), ferro (Fe), stronzio (Sr), zinco (Zn), alluminio (Al), manganese (Mn), boro (B), cromo (Cr), nickel (Ni), rubidio (Rb), molibdeno (Mo), cadmio (Cd), titanio (Ti), piombo (Pb), litio (Li), selenio (Se), scandio (Sc), vanadio (V), cobalto (Co), argento (Ag), zirconio (Zr), lantanio (La), mercurio (Hg), ittrio (Y), berillio (Be) ed arsenico (As). Tali elementi possono essere grossolanamente classificati, in base alle funzioni che svolgono negli organismi viventi, come essenziali (Ca, P, Mg, Fe, Zn, Se, Co, Cu, Mn, Cr, Na, K, S), non essenziali (Li, Rb, Be, Sr, Ba, B, Al, Mo, Zr, Y, Sc, La, Ti) e tossici (Pb, Cd, Hg, As, Ni, V, Ag). Gli scopi del lavoro di ricerca intrapreso erano molteplici e riconducibili alle diverse categorie di elementi.

Per quanto riguarda gli elementi essenziali l'obiettivo primario era quello di creare una base di dati per la compilazione di tabelle nutrizionali. Tali dati, infatti, sono tuttora ignoti nelle lumache. I macro ed i micro elementi essenziali sono sotto controllo fisiologico negli organismi viventi, pertanto sono ipotizzabili differenze tra le diverse specie. Proprio per questo anche la valutazione delle differenze tra le diverse specie appartenenti al genere *Helix* era tra gli obiettivi della ricerca. Importante era poi riuscire a valutare le differenze tra individui allevati ed individui in natura per garantire che gli animali allevati non presentino caratteristiche nutrizionali inferiori agli animali liberi in natura.

Per quanto riguarda gli elementi non essenziali sono state valutate le differenze tra le diverse specie al fine di evidenziare eventuali metabolismi specifici.

Le lumache sono spesso utilizzate per il monitoraggio della contaminazione

[°] Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti. Università degli Studi di Parma; * Centro per la Sicurezza degli Alimenti, via S. Gaetano 74, 36016 Thiene)

ambientale da elementi tossici (biomonitoraggio), per questo le concentrazioni di metalli pesanti sono state usate per la valutazione del grado di contaminazione ambientale delle zone di allevamento.

Anche per quanto riguarda gli elementi tossici era importante valutare le differenze tra individui allevati ed individui in natura dal momento che il ciclo vitale degli animali è diverso. Per tutti gli elementi è stata considerata la possibilità di correlare (tramite tecniche di analisi statistica multivariata) i dati delle concentrazioni con l'origine per costruire strumenti di riconoscimento di origine degli animali a posteriori.

Materiali e metodi

Sono state analizzate lumache appartenenti alle specie *lucorum*, *aspersa*, *pomatia*, *aperta* e *vermiculata* del comune genere *Helix* provenienti da diverse zone del paese (province di Cagliari, Cuneo, Lecce e Verona). Il prodotto era, per la maggior parte, proveniente da raccolta in natura e, per le sole specie *lucorum*, *aspersa* e *pomatia*, è stato analizzato anche prodotto di allevamento. Le lumache sottoposte ad analisi erano opercolate e, ad eccezione dei soggetti della specie *aperta*, di pezzatura relativamente omogenea con peso compreso fra i 12-16 grammi. Queste ultime avevano una pezzatura compresa fra 4 e 5 grammi. Le determinazioni analitiche sono state condotte sulla parte muscolare costituita dal muscolo pedale, testa e porzioni del mantello avendo cura di eliminare, oltre ai visceri, quanta più emolinfa possibile.

Dopo liofilizzazione i campioni sono stati posti in stufa a 105°C per 24 ore. Circa 0,3 g del campione sono stati pesati nei tubi in teflon del mineralizzatore a microonde. 3 ml di acido nitrico al 65% (Romil, Super Purity Acid) e 0,5 ml di perossido di idrogeno (Merk, Suprapur®) sono stati aggiunti al campione. I campioni così preparati sono stati posti in un mineralizzatore a microonde in pressione Milestone 1200 Mega.

Una volta raffreddato a temperatura ambiente il campione mineralizzato è stato portato al volume di 50 ml con acqua bidistillata in matracci tarati ed ivi conservato fino al momento dell'analisi.

Al fine di determinare accuratezza e precisione del metodo analitico è stato utilizzato lo standard Bovine Muscle Powder (Reference Material 8414) prodotto e certificato dal National Institute of Standards and Technology (Canada).

Per la determinazione analitica è stata utilizzata la tecnica della spettrometria di emissione atomica con eccitazione a plasma ad induzione (ICP-AES). È stato utilizzato un ICP sequenziale Jobin Yvon Ultima 2. Il flusso del gas di trasporto era regolato a 12 l/min, la potenza del generatore di radiofrequenza era fissata 1100 W. Le analisi statistiche sono state effettuate tramite il software SPSS 11.0 per Windows.

Risultati e discussione

Le tabelle 1, 2 e 3 presentano il riepilogo delle determinazioni analitiche degli elementi essenziali, non essenziali e tossici effettuate su tutti i campioni di lumache. Al fine di esprimere le concentrazioni sul tal quale è stato considerato un valore medio di umidità dell'80%.

	Ca	Na	K	S	P	Mg	Cu	Fe	Zn	Mn	Cr	Se	Co
media	4480	1620	1390	1360	1200	488	60	24,2	10,7	4,54	0,53	0,05	0,02
dev. st.	1160	456	195	200	274	71,2	58,8	6,76	3,06	12,2	0,64	0,04	0,05
minimo	2220	936	914	960	980	320	12,9	14,1	8,16	1,34	0,03	0,00	0,00
massimo	6720	2720	1750	1706	2320	676	224	36,2	22,2	57,8	2,02	0,18	0,23

Tabella 1: contenuto in elementi essenziali dei campioni di lumache analizzati. Le concentrazioni sono espresse in mg/kg sul tal quale.

	Ba	Sr	Al	B	Rb	Mo	Li	Sc	Ag	Zr	La	Y	Ti	Be
media	111	23,6	5,78	1,05	0,22	0,15	0,06	0,05	0,02	0,02	0,01	0,01	0,10	0,00
dev. st.	63,0	11,5	9,30	1,34	0,16	0,09	0,06	0,03	0,02	0,03	0,05	0,04	0,25	0,00
minimo	5,66	4,74	0,80	0,21	0,01	0,07	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
massimo	206	56,0	35,6	6,72	0,63	0,40	0,19	0,15	0,06	0,16	0,23	0,20	1,07	0,00

Tabella 2: contenuto in elementi non essenziali dei campioni di lumache analizzati. Le concentrazioni sono espresse in mg/kg sul tal quale.

	Ni	Cd	Pb	V	As	Hg
media	0,24	0,10	0,07	0,03	0,00	0,00
dev. st.	0,27	0,13	0,06	0,07	0,00	0,00
minimo	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00
massimo	0,82	0,63	0,25	0,32	0,00	0,00

Tabella 3: contenuto in elementi tossici dei campioni di lumache analizzati. Le concentrazioni sono espresse in mg/kg sul tal quale.

Tramite analisi della varianza e successivo test post hoc di Sheffè sono state ricercate differenze statisticamente significative ($p=0,05$) tra le diverse specie e tra le varie località di provenienza.

Per quanto riguarda le differenze di specie il K risulta minore in *H. aperta*; S, Ba e Cu sono maggiori in *H. lucorum*; il Cr è maggiormente presente in *H. aspersa* ed *H. lucorum*; il Se è maggiore in *H. vermiculata*.

Per quanto riguarda le differenze in base alla provenienza il Ba risulta maggiormente presente negli esemplari di Verona; l'Al è maggiore in quelli di Cagliari; il Rb è maggiore in quelli di Cuneo e Lecce, ed il Se in quelli di Cagliari. I casi in cui si sono verificate differenze significative sono stati rappresentati graficamente tramite istogrammi (figura 1, 2, 3 e 4)

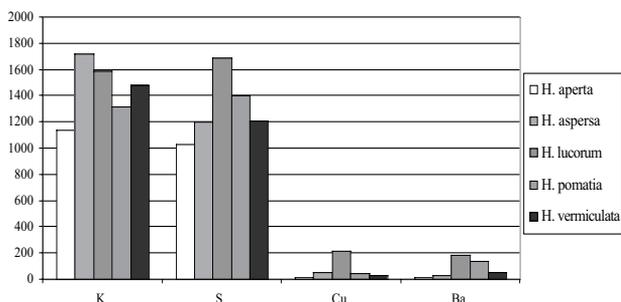


Figura 1: Concentrazioni degli elementi per cui sono state riscontrate differenze significative in base alla specie. Le concentrazioni sono espresse in mg/kg sul tal quale

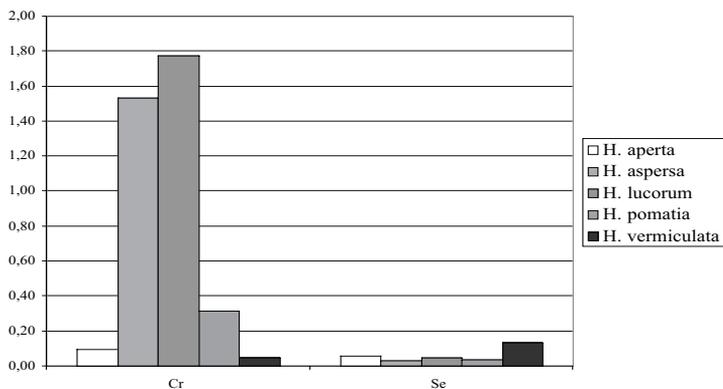


Figura 2: Concentrazioni degli elementi per cui sono state riscontrate differenze significative in base alla specie. Le concentrazioni sono espresse in mg/kg sul tal quale.

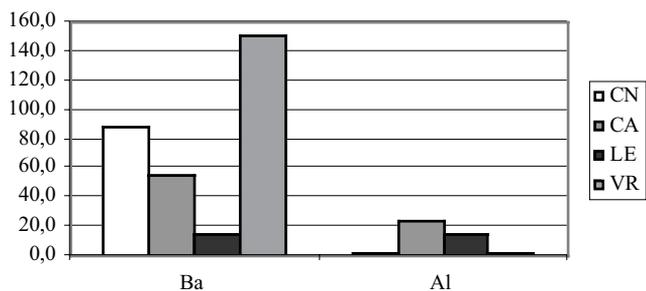


Figura 3: Concentrazioni degli elementi per cui sono state riscontrate differenze significative in base alla località di provenienza. Le concentrazioni sono espresse in mg/kg sul tal quale.

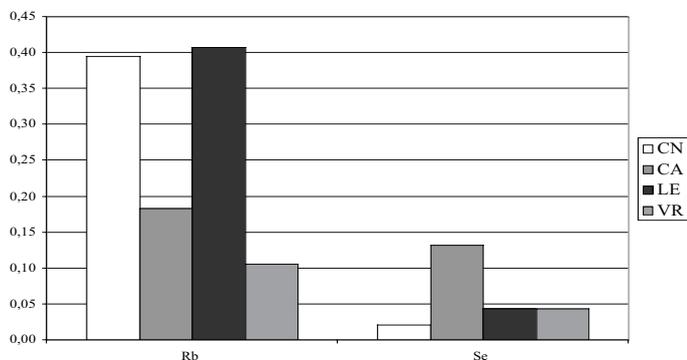


Figura 4: Concentrazioni degli elementi per cui sono state riscontrate differenze significative in base alla località di provenienza. Le concentrazioni sono espresse in mg/kg sul tal quale.

Tramite il test di Student sono state valutate le differenze fra gli animali allevati e quelli prelevati in natura: non sono mai state riscontrate differenze statisticamente significative.

Le medie generali ottenute per gli elementi essenziali sono state messe a confronto con quelle delle principali specie (tabella 4). La concentrazione media del Ca è circa due ordini di grandezza superiore a quella delle altre specie, certamente per ragioni legate alla sintesi del guscio. Anche la concentrazione di Cu sono circa due ordini di grandezza superiori a quelle riscontrate nelle altre specie; la cosa potrebbe essere dovuta al fatto che le lumache utilizzano questo metallo nei pigmenti di trasporto dell'ossigeno. Le concentrazioni di Na e Mg sono tra le due e cinque volte superiori a quelli delle altre specie. Le concentrazioni di P sono inferiori a quelle di tutte le altre specie. Per quanto riguarda Fe, Zn e Se le lumache si pongono in posizione intermedia tra le altre specie.

	Ca	Na	K	Fe	P	Mg	Zn	Cu	Se
lumaca	448	162	139	2,42	120	48,8	1,07	6	0,005
bovino (lombata)	4	44	333	1,4	178	18	3,9	0,05	0,003
suino (lombo)	7	73	220	1,3	150	20	1,8	0,15	0,014
cavallo	4	74	331	3,9	231	29	3,72	0,2	
pollo (petto)	4	33	370	0,4	210	32	0,67	0,05	0,010
tacchino (fesa)	6	43	320	0,8	200	32	1,1	0,07	0,007

Tabella 4: contenuto in elementi essenziali dei campioni di lumache analizzati confrontati con quelli delle principali specie (INRAN, 1997). Le concentrazioni sono espresse in mg/100 g sul tal quale.

Conclusioni

Per quanto riguarda gli elementi essenziali, si può affermare che le lumache sono ottimi apportatori di Ca, Fe, Mg, Cu e Se.

Esistono differenze di specie che permettono di ipotizzare diversi metabolismi. Ad esempio le concentrazioni di potassio in animali appartenenti alla specie *aperta* sono significativamente inferiori alle altre specie, mentre le concentrazioni di zolfo e rame sono maggiori nella specie *lucorum*.

Non sono state riscontrate differenze significative tra esemplari allevati ed esemplari prelevati in natura, ciò permette di concludere che l'allevamento non incide negativamente sulle caratteristiche nutrizionali delle lumache, almeno per quanto riguarda la composizione macro e micro elementale.

Le differenze riscontrate nelle concentrazioni di elementi non essenziali in animali prelevati in località diverse permettono di ipotizzare lo sviluppo di un metodo che permetta di risalire a posteriori alla località di origine.

Per quanto riguarda gli elementi tossici non sono state riscontrate differenze significative tra esemplari allevati ed esemplari prelevati in natura; in ogni caso le concentrazioni sono sempre a livelli non preoccupanti per la salute del consumatore ed indicano una bassa contaminazione ambientale da metalli pesanti nelle zone considerate.

Parole chiave: molluschi terrestri, macro elementi, micro elementi, metalli pesanti.

Key words: terrestrial snails, macro elements, micro elements, heavy metals

Riassunto

21 campioni di lumache delle specie *Helix lucorum*, *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Helix aperta* ed *Helix vermiculata* sono stati analizzati mediante ICP-AES per il loro contenuto in macro e micro elementi. Le medie (espresse in mg/kg sul tal quale) sono state le seguenti: Ca 4480; Na 1620; K 1390; S 1360; P 1200; Mg 488; Cu 60; Fe 24,2; Zn 10,7; Mn 4,54; Cr 0,53; Se 0,05; Co 0,02; Ba 111; Sr 23,6; Al 5,78; B 1,05; Rb 0,22; Mo 0,15; Li 0,06; Sc 0,05; Ag 0,02; Zr 0,02; La 0,01; Y 0,01; Ti 0,10; Be 0,00; Ni 0,24; 0 Cd,10; Pb 0,07; V 0,03; As 0,00; Hg 0,00. Sono state trovate differenze significative per alcuni elementi tra le varie specie e tra le diverse aree di provenienza. Non sono state trovate differenze tra animali allevati ed animali prelevati in natura.

Summary

21 samples of snails belonging to the species *Helix lucorum*, *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Helix aperta* and *Helix vermiculata* were analysed and their macro and micro elements concentrations were determined by means of ICP-AES. The means (expressed as mg/kg wet weight) were the following: Ca 4480; Na 1620; K 1390; S 1360; P 1200; Mg 488; Cu 60; Fe 24,2; Zn 10,7; Mn 4,54; Cr 0,53; Se 0,05; Co 0,02; Ba 111; Sr 23,6; Al 5,78; B 1,05; Rb 0,22; Mo 0,15; Li 0,06; Sc 0,05; Ag 0,02; Zr 0,02; La 0,01; Y 0,01; Ti 0,10; Be 0,00; Ni 0,24; 0 Cd,10; Pb 0,07; V 0,03; As 0,00; Hg 0,00. For some elements differences were detected on the basis of their species and place of origin. No differences were found between breded and wild animals.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano l'Istituto Internazionale di Elicicoltura per il contributo finanziario alla ricerca ed i soci dell'Associazione Nazionale Elicicoltori per aver collaborato al reperimento dei campioni di chioccioline.

Bibliografia

INRAN (1997) tabelle di composizione degli alimenti.
Novelli E., Giaccone V., Balzan S., Ghidini S., Bracchi P.G., 2003, Indagine sul valore dietetico nutrizionale della lumaca: confronto fra specie e fra soggetti raccolti in natura ed allevati. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, vol. XXII, 49-56.
SPSS 11.0 per Windows.

PROTEOSE-PEPTONE CONTENT IN THE MILK OF ITALIAN FRIESIAN COWS WITH MODERATE AND HIGH SOMATIC CELL VALUES^{1,2}

A. Summer³, P. Formaggioni³, P. Franceschi³, M. Malacarne³, P. Mariani³

Introduction

Milk with high somatic cell count has an impaired quality and reduced value, especially for the manufacture of cheese [1]. If the milk has a high cell count, the deterioration during syneresis with a longer clotting time and weak curd leads to an increased moisture content and a lower dry matter yield [2-4]. Most of proteose-peptones (PP) and γ -caseins of the milk result from the enzymatic hydrolysis of the native casein [5, 6]. In particular, PP5 and PP8 components arise from the specific degradation of β -casein by the plasmin [7], which presence in milk can vary depending on several physiological and, above all, pathological factors [8-11]. Proteolysis can alter micellar integrity, with important negative repercussions at level of milk technological behaviour [12, 13]. The aim of this research was to study the variations of milk proteose-peptone content in relation to somatic cell count.

Material and methods

The study was carried out on 45 milk samples (each constituted by a small mixture of 3÷5 individual milks from morning milking), distinguished by a different somatic cell content and subdivided into three classes: milk with less than 250,000, milk from 250,000 to 750,000 and milk with more than 750,000 units per ml. Samplings were taken in different seasonal periods from medium-size and medium-high-size herds of Italian Friesian cows, located in the Parma province. On milk samples, added with sodium merthiolate (0.02 % w/v), the following analyses were carried out: pH with potentiometer; titratable acidity on 50 ml of milk with 0.25N NaOH according to Soxhlet-Henkel method [14]; total nitrogen (TN), non-casein N (NCN), non-protein N (NPN), respectively on milk, acid whey at pH 4.6 and 12% TCA filtrate of milk, by Kjeldahl, according to Aschaffenburg and Drewry [15]; from which casein N (CN = TN - NCN); proteose-peptone N (PPN) according to Aschaffenburg and Drewry [15], after precipitation with anhydrous sodium sulphate from pH 4.6 acid whey and analysis of filtrate by Kjeldahl; urea, by enzyme reaction catalysed by urease [16], with Bun Analyzer 2 apparatus, by means of P/N 667510 kit Bun reagent and values expressed as urea N (MUN); fat and lactose by mid infrared analysis [17], with Milkoscan 134 A/B; somatic cells by fluoro-opto-metric method [18], with Fossomatic 250; chlo-

¹ Communication presented at the 15th A.S.P.A. Congress, Parma, June 18-20, 2003.

² Supported by experimental programme of the Emilia-Romagna Region, coordinated by CRPA Spa, Reggio Emilia.

³ Scienze Zootecniche e Qualità delle Produzioni Animali - Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti - Università degli Studi; Via del Taglio 8, 43100 Parma.

ride, Cl⁻, by titration (AgNO₃), according to the volumetric method of Charpentier-Volhard [19]; freezing point with a thermistor cryoscope, according to Hortvet. The statistical significance of the differences among the observed mean values was tested by ANOVA after control of variance homogeneity (Bartlett test).

Results and conclusions

The mean somatic cell values for the three groups resulted significantly different for experimental condition: 110,000 (L), 529,000 (M) and 1,699,000 (H) units per ml, for the milk with low, moderate and high somatic cell content, respectively. Milks with moderate and high somatic cell content (Table 1) resulted significantly poorer of lactose (4.85 L vs 4.66 M vs 4.57 H, g per 100 g; P<0.0001) and richer of chloride (98.5 L vs 111.5 M vs 117.9 H, mg Cl⁻ per 100 g; P<0.0001). In comparison to milk with low somatic cell content, the milk with high somatic cell content had a concentration of lactose 6% lower and chloride values about 20% higher. pH and titratable acidity values were significantly different (Table 1). As regards to nitrogen fractions, a progressive increase of non-casein N corresponded to the somatic cell increase (112.8 L vs 120.0 M vs 125.5 H, mg per 100 g; P<0.01). On the contrary, N casein variations were statistically not significant; however, milk with the higher content of somatic cells had a lower content of casein. The combined effect of these two *phenomena* determined significant variations of the casein number (77.36 L vs 76.16 M vs 74.87 H; P<0.001), that resulted markedly lower in the milk with high content of somatic cells (Table 1). Milks with moderate and high somatic cell content were characterised (Fig. 1) by a higher concentration of proteose-peptone N (11.5 L vs 15.9 M vs 17.6 H, mg per 100 g; P<0.05). In these conditions, proteose-peptones represent more and more increasing percent amount of casein N (3.01 L vs 4.16 M vs 4.73 H, %; P<0.05). The results of this study suggest that proteose-peptone content of milk varies in relation to milk somatic cell content. In effect, milk with high somatic cell content resulted significantly more provided of proteose-peptones. The increase of this nitrogen fraction seems to be a clear index of a greater proteolytic activity, with a detriment for the integrity of the casein micelle.

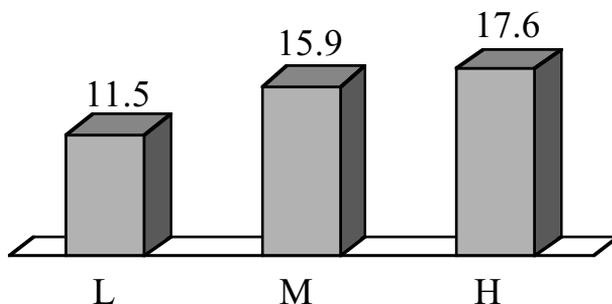


Figure 1 – Proteose-peptone nitrogen contents of milk with low (L), moderate (M) and high (H) somatic cell content (mg PPN per 100 g of milk).

Figura 1 –Contenuto di proteoso-peptoni di latti a basso (L), moderato (M) e ad elevato (H) contenuto di cellule somatiche (mg PPN per 100 g di latte).

Table 1 – Characteristics and proteose-peptone content of milks with different somatic cell count. Means±SD.

Tabella 1 – Caratteristiche e contenuto di proteoso-peptoni di latti con differente contenuto di cellule somatiche. Media ±DS.

		Low (15)		Moderate (15)		High (15)	
Somatic cells	10 ³ /ml	110±52		529±79		1699±876	
Somatic cells	log/ml	4.998±0.199		5.719±0.064		6.193±0.173	
pH	—	6.64±0.08	A	6.69±0.06	A	6.73±0.06	B
Titrateable acidity	°SH/50ml	3.61 ± 0.24	C	3.38±0.25	B	3.17 ± 0.19	A
Freezing point	Δ°C	0.527±0.005		0.526±0.004		0.526±0.003	
Protein	g/100g	3.18±0.20		3.21±0.19		3.19±0.20	
Fat	g/100g	3.03±0.97		3.30±0.60		3.39±0.67	
Lactose	g/100g	4.85±0.11	B	4.66±0.15	A	4.57 ±0.16	A
Chloride, Cl ⁻	mg/100g	98.53±8.60	A	111.50 ±8.84	B	117.90±9.43	B
CN	mg/100g	385.5±26.0		383.0±22.3		374.3±25.6	
NCN	mg/100g	112.8±11.3	A	120.0± 8.7	AB	125.5±10.9	B
NPN	mg/100g	25.3±3.8		24.7±3.2		24.0±2.7	
PPN	mg/100g	11.5±4.9	A	15.9±5.0	AB	17.6±8.0	B
MUN	mg/100g	12.82±3.75		12.29±2.98		11.73±4.23	
CN / TN	%	77.36±1.83	c	76.16±0.68	b	74.87±1.72	a
PPN / TN	%	2.31±0.98	a	3.17±0.98	ab	3.52±1.58	b
PPN / NCN	%	10.07±3.90	a	13.24±3.92	b	13.76±4.93	b
PPN / CN	%	3.01±1.32	A	4.16±1.31	AB	4.73±2.30	B

a, b, c: different for $P \leq 0.05$; A, B, C: different for $P \leq 0.01$; a, b, c: diversi per $P \leq 0,05$; A, B, C: diversi per $P \leq 0,01$;

CN: Casein nitrogen; NCN: Non-casein nitrogen; NPN: Non-protein nitrogen; PPN: Proteose-peptone nitrogen; MUN: Milk urea nitrogen.

CN: Azoto caseina; NCN: Azoto non caseinico; NPN: Azoto non proteico; PPN: Azoto proteoso-peptoni; MUN: Azoto urea del latte.

Keywords: cow milk, somatic cells, nitrogen fractions, proteose-peptones

Parole chiave: latte di vacca, cellule somatiche, frazioni azotate, proteoso-peptoni

SUMMARY – The principal characteristics and the proteose-peptone content of small mixtures of Italian Friesian cow individual milks, grouped for three different levels of somatic cell count (low: 110,000; moderate: 529,000 and high: 1,699,000 units per ml) were studied. Milk with high somatic cell values resulted poor of lactose, rich of chloride and characterised by a markedly lower titrateable acidity. The contents of

proteose-peptone N resulted significantly different: 11.5 – 15.9 – 17.6 mg per 100 g, respectively for the three somatic cell levels.

RIASSUNTO – *Contenuto di proteoso-peptoni nel latte di vacche frisone italiane con moderati ed elevati valori di cellule somatiche*

Sono state studiate le principali caratteristiche ed il contenuto in proteoso-peptoni di piccole miscele di latti individuali di vacche di razza Frisone, distinti secondo tre differenti livelli di cellule somatiche (basso: 110'000, moderato: 529'000 ed elevato: 1'699'000 unità per ml). I latti con elevati valori di cellule somatiche sono risultati poveri di lattosio, ricchi di cloruri e caratterizzati da una acidità titolabile nettamente più bassa. I contenuti di N proteoso-peptoni sono risultati significativamente diversi, pari a 11,5 – 15,9 – 17,6 mg per 100 g, rispettivamente per le tre classi di cellule somatiche.

REFERENCES

- 1) SCHÆLLIBAUM M. (2002). *Managing to lower cell counts in Switzerland*. IDF Bull., 372, 50-53.
- 2) POLITIS I., NG-KWAI-HANG K.F. (1988). *Association between somatic cell count of milk and cheese yielding capacity*. J. Dairy Sci., 71, 1720-1727.
- 3) URECH E., PUHAN Z., SCHÆLLIBAUM M. (1999). *Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis*. J. Dairy Sci., 82, 2402-2411.
- 4) COONEY S., TIERNAN D., JOYCE P., KELLY A.L. (2000). *Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on composition and proteolysis during ripening of Swiss-type cheese*. J. Dairy Sci., 67, 301-307.
- 5) PÂQUET D. (1989). *Revue bibliographique: la fraction protéose-peptones du lait*. Le Lait, 69, 1-21.
- 6) BASTIAN E.D., BROWN R.J. (1996). *Plasmin in milk and dairy products: an update*. Int. Dairy J., 6, 435-457.
- 7) 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*. J. Dairy Sci., 67, 1599-1631.
- 8) BARRY J.G., DONNELLY W.J. (1981). *Casein compositional studies. II. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks*. J. Dairy Res., 48, 437-446.
- 9) ANDREWS A.T., ALICHANIDIS E. (1983). *Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk*. J. Dairy Res., 50, 275-290.
- 10) BALLOU L., PASQUINI M., BREMEL R.D., EVERSON T., SOMMER D. (1995). *Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell count*. J. Dairy Sci., 78, 2186-2195.
- 11) BALDI A., SAVOINI G., CHELI F., FANTUZ F., SENATORE E., BERTOCCHI L., POLITIS I. (1996). *Changes in plasmin-plasminogen-plasminogen activator system in milk from Italian Friesian herds*. Int. Dairy J., 6, 1045-1053.
- 12) BARBANO D.M., RASMUSSEN R.R., LYNCH J.M. (1991). *Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield*. J. Dairy Sci., 74, 369-388.
- 13) VAN BOEKEL M.A.J.S., CRIJNS C.L. (1994). *Behaviour of the proteose-peptone frac-*

tion during renneting of milk. Neth. Milk Dairy J., 48, 117-126.

14) ANON. (1963). *Determinazione del grado di acidità del latte secondo Soxhlet-Henkel.* Milchwissenschaft, 18, 520.

15) ASCHAFFENBURG R., DREWRY J. (1959). *New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk.* XVth Int. Dairy Congr., 3, 1631-1637.

16) PECORARI M., MARIANI M.S., CALZOLARI M.G., TEDESCHI G. (1993). *Il contenuto di urea nel latte: variazioni e rapporti con i parametri tecnologici.* Sci. Tecn. Latt.-Cas., 44, 144-154.

17) BIGGS D.A. (1978). *Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk: collaborative study.* J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 1015-1034.

18) SCHMIDT-MADSEN P. (1975). *Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk.* J. Dairy Res., 42, 227-239.

19) SAVINI E. (1946). *Analisi del latte e dei latticini.* Ed. Hoepli, Milano.

CASEIN NUMBER VARIABILITY OF MARE MILK FROM HAFLINGER AND ITALIAN SADDLE HORSE BREEDS¹

P. Formaggioni², M. Malacarne², F. Martuzzi², A. Summer², P. Mariani²

Introduction

Mare's milk is the most important nutritional resource for the foal during the initial weeks of life. Since centuries, in Central Asia, it is the basic staple for the Koumiss production [1, 2]. Because of its peculiar chemical and nutritional characteristics [3], recently mare's milk is utilised also in human nutrition and for cosmetics [4]. This arouses new interest for the study of mare's milk, in particular concerning the effect of genetic, physiological and feeding factors on organic and inorganic milk components [5-7]. The effects of breed and physiological state are not yet well defined [8-13], in particular concerning the percentage distribution of the nitrogen fractions [14]. The casein number (casein nitrogen x 100/ total nitrogen) represents a good index of the protein outline of mare's milk. Aim of this research was to study the casein number variability in milk in relation to the physiological state for Haflinger and Italian Saddle, two horse breeds bred with different purposes: Haflinger is a medium-small sized, sturdy horse bred for light draft and leisure riding; Italian Saddle is athletic and tall, bred for show jumping.

Materials and methods

The survey was carried out on 126 individual milk samples yielded from 3rd to 150th d *post-partum* (DIM), 70 from 5 Haflinger mares (H) (age: 7÷15 years; parities: 4÷12; liveweight: 400÷520 kg) and 56 from 12 Italian Saddle mares (IS) (age: 6÷21 years; parities: 1÷16; liveweight: 500÷650 kg). Milk was taken by hand milking from a single mammary gland, milked as deep as possible, in presence of the foal, that was previously prevented from suckling for 1 – 2 hours by a muzzle. The mares were fed hay and perennial rye grass in prevalence and lucerne *ad libitum*. Haflinger mares received from 0.5 to 2.5 kg of concentrate; Italian Saddle mares from 2 to 4 kg of concentrate. The milk samples were subdivided into 5 periods according to the DIM: 1: from 3 to 15 (10 H vs 8 IS); 2: from 16 to 30 (10 vs 12); 3: from 31 to 60 (18 vs 20); 4: from 61 to 90 (12 vs 10); 5: from 91 to 150 (20 vs 6). The following nitrogen fractions were determined by means of Kjeldahl on each milk sample: total N (TN) on milk and non-casein N (NCN) on acid whey at pH 4.6, according to Aschaffenburg and Drewry [15]. From these nitrogen fractions the following variables were obtained: casein N (CN = TN - NCN), casein number (CN x 100/TN). Parameters were submitted

¹ Poster presented at the 15th A.S.P.A. Congress, Parma, June 18-20, 2003.

² Scienze Zootecniche e Qualità delle Produzioni Animali - Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti - Università degli Studi; Via del Taglio 8, 43100 Parma.

to ANOVA, using a mixed model (fixed factors: breed, lactation period; coefficient of regression: parities number; random factor: mare nested into breed).

Results and conclusions

Total N and casein N contents and casein number vary significantly in relation to lactation stage (Figure 1) and breed (Table 1), while variations related to number of parities were not observed. During the five months of lactation, a significant decrease was observed for the three variables: 47.75% for CN, 42.69% for TN and 5 percentage units for casein number. The decrease for CN was more relevant than for TN between the first and the second lactation period. This fact causes a significant decrease of casein number (about 3 percentage units) in the second with respect to the first period. From the second period onwards, casein number values were statistically not different. In the first period, the CN content decrease resulted more accentuated in H than IS. Consequently, casein number values of H resulted significantly lower from the second to the fourth period. No differences were observed in the fifth period. However, casein number trends in the two breeds were statistically not different. The results evidenced that casein number shows a significant decrease from the 3rd to the 150th DIM. In particular, the decrease is markedly accentuated between the first and the second period. As regards breed differences, IS is characterised by higher values in comparison to H, from the second to the fourth period. According to most Authors, excluding *colostrum* and the short transition phase, lactation stage shouldn't have a significant effect on the casein number trend [10, 14, 16, 17].

Minieri and Intrieri [10], e. g., for the milk of H mares, from d 3 to d 180 of lactation, found values that fluctuate very little around 67.5%. On the other hand, Neseni *et al.* [18] and Storch [1] observed an irregular trend and variable values, that

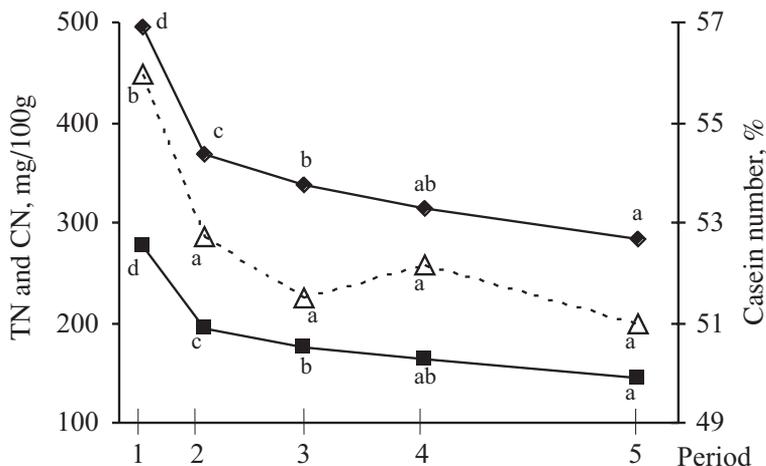


Figure 1 – Trends of Total N (—◆—) and Casein N (—■—) contents and Casein Number (- -Δ-) in mares milk during lactation. Different letters (a, b, c) differ significantly for $P < 0.05$.

Figura 1 – Andamenti dei contenuti di azoto totale (—◆—) e di azoto non caseinico (—■—) e dell'indice di caseina (- -Δ-) nel latte di cavalla nel corso della lattazione. Lettere differenti (a, b, c) differiscono significativamente per $P < 0,05$.

Table 1 – Trends of Total N and Casein N contents and Casein Number in Haflinger and Italian Saddle Horse breeds during lactation (Mean values±SE).

Tabella 1 – Variazioni dei contenuti di azoto totale e azoto caseinico e dell'indice di caseina nel latte di cavalle Avelignese e Sella Italiano durante la lattazione (Media±ES).

Period (DIM)	Total Nitrogen <i>Azoto totale</i> mg / 100 g			Casein N <i>Azoto caseina</i> mg / 100 g			Casein Number <i>Indice caseina</i> %		
	H	IS	P	H	IS	P	H	IS	P
1 (3+15)	478±14	504±17		265±8	282±10		55.23±1.1	56.30±1.3	
2 (16+30)	335±14	383±15	a	170±8	206±8	b	50.41±1.1	53.69±1.1	a
3 (31+60)	284±11	358±11	c	140±6	188±6	c	48.98±0.8	52.55±0.8	b
4 (61+90)	280±13	330±17	a	140±7	175±10	b	49.84±1.0	53.09±1.3	a
5 (91+150)	264±10	293±20		133±6	150±11		50.20±0.8	51.28±1.5	

a, $P \leq 0.05$; b, $P \leq 0.01$; c, $P \leq 0.001$

DIM: Days in milk; H: Haflinger; IS: Italian Saddle

DIM: Giorni di lattazione; H: Avelignese; IS: Sella Italiano

showed the tendency to increase in the final period of the lactation. On the contrary, Rozhanskii *et al.* [19] and Mariani *et al.* [7] found no variations in relation to lactation period.

Keywords: mare milk, Haflinger, Italian Saddle, lactation stage, casein number

Parole chiave: latte di cavalla, Avelignese, Sella Italiano, stadio di lattazione, indice di caseina

SUMMARY - The variability of casein number of Haflinger and Italian Saddle mare milk was studied. The research was carried out on 126 individual milk samples, 70 from Haflinger mares and 56 from Italian Saddle mares, collected throughout five months of lactation (from the 3rd to the 150th day). The content of total nitrogen and non-casein nitrogen were determined, from which the casein number values were calculated. Casein number registered a significant decrease throughout the lactation, particularly accentuated during the first month. From the second part of the first month to the third month, Haflinger mares had significantly lower values for casein number compared to Italian Saddle mares.

RIASSUNTO – Variabilità dell'indice di caseina del latte di cavalle Avelignesi e Sella Italiano.

È stata studiata la variabilità dell'indice caseina del latte in cavalle di razza Avelignese e di razza Sella Italiano. L'analisi ha interessato 126 campioni di latte individuale, di cui 70 Avelignese e 56 Sella Italiano, raccolti nel corso di cinque mesi di lattazione (dal 3° al 150° giorno). Sono stati determinati i contenuti di azoto totale e azoto non caseinico e calcolati i valori dell'indice di caseina. L'indice di caseina registra un calo significativo nel corso della lattazione, particolarmente accentuato durante il primo mese. La razza Avelignese presenta valori dell'indice significativamente inferiori nei confronti della razza Sella Italiano a partire dalla seconda metà del primo mese di lattazione fino al terzo mese.

REFERENCES

- 1) SAVINI E. (1946). *Analisi del latte e dei latticini*. Ed. Hoepli, Milano, Italy.
- 2) STORCH G. (1985). "Composition and properties of mare's milk and Koumiss, with particular regard to dietetic aspects". Degree Diss., Justus-Liebig-Univ., Giessen, Germany.
- 3) MALACARNE M., MARTUZZI F., SUMMER A., MARIANI P. (2002). *Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk*. Int. Dairy J., 12, 869-877.
- 4) DROGOUL C., PREVOST H., MAUBOIS J.-L. (1992). *Le lait de juments un produit, une filiere a developper? Quoi de neuf en matiere d'etudes de recherches sur le cheval?*. 18^{ème} Journée d'Etude, CEREOPA, Paris, 37-51.
- 5) DOREAU M., BOULOT S. (1989). *Recent knowledge on mare milk production: a review*. Liv. Prod. Sci., 22, 213-235.
- 6) DOREAU M. (1994). *Le lait de jument et sa production: particularités et facteurs de variation*. Lait, 74, 401-418.
- 7) MARIANI P., MARTUZZI F., CATALANO A.L. (1993). *Composizione e proprietà fisico-chimiche del latte di cavalla: variazione dei costituenti azotati e minerali nel corso della lattazione*. Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma, 13, 43-58.
- 8) BOUWMAN H., VAN DER SCHEE W. (1978). *Composition and production of milk from Dutch warmblooded saddle horse mares*. Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtermittelkde, 40, 39-53.
- 9) DOREAU M., BOULOT S., BAUCHART D., BARLET J.-P., MARTIN-ROSSET W. (1992). *Voluntary intake, milk production and plasma metabolites in nursing mares fed two different diets*. J. Nutr., 122, 992-999.
- 10) MINIERI L., INTRIERI F. (1970). *Ricerche elettroforetiche sulle frazioni proteiche del colostro e del latte di cavalle di razza Avelignese, in rapporto alla distanza dal parto*. Acta Med. Vet., 16, 73-88.
- 11) MARTUZZI F., SUMMER A., FORMAGGIONI P., MARIANI P. (2002). *Mare milk at drying-off: chemico-physical characteristics, nitrogen composition and mineral elements in Italian Saddle and Haflinger nursing mares*. Proc. 53th Ann. Meet. EAAP, Cairo, Egypt, 8, 261 (Abstr.).
- 12) PINTO F., FACCIA M., DI SUMMA A., MASTRANGELO G. (2001). *Latte equino. Primi risultati sulle caratteristiche quanti-qualitative in cavalle di razza murgesa e TPR*. Progr. Nutr., 3(1), 59-68.
- 13) MARIANI P., MARTUZZI F., FORMAGGIONI P., SABBIONI A., SUMMER A. (2000). *Nitrogen distribution in Haflinger mare milk throughout six lactation months*. Proc. 51th Ann. Meet. EAAP, The Hague, The Netherlands, 6, 374 (Abstr.).
- 14) DOREAU M., BOULOT S., BARLET J.-P., PATUREAU-MIRAND PH. (1990). *Yield and composition of milk from lactating mares: effect of lactation stage and individual differences*. J. Dairy Res., 57, 449-454.
- 15) ASCHAFFENBURG R., DREWRY J. (1959). *New procedure for the routine determination of the various noncasein proteins of milk*. XVth Int. Dairy Congr., 3, 1631-1637.
- 16) KULISA M. (1977). *Zawartosc niaktorych wolnych aminokwasow oraz kwasow*

tluszczowych w mleku klaczy arabskich malopolskich i huculskich. Roczniki Naukowe Zootechniki, 4, 79-89.

- 17) DESKUR S., LEONHARD-KLUZ I., GROCHOWALSKI K., RYCHWALSKA-NAHLIK M. (1978). "*Occurrence of scours in foals during post-partum oestrus in their dams, and composition of milk whey proteins*". *Roczniki Naukowe Zootechniki, 5, 115-127; Dairy Sci. Abstr., 41, 121.*
- 18) NESENI R., FLADE E., HEIDLER G., STEGER H. (1958). *Yield and composition of mare's milk in the course of lactation. Arch. Tierz., 1, 91-129.*
- 19) ROZHANSKII M.O., SERGEEVA A.V., KUDRYASHOV A.G. (1962). "*Protein composition of mares' milk*". *Dokl. Mosk. Sel'-khoz. Akad. Timiryazeva (Zootekhniya), 78, 188-193.*

PROCESSI OSSIDATIVI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE

Quarantelli A., Righi F., Renzi M., Bonomi A.

INTRODUZIONE

La conservazione dei cereali e di altri alimenti di origine vegetale rappresenta ancora oggi un problema per il quale non è stata individuata una soluzione definitiva e sufficientemente economica. Le perdite di materie prime, che si accumulano durante lo stoccaggio, sono stimate dalla FAO intorno al 10% della produzione mondiale con punte massime oscillanti fra il 30% ed il 50% nei paesi in via di sviluppo.

Una partita di alimenti vegetali è infatti un ecosistema artificiale costituito da un insieme di diverse entità viventi rappresentate dai semi con il loro germe, dai microrganismi infestanti (batteri, lieviti e muffe) e dagli zooparassiti (acari ed insetti). L'insieme è inoltre un eccellente isolante termico in grado di accumulare il calore prodotto dall'ecosistema medesimo.

L'obiettivo primario dello stoccaggio degli alimenti di origine vegetale è pertanto quello di stabilizzare l'ecosistema e la sua attività vitale con la finalità di mantenere il più possibile inalterata l'*energia chimica* accumulata sotto forma di amido, la *frazione azotata* rappresentata dalle proteine, ma soprattutto la *frazione lipidica* costituita da acidi grassi caratterizzati da un elevato grado di insaturazione. Patologie e danneggiamenti della coltura, così come le operazioni di raccolta, stoccaggio e trasformazione possono indurre nella frazione lipidica dei cambiamenti in grado di dare luogo a fenomeni di irrancidimento sia nelle materie prime sia nei prodotti derivati dalle stesse.

Il processo di irrancidimento e le reazioni di degradazione dei lipidi vegetali sono tuttora oggetto di grande interesse per le conseguenze che si ripercuotono negativamente sulla qualità delle materie prime. Particolarmente gravi sono infatti le perdite di valore nutritivo, la riduzione dell'appetibilità e gli effetti negativi che i prodotti dell'ossidazione lipidica possono esercitare sullo stato di salute degli animali.

Caratteristiche dei lipidi vegetali

La componente lipidica degli alimenti di origine vegetale è notoriamente costituita da fosfolipidi e glicolipidi, da cere, cutine e suberine nonché da grassi e da oli. I fosfolipidi e i glicolipidi sono i principali componenti strutturali delle membrane citoplasmatiche, nucleolari e degli organuli cellulari. Le cere, le cutine e le suberine formano il rivestimento protettivo esterno degli organi delle piante superiori. I grassi e gli oli sono sostanze di riserva accumulate dalle piante nei frutti e nei semi durante la crescita, in misura diversa a seconda della specie vegetale. Si trovano inoltre nei pollini, nelle spore e negli organi vegetativi (Huang, 1992).

Queste riserve lipidiche sono rappresentate da trigliceridi e da loro metaboliti o precursori, quali i mono e digliceridi i quali vengono utilizzati come fonte di energia

che le cellule vegetali utilizzano nei periodi di metabolismo attivo (Huang, 1992). Le sostanze grasse sono accumulate all'interno di particelle subcellulari sferiche dette oleosomi o sferosomi aventi un diametro variabile fra 0,6 e 2,0 μm a seconda della specie vegetale. Ciascun corpo lipidico è costituito da una matrice di trigliceridi circondata da uno strato fosfolipidico nel quale sono immerse proteine dette oleosine (Tzen and Huang, 1992). Le cellule più ricche in oli sono generalmente quelle dello strato aleuronico e del germe (Saunders, 1985). Questa naturale compartimentazione dei lipidi all'interno delle cellule e nei diversi tessuti rappresenta di fatto un meccanismo di difesa naturale delle piante nei confronti dell'irrancidimento (Galliard, 1989).

Tutte le molecole lipidiche hanno la caratteristica fondamentale di contenere una o più catene alifatiche di acidi grassi (acidi di lunghezza minima C_8). Esistono quasi 400 di questi acidi ma solo una decina ha una reale importanza sia ai fini nutrizionali, sia ai fini economici in quanto ampiamente disponibili per la produzione industriale degli oli. Prendendo in considerazione le riserve lipidiche localizzate delle piante, fatta eccezione per l'olio di cocco e per i semi di palma, che contengono circa un 50% di acido laurico (C_{12}), e per l'olio di palma, che è ricco di acido palmitico (C_{16} , 45%), gli altri oli vegetali sono dominati dal gruppo degli acidi grassi insaturi con 18 atomi di carbonio (Pehowich, 2000; Chow, 2002). Così, per ogni specie di pianta oleaginosa attualmente utilizzata, più dell'80% del contenuto in acidi grassi è generalmente rappresentato da oleico ($\text{C}_{18:1}$), linoleico ($\text{C}_{18:2}$) e linolenico ($\text{C}_{18:3}$). La stessa predominanza di acidi grassi C_{18} mono-, di-, e tri-insaturi, circa il 60% degli acidi grassi totali, è osservata nei semi dei cereali (Guillaumin, 1982; Galliard, 1989).

Osservazioni analoghe possono essere effettuate anche in merito alla composizione in acidi grassi di fosfolipidi e glicolipidi, che sono costituenti essenziali delle membrane cellulari.

Reattività dei lipidi vegetali

A causa della predominanza di acidi grassi insaturi, i lipidi di origine vegetale risultano più reattivi rispetto a quelli di origine animale caratterizzati da un più elevato contenuto di acidi grassi saturi. Diversamente dagli animali, le piante non possiedono un sistema per trasportare i lipidi fra i diversi comparti dell'organismo; inoltre, la ridotta umidità presente nei semi limita la diffusione dei lipidi fra i vari tessuti (Galliard, 1989). Di conseguenza queste sostanze non vanno incontro a modificazioni di rilievo finché rimangono racchiuse, all'interno della cellula, nel loro tessuto originale. In questa sede si conservano integri fino a quando non vengono innescati i processi biologici legati alla germinazione (Bahri, 2000) oppure quando gli alimenti sono sottoposti a processi di lavorazione che arrecano danno alle particelle contenenti il grasso (Malekian, 2000).

I lipidi non più protetti dalle membrane integre possono infatti entrare in rapporto diretto con l'ossigeno atmosferico, venire dispersi su un'ampia superficie e trovarsi a contatto con tracce di metalli presenti nei tessuti vegetali, che agiscono come catalizzatori del processo di ossidazione. Possono inoltre essere esposti alla luce e ad altri agenti ossidanti esogeni, la cui azione si somma a quella degli enzimi lipolitici *endogeni*, presenti nei tessuti dei semi e a quelli *esogeni* prodotti dai

microorganismi ad essi associati (Gaillard, 1989).

REAZIONI DEI LIPIDI VEGETALI

Le reazioni dei lipidi vegetali durante l'immagazzinamento e la trasformazione possono essere suddivise in *reazioni enzimatiche* e *reazioni non enzimatiche*.

Le reazioni enzimatiche sono coinvolte nei processi di idrolisi, ossidazione ed isomerizzazione dei trigliceridi e degli acidi grassi. Le reazioni non enzimatiche sono limitate alla via ossidativa (autossidazione) ed alla isomerizzazione.

IDROLISI DEI LIPIDI

Gli enzimi responsabili del fenomeno idrolitico a carico dei lipidi sono la *lipasi* ed in minor misura la *fosfolipasi*, la *glicolipasi* e l'*esterasi*.

Azione degli enzimi lipolitici

La maggior parte degli acidi grassi che si trova nei semi e nelle cariossidi è esterificata ad una specifica molecola alcolica, il glicerolo. In condizioni di umidità, temperatura e pH favorevoli, gli enzimi lipolitici si attivano ed idrolizzano, attraverso una reazione di trans-esterificazione, i trigliceridi in acidi grassi liberi, saturi ed insaturi; anche i fosfolipidi sono soggetti a tale trasformazione. Gli enzimi coinvolti sono rispettivamente la **lipasi** e la **fosfolipasi**. Durante le varie lavorazioni, i lipidi dei cereali possono poi essere esposti all'azione delle lipasi di origine microbica, il cui ruolo è tuttavia ancora in discussione (O'Connor, 1992).

Le reazioni catalizzate da questi enzimi comportano, come già accennato, la liberazione di acidi grassi liberi (Takano, 1993) e sono pertanto responsabili dell'incremento dell'acidità che viene frequentemente registrato, durante lo stoccaggio, negli oli estratti dai semi delle oleaginose. Analogamente, un incremento dell'acidità si verifica nei semi danneggiati a seguito della movimentazione meccanica e dell'azione lesiva provocata dagli insetti. La loro rimozione attraverso opportune tecniche di pulitura, prima dell'immissione negli impianti di macinazione, consente di ottenere farine con una componente lipidica stabile e che si conserva più a lungo durante lo stoccaggio (Guillaumin, 1982).

Takano (1993) propone un modello per spiegare il meccanismo di decomposizione operata dalla lipasi sui lipidi della pula di riso. La fosfolipasi D, secondo l'Autore, trasforma in acido fosfatidico la fosfatidilcolina che è la principale componente della membrana degli sferosomi. Questa trasformazione provoca la disintegrazione degli sferosomi e consente il contatto dei trigliceridi, non più protetti dalla membrana, con la lipasi che ne inizia la degradazione, con la creazione di acidi grassi liberi.

Origine delle lipasi

Le lipasi, responsabili della degradazione dei lipidi, possono avere due origini:

Lipasi endogena. La lipasi endogena è stata studiata nei semi di soia, di fagiolo e di ravizzone così come nelle cariossidi del frumento, del sorgo, del riso e dell'avena

(Guillaumin, 1982; Gaillard, 1989; Saunders, 1985). Nel frumento, la lipasi è localizzata principalmente nella crusca e nel germe (Dapron, 1983; Gaillard 1983, 1986; O'Connor, 1992) (Tabella n. 1). Nelle cariossidi dei cereali inoltre sono stati individuati talvolta più di tre isoenzimi della lipasi (Baxter, 1984; O'Connor et al., 1989; Peterson, 1999; Edlin et al., 2002) ed isoenzimi multipli della fosfolipasi che agiscono in diverse posizioni della molecola fosfolipidica (Wang, 2001); esistono tuttavia anche altri enzimi in grado di degradare le molecole lipidiche: nella pula di riso sono stati individuati, oltre a diversi tipi di lipasi e fosfolipasi (A1,A2,B,C,D), anche glicolipasi ed esterasi che agiscono degradando i trigliceridi (Takano, 1993).

La sintesi degli enzimi idrolitici, fra i quali è annoverata la lipasi, è indotta nei cereali da segnali ormonali provenienti dal tessuto embrionale. Tali segnali possono indurre la sintesi delle proteine enzimatiche in toto oppure determinare l'attivazione di proenzimi nello strato aleuronico e apparentemente, in modo parziale, anche nei tessuti dell'endosperma (Tavener et al., 1969; Laidman and Tavener, 1971; Gallie and Young, 1994). È stato osservato come l'attività lipasica permanga nell'avena matura, tanto nella crusca (contenente una elevata percentuale di strato aleuronico) quanto nelle frazioni dell'endosperma (Ekstrand et al., 1992; Hutchinson et al., 1951). Poiché tale attività è stata osservata anche in assenza di processi germinativi (O'Connor et al., 1992; Peterson, 1999; Outinen, 1999), essa è ritenuta come residua dai processi di sintesi lipidica verificatisi durante lo sviluppo dei semi (ad opera appunto della lipasi) ed in parte anche come manifestazione di altre attività biologiche del seme, riferibili ad esempio a meccanismi di difesa (Urquhart et al., 1983).

Per la lipasi del frumento non è stata dimostrata alcuna specificità certa nei confronti dei gruppi acilici; analogamente, nessuna azione enzimatica selettiva è stata individuata durante la lipolisi dell'avena (O'Connor et al., 1992; Heiniö et al., 2002). L'idrolisi dei lipidi dell'avena procede infatti apparentemente senza accumulo di mono- e diacilgliceroli: una volta che i trigliceridi sono accessibili alla lipasi, tutti e tre i gruppi acilici vengono rapidamente convertiti in acidi grassi liberi (Liukkonen et al., 1993). Un dato contrastante deriva tuttavia dallo studio della attività della lipasi dell'avena sull'1,2,3-triisnagoglicerolo, che è stata dimostrata avvenire con una forte specificità posizionale (Yasuhide et al., 1997). L'idrolisi dei lipidi neutri di riserva presenti nell'avena è infatti più veloce di quella di altri cereali; sempre nell'avena scarse sono invece le informazioni sull'idrolisi nei lipidi polari, che appare comunque minima durante la trasformazione e lo stoccaggio (Liukkonen et al., 1992). Al contrario, nell'orzo ed in modo particolare nel malto d'orzo, l'idrolisi dei lipidi polari si verifica rapidamente appena il seme è macinato e la temperatura incrementata. Dati più certi sono disponibili invece per quanto concerne l'azione della fosfolipasi che mostra in tutti i casi una notevole specificità per differenti gruppi acilici (Kaukovirta et al., 1998).

Tabella n. 1 - Attività della lipasi in alcuni cereali ed in alcuni prodotti della molitura.

Alimenti	Attività lipasica (1) µmol ac oleico/hr/g	Attività lipasica (2) µmol ac oleico/hr/g
Frumento	2 - 4,5	—
Farina di frumento	1 - 1,25	—
Crusca di frumento	7	270,7*
Germe di frumento	—	62,6*
Avena	—	96 - 190** 10 - 770***
Avena fioccata	20	—
Sorgo	6	—
Risone	11 - 13	—
Riso brillato	1,25	—
Pula di riso	20 - 30	—

(1) da Galliard, 1989;

(2) altri autori : * da O'Connor, 1992; ** da Peterson, 1999; ***Matlashewsky et al., 1982 e Urquhart;

Lipasi esogena. E' prodotta da microrganismi durante la loro crescita sul seme (Guillaumin, 1982). I semi e le cariossidi al momento della raccolta veicolano infatti una microflora rappresentata principalmente da batteri e muffe, con una piccola percentuale di lieviti.

La temperatura ed il tenore in acqua libera del substrato rivestono una notevole importanza per il loro sviluppo. Batteri e lieviti hanno scarse possibilità di crescita quando, attraverso l'essiccazione, l'umidità dei semi è portata a livelli inferiori al 10 %, (questo corrisponde ad una umidità relativa inferiore al 75% e ad una temperatura intorno a 22°C - Vertucci and Roos, 1990). Questi microrganismi necessitano infatti di una quantità minima di acqua libera per la crescita. I batteri in particolare richiedono un'umidità relativa prossima al 90%, mentre i lieviti non si sviluppano a livelli inferiori all'88%. Queste umidità relative corrispondono a un contenuto di acqua della granella oscillante fra il 15% e il 17%. Tali valori sono ben al di sopra dei normali livelli di umidità previsti per lo stoccaggio nei silos. E' tuttavia dimostrato che le spore di muffe xerofile, cui appartengono alcune specie di *Aspergillus*, possono germinare a livelli di umidità inferiori a quelle sopra riportati (Dragoni et al. 1997). Al contrario, quando i semi sono stoccati in condizioni non ideali, in presenza di ossigeno e di umidità relativa elevata (maggiore al 90%), tutti i microrganismi presenti (batteri, lieviti e muffe) crescono e la produzione di enzimi e di lipasi in particolare risulta accentuata. Pertanto, ad un aumento della umidità dei semi corrisponde la formazione di acidi grassi liberi derivanti in parte dall'azione della lipasi endogena, la cui attività ha luogo a bassi livelli di umidità ed in parte da quella degli enzimi generati dalla microflora contaminante che prolifera in modo ottimale nelle condizioni sopra esposte.

Durante i vari processi di lavorazione e di stoccaggio, i lipidi di riserva dei

semi possono quindi essere esposti in misura diversa alle lipasi microbiche. Tali lipasi, a differenza di quelle endogene, discriminano fra i differenti gruppi acilici e manifestano diverse affinità per gli acidi grassi esterificati al glicerolo (O'Connor et al., 1992; Heiniö et al., 2002).

Fattori che influenzano l'attività della lipasi

L'attività della lipasi è condizionata essenzialmente da umidità, temperatura e pH del mezzo; tuttavia anche il genotipo (Frey and Hammond, 1975) e l'andamento stagionale durante la maturazione della pianta (O'Connor, 1992) possono influenzare l'attività di questo enzima.

Fra questi fattori, l'umidità ed in particolare l'attività dell'acqua riveste un ruolo fondamentale. La presenza di acqua libera determina infatti l'attivazione dell'enzima ed influenza l'equilibrio termodinamico della reazione. Premesso che le diverse lipasi si comportano in modo differente, le acquisizioni inerenti la lipasi microbica fanno supporre che l'attivazione dell'enzima avvenga ad attività dell'acqua decisamente inferiori a 0,3 (Wehtye and Adlercreutz, 1997), essendo sufficienti anche strati singoli o multipli di acqua di adsorbimento intorno all'enzima (Caro et al., 2002). E' sufficiente quindi un'umidità del substrato inferiore al 5% perché si manifesti attività enzimatica (Galliard, 1989). L'effetto sull'equilibrio termodinamico della reazione catalizzata dall'enzima lipasi dipende dal fatto che l'acqua rientra fra i reagenti della reazione stessa. A questo proposito è stato dimostrato che nel range di attività dell'acqua compreso fra 0,2 e 0,3 l'equilibrio della reazione può invertirsi (Svensson et al., 1994). Anche gli altri substrati coinvolti in questa reazione, quali gli acidi grassi liberi, il glicerolo e diversi acilgliceroli ne influenzano tuttavia l'equilibrio, per cui quest'ultimo non può essere stabilito solo sulla base del contenuto in acqua.

Durante la lavorazione dei cereali, l'attività dell'acqua si stabilizza a livelli superiori allo 0,4 per cui l'idrolisi dei lipidi esterificati all'interno dei prodotti enzimaticamente attivi può procedere fino a livelli sensibili. Il tutto, anche in presenza di una maggiore quantità di acqua libera, rimane comunque funzione della concentrazione di substrato, della distribuzione dei substrati fra le fasi acquosa ed oleosa e probabilmente anche della fonte di lipasi presente (Adlercreutz et al., 2002; Ma et al., 2002).

Anche la temperatura ed il pH del mezzo rivestono, come già accennato, un ruolo importante nel determinismo dell'attività lipasica. Nella pula di riso Aizono et al. (1971) hanno riscontrato la massima attività dell'enzima in corrispondenza di una temperatura pari a 37 °C, e ad un pH oscillante fra 7,5 e 8,0.

OSSIDAZIONE DEI LIPIDI

Gli acidi grassi liberi formati in seguito all'azione della lipasi sui trigliceridi, rappresentano un potenziale substrato per un altro enzima, la *lipossigenasi*, caratterizzato da una spiccata azione ossidativa. Sono inoltre molto suscettibili alla autossidazione anche per l'azione catalitica svolta da rame e ferro normalmente presenti in tracce nel medium (Malekian, 2000). Gli acidi grassi insaturi in particolare, sono più sensibili ai fenomeni ossidativi rispetto a quelli saturi e la loro modificazione risulta tanto più

rapida e profonda quanto maggiore è il loro grado di insaturazione. I doppi legami delle catene carboniose, infatti, rappresentano centri reattivi soggetti all'azione di radicali ed enzimi (Barnes and Galliard, 1991; Malekian, 2000). Così, gli acidi grassi mono-, di-, e triinsaturi si decompongono molto rapidamente in idroperossidi instabili, che si degradano a loro volta per dare una mistura complessa di prodotti volatili e non volatili della ossidazione i quali, come tali o in seguito ad ulteriore degradazione, possono arrivare a compromettere l'accettabilità del prodotto.

Azione della lipossigenasi

Con il termine di lipossigenasi si indica un gruppo di isoenzimi presenti in numerosi semi, fra i quali quelli della soia, di alcune varietà di fagioli, dei piselli, delle arachidi e nelle cariossidi dei **cereali**, con particolare riferimento al frumento, avena, orzo e mais. Tale enzima, concentrato soprattutto nel germe, catalizza la reazione di ossidazione non reversibile degli isomeri cis degli acidi grassi polinsaturi contenenti il gruppo 1,4-pentadiene (diene [1,4] – CH = CH – CH – CH = CH –, comunemente chiamato metilene centrale o sistema malonico) formando i rispettivi idroperossidi con doppi legami coniugati cis-trans (Tappel, 1963; Galliard, 1989).

I cereali contengono isoenzimi multipli della lipossigenasi: nell'orzo in via di germinazione sono state determinate le sequenze del cDNA di due isoenzimi aventi attività lipossigenasica (Hamberg and Samuelsson, 1967; Hugues et al., 1994; Van Mechelen et al., 1999; Shiiba et al., 1991). Questi isoenzimi hanno apparentemente diversa specificità di substrato, diversa distribuzione in vari tessuti e producono vari isomeri degli idroperossidi in differenti proporzioni, tuttavia il loro ruolo biologico non è ancora stato determinato con certezza (Feussner and Wasternack, 1998; Schmitt and Van Mechelen, 1997). Recentemente Van der Stelt et al., (2000), hanno ipotizzato che la lipossigenasi intervenga nella sintesi di sostanze necessarie per la difesa dei tessuti vegetali dai patogeni.

Fonti di lipossigenasi

L'enzima lipossigenasi è stato individuato per la prima volta nella soia nel 1932 da Andre e Hou, che ne hanno descritto l'azione sugli acidi grassi. Oggi è risaputo che l'enzima è diffuso fra gli organismi vegetali ed è stato isolato anche da una muffa appartenente al genere *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*). E' abbondante soprattutto nelle leguminose e nei cereali come riportato nella tabella 2.

Tabella n. 2 - attività delle lipossigenasi derivanti da diverse fonti in comparazione con quelle ottenute dalla soia (attività = 100)

Alimenti	Attività lipossigenasica relativa %
Soia	100
Fava	60
Pisello	38
Frumento	0, 5 - 16
Germe di frumento	3 - 5
Orzo	12
Arachidi	1

(da Tappel, 1961).

La soia e il pisello proteico figurano fra le specie vegetali maggiormente studiate (Nicolas, 1981) in funzione del loro elevato contenuto in lipossigenasi.

Nei cereali, il tasso di reazione della lipossigenasi è molto variabile. Dalla tabella n. 3 si evince che l'orzo, così come il frumento, è caratterizzato da una elevata attività della lipossigenasi mentre nella segale e nell'avena l'azione di questo enzima è meno rilevante (Fretzdorff et al., 1986; Lehtinen et al., 2000).

Tabella n. 3. Attività della lipossigenasi di diversi cereali (Lehtinen et al., 2000).

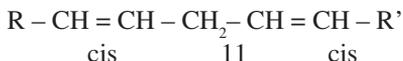
Alimenti	Attività della lipossigenasi (umol/min) / 100 mg di farina
Orzo	1200
Frumento	630
Segale	290
Avena	<50
Malto di avena	<50
Malto di orzo	<50

Attività enzimatica della lipossigenasi

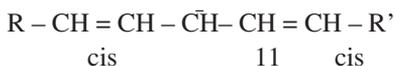
Non è ancora stato accertato se la lipossigenasi è ugualmente reattiva verso gli acidi grassi liberi ed i loro esteri del glicerolo. Alcuni autori, in particolare Guss et al. (1967), ritengono che alcuni isoenzimi della lipossigenasi abbiano affinità per gli acidi grassi liberi polinsaturi, mentre altri isoenzimi siano più inclini ad ossidare le forme esterificate degli stessi acidi presenti nelle molecole di trigliceridi.

L'azione catalitica della lipossigenasi si esplica prevalentemente sugli isomeri naturali degli acidi grassi linoleico, linolenico ed arachidonico. La sequenza a quattro fasi che descrive l'attività di questo enzima è stata proposta da Tappel (1961) e completata da Hamberg e Samuelson (1967).

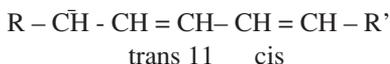
Un acido dienico a struttura malonica, insaturato e nella forma *cis* è la molecola di partenza:



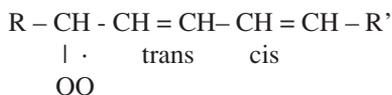
1- Nella prima fase un atomo di idrogeno viene eliminato dal carbonio del gruppo metilenico centrale in posizione 11:



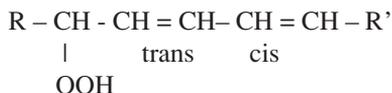
2- Nella seconda fase si verifica una isomerizzazione *cis-trans* del doppio legame ed una coniugazione:



3- Una molecola radicalica di ossigeno $\bar{O} - \bar{O}$ è poi inserita in posizione 13:



4- L'ultima fase comporta l'inserimento di un idrogeno nel radicale perossilico, con formazione di un **idroperossido**:



Acido 13-idroperossioctadecaenoico, per esempio.

La reazione continua poi in condizioni aerobiche o anaerobiche e gli idroperossidi possono dare luogo ad altri prodotti. Il passo successivo porta infatti alla decomposizione od alla conversione enzimatica degli idroperossidi in una varietà di acidi grassi ossidati (Gardner, 1979; Gardner, 1988). L'*esanale* è generalmente riconosciuto come uno dei maggiori componenti responsabili dell'odore che si sviluppa nella pula di riso durante lunghi periodi di stoccaggio (Yamamoto et al., 1980).

Il ferro (Fe) presente come coenzima nella lipossigenasi sembra essere coinvolto nel trasferimento di elettroni durante l'incorporazione dell'ossigeno negli acidi grassi insaturi contenenti il sistema cis,cis- 1,4- pentadiene. La lipossigenasi deve essere nella forma ossidata (Fe^{3+}) affinché la reazione di ossidazione possa procedere. La forma ossidata della lipossigenasi può infatti catalizzare la rimozione stereospecifica di idrogeno da uno specifico carbonio (ad esempio: gruppo metilenico C-11 dell'acido linoleico o dell'acido linolenico) degli acidi grassi (O'Connor and O'Brien, 1991). Si forma così un radicale e la lipossigenasi è ridotta alla forma Fe^{2+} (Gardner, 1988).

Cinetica della reazione di ossidazione enzimatica

Il tasso di ossidazione dell'acido linoleico da parte della lipossigenasi, dopo una brevissima fase di induzione, aumenta rapidamente e costantemente prima di crollare. Questo decremento è dovuto da un lato all'esaurimento del substrato e dall'altro all'inibizione competitiva esercitata dagli idroperossidi generati dall'enzima. I tassi di reazione sono sostenuti e dipendono da diversi parametri. I più importanti sono il pH, la temperatura e la presenza di attivatori ed inibitori.

pH e temperatura. Il pH ottimale per molte lipossigenasi vegetali è compreso fra 6 e 7 e varia leggermente in dipendenza del tipo di substrato e del suo grado di dispersione. Le temperature ottimali per l'attività delle lipossigenasi, estratte dal fagiolo volgare, dalla soia e dall'orzo, sono pari a 25, 30 e 40°C rispettivamente. Oltre i 50° C tuttavia, la lipossigenasi viene inattivata per denaturazione. Dal punto di vista tecnologico questo rappresenta una importante opportunità. Processi di lavorazione che prevedono il ricorso

a trattamenti termici (pellettatura, fiaccatura, estrusione) portano alla inibizione od alla distruzione degli enzimi senza eccessivi rischi o degradazione dei lipidi, proteine e carboidrati degli alimenti trattati (Guillaumin, 1982).

Attivatori ed inibitori. Fra gli attivatori della lipossigenasi gli ioni Ca^{++} sono considerati quelli più efficaci nell'accentuare l'azione ossidante nei confronti degli acidi grassi polinsaturi (Tappel, 1963). Secondo Berry et al., (1997) anche l'elevata concentrazione di ossigeno è in grado di incrementare l'attività dell'enzima.

L'azione inibente della lipossigenasi è fortemente manifestata dagli antiossidanti fenolici. Tuttavia l'impiego di appropriati antiossidanti, siano essi di sintesi (BHA; BHT; Etossichina) o naturali (es. tocoferoli) può ritardare il progredire dell'irrancimento ossidativo provocato da particolari processi di lavorazione. Anche l'acido nordiidroguaiaretico (N.D.G.A.) è considerato molto attivo (Nicolas and Dapron, 1977). Altri inibitori sono stati descritti: mono-alcool, composti contenenti gruppi tiolici (cisteina, glutazione), perossido d'idrogeno (molto attivo) e sistemi che portano alla perturbazione dell'equilibrio esistente a livello molecolare fra gli enzimi, il loro substrato ed il loro prodotto.

Conseguenze delle reazioni operate dalla lipossigenasi

L'attività dell'enzima lipossigenasi, così come quella della lipasi, risultano incrementate negli alimenti che hanno subito particolari alterazioni strutturali durante le operazioni di stoccaggio e di lavorazione. La contemporanea presenza di aria favorisce inoltre un rapido aumento dell'azione lipossigenasica.

A causa dell'azione della lipasi, le porzioni di seme danneggiate tendono ad essere altamente acide e forniscono un ambiente chimico favorevole alla azione della lipossigenasi, la quale determina la formazione di idroperossidi. Questi ultimi in seguito si degradano con formazione di prodotti volatili e non volatili. Per le trasformazioni cui dà luogo, la lipossigenasi può quindi influenzare il colore, l'aroma (off-flavors nei cereali stoccati e negli alimenti proteici conservati) e le proprietà nutritive degli alimenti. Si verifica infatti una distruzione di pigmenti (provitamina A) e di vitamine, E in particolare, una perdita di acidi grassi essenziali polinsaturi (acido linoleico soprattutto), una alterazione degli aminoacidi solforati ed una interazione dei prodotti enzimatici con alcuni aminoacidi essenziali che abbassa la qualità delle proteine (Richardson and Hyslop, 1985; Galliard, 1989).

Sottoprodotti della ossidazione enzimatica

Gli idroperossidi, prodotti dagli acidi grassi polinsaturi per azione dell'enzima lipossigenasi, sono instabili e mantengono la loro identità chimica solo per breve tempo prima di essere modificati secondo numerose vie. Generalmente si considerano due possibili pathways di rottura radicalica.

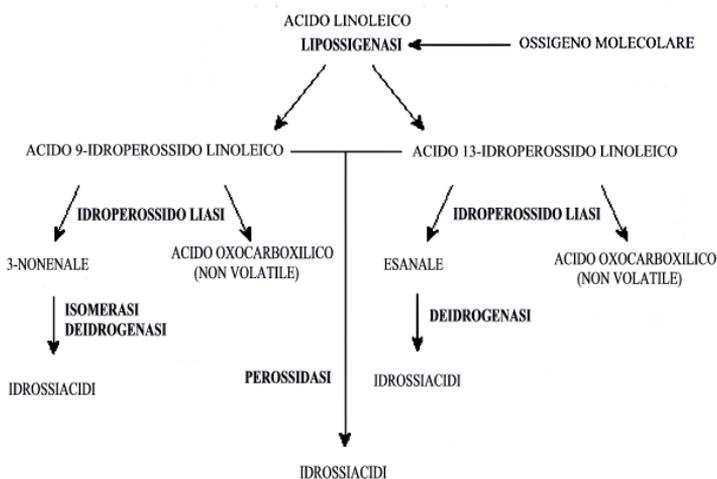
La prima comporta la degradazione dei prodotti iniziali in catene carboniose più brevi. Tale degradazione porta alla formazione di composti carbonilici volatili, principalmente aldeidi α -eniche o dieniche individuabili, per il loro sapore ed odore, anche a basse dosi. Queste aldeidi, insieme con altri prodotti volatili della degradazione, sono il principale indicatore dell'avvenuto irrancimento dei grassi.

La seconda pathway porta alla formazione di composti non volatili; monomeri con gruppi secondari ossigenati e diversi tipi di polimeri: polari ed apolari, legati da

ponti che possono o meno contenere atomi di ossigeno. Anche se più stabili degli idroperossidi, questi composti non sono completamente inerti e possono andare incontro a cambiamenti col tempo. Possono trasformarsi spontaneamente oppure sotto l'influenza di altri attacchi ossidativi dare luogo a prodotti di degradazione volatili e non volatili. La comparsa di questi composti negli alimenti è generalmente considerata deleteria.

Diversi enzimi entrano nel processo di degradazione degli idroperossidi (figura 1): l'idroperossido-liasi è responsabile della produzione di aldeidi ed aldeidi acide; l'isomerasi produce acidi grassi epossiidroxiacici che sono idrolizzati ad acidi grassi triidrossiacici; l'idroperossido-isomerasi produce α -cheti e γ -cheti acidi grassi; infine, una idroperossido-ciclastasi produce acido 12-oxo-fitosienoico, un precursore dell'acido jasmonico, importante fitormone (Royo et al., 1996).

Figura n. 1. Schema semplificato delle reazioni che si verificano durante l'ossidazione enzimatica dell'acido linoleico nei cereali (da Noordermeer et al., 2001 e Biermann et al., 1980, modificato).



AUTOSSIDAZIONE

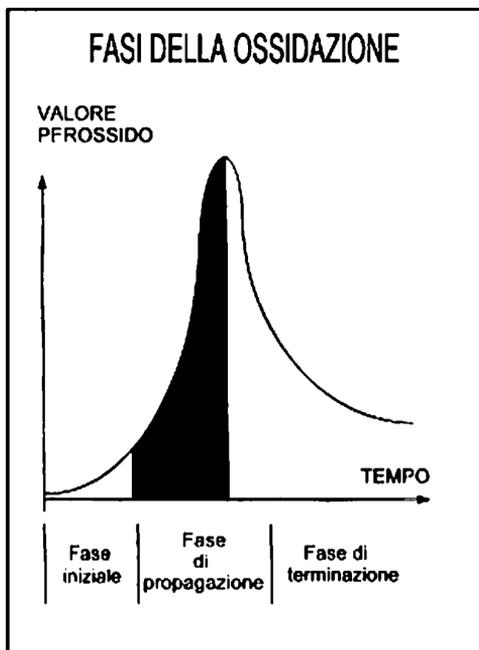
L'ossidazione spontanea dei grassi sotto l'influenza dell'ossigeno presente nell'aria, o autoossidazione, è un fenomeno estremamente diffuso nei lipidi dei vegetali. Tutti gli acidi grassi insaturi sono coinvolti. I prodotti della autoossidazione dei grassi, come quelli della ossidazione enzimatica, hanno il fondamentale inconveniente di alterare in maniera considerevole le proprietà organolettiche del prodotto.

Le reazioni che si verificano durante l'autoossidazione dei grassi sono piuttosto complesse e danno origine ad una grande varietà di molecole presenti, talvolta, solo in tracce. In primo luogo si verifica la formazione di idroperossidi, poi di prodotti volatili quali la CO_2 , prodotti di degradazione legati alla attività fisica dell'energia luminosa e prodotti di ricombinazione degli acidi grassi. Infine si verifica la formazione di composti non volatili: monomeri ossidati, polimeri ed ossipolimeri degli acidi grassi.

Meccanismo della autossidazione

Gli idroperossidi sono il prodotto fondamentale primario della autossidazione; infatti, la loro decomposizione ha effetti biologici importanti e causa alterazioni dell'aroma degli alimenti contenenti grassi (Malekian, 2000). Gli idroperossidi si formano continuamente durante il processo autossidativo che procede attraverso una ben nota reazione a catena descritta da Farmer (1942) e, più recentemente, da Frankel (1984). Tale reazione passa attraverso una fase iniziale in cui il tasso di trasformazione è ridotto (iniziazione), seguita da una fase successiva più rapida (propagazione) cui fa seguito un rapido declino (terminazione) del processo (figura 2).

Figura n. 2. Grafico rappresentante il livello di idroperossidi durante le fasi di iniziazione, propagazione e terminazione.



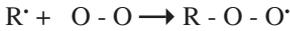
Nella fase di **iniziazione**, un idrogeno radicalico viene rimosso da un gruppo metilico. Tale gruppo metilico è posizionato a livello di un doppio legame della catena dell'acido grasso R con formazione di un radicale alchene R[•]:



Questa fase viene accelerata dalla temperatura, dalla luce o dalla presenza di tracce di ferro e rame che agiscono come catalizzatori a concentrazioni molto basse.

L'autossidazione dei lipidi può essere rallentata considerevolmente od anche arrestata per un certo periodo tempo, se lo stoccaggio è effettuato a basse temperature, in assenza di luce, in presenza di sostanze ad azione chelante nei confronti degli ioni metallici ed in presenza di antiossidanti naturali (α , γ e δ tocoferolo) e sintetici (composti fenolici).

Durante la fase di **propagazione** il radicale alchene reagisce con una molecola di ossigeno e da luogo ad un radicale idroperossido:



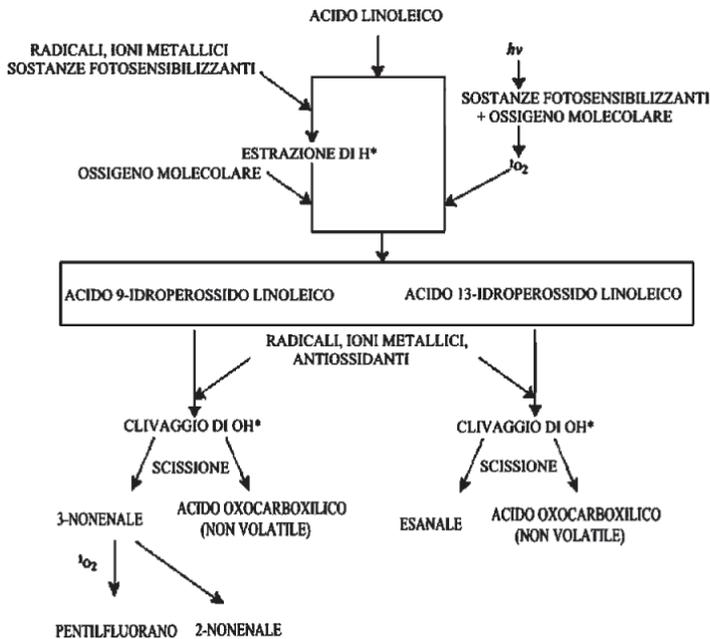
Il radicale reagisce poi con un atomo di idrogeno di un gruppo metilico posto in posizione α rispetto ad un doppio legame:



Il nuovo radicale alchene può quindi reagire con molecole di ossigeno riattivando il ciclo precedentemente descritto. Queste reazioni sono rapide per cui in presenza di elevate quantità di ossigeno numerose molecole sono facilmente trasformate. La reazione avrà termine con la completa trasformazione dei substrati - **terminazione**- (Frankel, 1984; Lehtinen, 2003).

Al termine della reazione ossidativa descritta, il livello dei perossidi accumulati nell'alimento decresce col tempo. Tale riduzione è conseguente alla rottura omolitica degli acidi grassi ossidati con formazione di aldeidi, chetoni, acidi organici, idrocarburi di lunghezza variabile, polimeri e numerosi altri composti, molti dei quali non sono ancora stati ben isolati e caratterizzati (Ottaviani, 1977).

Figura n. 3. Schema semplificato delle reazioni che si verificano durante l'ossidazione non enzimatica dell'acido linoleico nei cereali (da Min and Boff, 2002, modificato). Oltre agli idroperossidi 9 e 13, per foto-ossidazione dell'acido linoleico si formano anche gli idroperossidi 10 e 12.



Evoluzione degli idroperossidi

In assenza di attività enzimatica, che come tale comporterebbe un accumulo di idroperossidi, il tasso di decomposizione di queste molecole è determinato dalle condizioni fisico-chimiche del mezzo ovvero dalla presenza di fattori in grado di incrementare o ridurre la loro reattività (Nishiike et al., 1999; McClements and Decker, 2000; Mäkinen et al., 2000). Nei cereali stoccati, gli idroperossidi si evolvono principalmente in prodotti di rottura o scissione. Il processo ossidativo dei lipidi può tuttavia portare anche alla formazione di composti polimerici. Questi ultimi si originano principalmente a partire dagli acidi grassi altamente insaturi od in seguito a stress termici di notevole entità (Shukla and Perkins, 1991; Neff et al., 1988).

La rottura degli idroperossidi, favorita da molecole radicaliche e ioni metallici, porta alla formazione di diverse sostanze, volatili e non volatili (Figura 3). L'acido oxocarbossilico è la principale molecola non volatile originata, mentre fra i composti volatili, nei cereali stoccati, molto rappresentato è il pentilfluorano, principale prodotto di rottura dell'acido 9 idroperossido linoleico. Le aldeidi 2- e 3- nonenale sono invece rilevate a livelli molto bassi (Sjövall et al., 2000; Heiniö et al., 2001). All'esaneale è in genere attribuito un ruolo nel determinare l'alterazione dell'aroma degli alimenti vegetali durante lo stoccaggio (Yamamoto et al., 1980).

CONCLUSIONI

Lo sviluppo della rancidità con la risultante perdita di qualità e accettabilità, può verificarsi negli alimenti di origine vegetali a seguito di processi di degradazione della quota lipidica che si instaurano nelle diverse fasi della raccolta, dello stoccaggio e della lavorazione.

In questo studio la rancidità è intesa come un fattore che influenza negativamente la qualità, derivante direttamente o indirettamente dalle reazioni dei lipidi endogeni, che causano sapori, odori e proprietà funzionali indesiderabili o inaccettabili.

In tutti gli alimenti vegetali, i lipidi contengono una importante quota di acidi grassi polinsaturi che notoriamente sono suscettibili a fenomeni di tipo idrolitico ed ossidativo. Tali processi degradativi assumono entità differenti a seconda delle condizioni di stoccaggio e di lavorazione adottate.

Fra gli agenti che portano all'irrancidimento dei grassi è stato valutato il ruolo svolto dagli enzimi lipasi e lipossigenasi nonché dal fenomeno ossidativo non enzimatico.

Gli enzimi lipasi e lipossigenasi sono presenti in misura variabile negli alimenti vegetali a seconda della specie di appartenenza e la loro attività è condizionata dall'umidità, dalla temperatura e dal pH del mezzo nonché dai processi di lavorazione che consentono il contatto fra l'enzima e il substrato lipidico così come dalla presenza di fattori ad azione attivante ed inibente.

In particolare, i fattori che sono in grado di favorire i processi ossidativi possono essere così riassunti:

- *qualità delle materie prime*: sementi sottoposte a clima umido prima della raccolta, contaminate con microrganismi lipolitici (quali ad esempio i funghi), o danneggiate

fisicamente risultano ovviamente scarsamente stabili ai fini della conservazione;

- condizioni di stoccaggio - temperatura: oltre ad agire sulla cinetica molecolare comportando una riduzione della stabilità dei composti, temperature elevate facilitano la diffusione degli oli incrementando così i processi lipolitici enzimatici; - attività dell'acqua: l'enzima lipasi agisce anche ad umidità inferiori al 5%, non necessitando praticamente di acqua libera per svolgere attività idrolitica. La lipossigenasi è in grado di determinare il processo ossidativo a bassissima attività dell'acqua (0,25); - atmosfera: i processi ossidativi sono pressochè annullati solo a concentrazioni di ossigeno inferiori all'1% (molto costose da ottenere e mantenere), mentre l'irrancidimento idrolitico non viene arrestato nemmeno dallo stoccaggio in gas inerti;

- processi di lavorazione: trattamenti termici: generalmente l'inattivazione degli enzimi responsabili dell'irrancidimento avviene attraverso il calore. Lo stesso dovrebbe tuttavia essere applicato in modo tale da annullare l'azione degli enzimi senza eliminare gli antiossidanti in grado di prevenire il processo di ossidazione non enzimatica. Se il calore porta ad una redistribuzione dei lipidi e ad una parziale distruzione degli antiossidanti, la frantumazione determina un incremento della superficie esposta all'azione dell'ossigeno. Macinazione: - dimensioni delle particelle: particelle di dimensioni ridotte sono più soggette ad irrancidimento idrolitico ed ossidativo sia per una maggiore superficie esposta all'aria che per un maggior contatto fra enzimi e lipidi ridistribuiti. Miscelazione: ingredienti miscelati si degradano più rapidamente dei singoli ingredienti, in quanto frequentemente uno apporta il substrato e l'altro il catalizzatore; esempi sono dati dalla commistione di crusca e germe, miscele fra prodotti ricchi di oli e fonti di lipasi, materiali contenenti acidi grassi liberi e fonti di lipossigenasi, oppure materie contenenti catalizzatori della ossidazione non enzimatica (es. Fe, Cu). Aggiunta di inibitori: non esistono inibitori della lipasi idonei ad essere introdotti negli alimenti. L'utilizzo di appropriati antiossidanti, siano essi sintetici (es. BHA) o naturali (es. vanillina) durante le lavorazioni con impiego di calore può eventualmente ritardare il progredire dell'irrancidimento ossidativo.

RIASSUNTO

L'elevato contenuto in acidi grassi insaturi rende i lipidi vegetali particolarmente suscettibili ai fenomeni degradativi. Tali processi, che hanno luogo principalmente durante lo stoccaggio e la lavorazione degli alimenti di origine vegetale, sono rappresentati da idrolisi ed ossidazione. La via idrolitica è sostenuta dall'enzima lipasi, che può essere di origine endogena od esogena se derivante da muffe e batteri. L'azione dell'enzima si estrinseca nella formazione di acidi grassi liberi. La via ossidativa può essere di tipo enzimatico o non enzimatico. Nel primo caso è sostenuta dall'enzima lipossigenasi, particolarmente attivo nei semi delle leguminose; nel secondo caso, il processo ossidativo viene definito "autossidazione" e risulta accentuato dalla presenza di ossigeno, di molecole radicaliche, di ioni metallici, di elevate temperature e di energia luminosa. I principali prodotti della ossidazione sono gli idroperossidi, i quali sono soggetti ad ulteriore degradazione per azione enzimatica o per influenza di fattori fisico-chimici. L'insieme dei processi determina una perdita del valore nutritivo

degli alimenti e la neo formazione di diverse molecole, anche volatili, che si rendono responsabili del così detto irrancidimento della componente lipidica degli alimenti vegetali. Questi fenomeni, deleteri per la qualità dei medesimi, possono essere considerevolmente ridotti attraverso una valutazione oculata delle materie prime, delle condizioni di stoccaggio e delle tecniche di lavorazione.

Parole chiave: alimenti vegetali, lipidi vegetali, lipasi endogena ed esogena, lipossigenasi, autossidazione, rancidità.

SUMMARY

The high unsaturated free fatty acid content makes vegetal lipids particularly susceptible to degradation process. These processes, which take place mainly during storage and the processing of vegetal feeds, are represented by hydrolysis and oxidation. The hydrolysis is carried by lipase enzyme, which can be of endogenous origin or exogenous if derived from mould or bacteria. The enzyme action determines free fatty acid formation. The oxidative way can be enzymatic or non enzymatic. In the first case it is carried by lipoxygenase, active especially in legume seeds; in the second case, the oxidative process is defined "autoxidation" and is increased by the presence of oxygen, radicalic molecules, metal ion, high temperature and light energy. The main products of oxidation are hydroperoxides, that are susceptible to further degradation by enzymatic action or under the influence of physical or chemical factors. The whole process determines a loss of nutritional value of feeds and the formation of different molecules, also volatile, which are responsible for the "rancidity" of fat in vegetal feed. These processes, detrimental for their quality, can be notably reduced by a careful evaluation of the raw materials, of the storage condition and of the processing techniques.

Keywords: vegetal feed, vegetal fat, endogenous and exogenous lipase, lipoxygenase, autoxidation, rancidity.

BIBLIOGRAFIA

- Adlercreutz D., Budde H. and Wehtje E., 2002. Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction. *Biotechnology And Bioengineering*, 78(4), 403-411.
- Aizono Y., Funatsu M., Hayashi K., Inamasu M., Yamaguchi M., 1971. Biochemical studies of rice bran lipasi. Part II. Chemical properties. *Agricultural Biological Chemistry*, 35(12), 1973-1979.
- Andre E., Hou K.W., 1932. *C.R. Académie des Sciences*, p.645 (1932) et *C.R. Académie des Sciences*, 172.
- Bahri S., 2000. Lipase activity in germinating sunflower seedlings. *Biochemical Society Transaction*, 28(6), 771-773.

- Barnes P. and Galliard T., 1991. Rancidity in cereal products. *Lipid Technology*, 3:23-28.
- Baxter E.D., 1984. Recognition of two lipases from barley and green malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 90(4), 277-281.
- Berry H., Debat H., Larreta-Garde V., 1997. Excess substrate inhibition of soybean lipoxygenase-1 is mainly oxygen-dependent. *FEBS Letters*, 408, 324-326.
- Caro Y., Pina M., Turon F., Guilbert S., Mougeot E., Fetsch D.V., Attwool P. and Graille J., 2002. Plant lipases: biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(6), 693-703.
- Chow M.C. and Ho C.C., 2002. Chemical composition of oil droplets from palm oil mill sludge. *Journal of Palm Research*, 14 (1), 25-34.
- Dapron R., 1983. Characteristics of lipolytic activity in cereal products. Proc. 7th World Cereal Bread Congr. J. Holas, ed. Elsevier: Amsterdam.
- Dragoni I. e Cantoni C., Vallone L., Papa A., 1997. Condizioni generali di sviluppo delle muffe. In *Muffe Alimenti e Micotossicosi*. Città Studi Edizioni.
- Edlin D.A.N, Kille P., Sauders C.M., Jones H.D. and Harwood J.L., 2002. Study of wheat transformed with sense and anti-sense lipase genes. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases with primary accession number Q8L5T0.
- Ekstrand B., Gangby I. and Akesson G., 1992. Lipase activity in oat – distribution, pH dependence and heat inactivation. *Cereal Chemistry*, 69, 379-381.
- Farmer E.H., 1942. *J.Am.Chem.*, 500, 121.
- Feussner I. and Wasternack C., 1998. Lipoxygenase catalysed oxygenation of lipids. *Lipid-Fett*, 100(4-5), 146-152.
- Frankel E.N., 1982. Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, 22,1.
- Frankel E.N., 1984. Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 61 (12): 1908-1916.
- Fretzdorff B. and Jördens A., 1986. Vergleichende Untersuchungen zur Substratspezifität, Aktivierung und Inaktivierung von Lipoxygenasen in Getreideextrakten. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 19, 437-442.

- Frey K.J. and Hammond E.G., 1975. Genetics, characteristics, and utilization of oil in caryopses of oat species. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 358-362.
- Lehtinen P., Kaukovirta-Norja A. and Laakso S., 2000. Variation in lipid oxidation rates in cereals - a result of lipoxygenase enzyme activity or lipid availability? In 2nd European Symposium on Enzymes in grain Processing. Ed Simoinen T. and Tenkanen M., VTT Biotechnology, Espoo, 257-260.
- Galliard T., 1983. Enzymic degradation of cereal lipids. Pages 111-147 in: *Lipids in Cereal Technology*. P.J. Barnes, ed. Academic press: London.
- Galliard T., 1986. Oxygen consumption of aqueous suspensions of wheat wholemeal, bran and germ: Involvement of lipase and lipoxygenase. *J. Cereal Sci.*, 4, 33-50.
- Galliard T. Rancidity in cereal products. In: Allen JC, Hamilton RJ, eds. *Rancidity in foods*. New York: Elsevier Science Publishing Co, 1989, 141-5.
- Gallie D.R. and Young T.E., 1994. The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplast. Analysis of promoter activity, intron enhancement, and mRNA untranslated regions of expression. *Plant Physiology*, 106(3), 929-939.
- Gardner H.W., 1979. Lipid enzymes: lipases, lipoxygenase and "hydroperoxidases". In *Autooxidation in Food and Biological Systems*. Simis M.G. and M.Karel (eds). Plenum Press. New York and London, 447-504.
- Gardner H.W., 1988. Lipoxygenase pathway in cereals. In *Advances in Cereal Sciences and Technology*, Pomeranz Y., ed. Volume IX, American Association of Cereal Chemists, St.Paul, MN. 161-215.
- Guss P.L., Richardson T., Stahmann M.A., 1967. *Cereal Chem.*, 607.
- Guillamin R., 1982. The metabolism of lipids -enzimatic and non-enzymatic autoxidation -. In *PRESERVATION AND STORAGE OF GRAINS, SEED AND THEIR BY-PRODUCTS*. Cereals, oilseeds, pulses and animal feed. Lavoisier Publishing Inc.
- Hamberg M., Samuelson B., 1967. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J.Biol.Chem.*, 242, 5329.
- Heiniö R.L., Lehtinen P., Oksman-Caldentey K.M. and Poutanen K., 2002. Differences between sensory profiles and development of rancidity during long-term storage of native and processed oat. *Cereal Chemistry*, 79, 367-375.
- Heiniö R.L., Oksman-Caldentey K.M., Latva-Kala K., Lehtinen P and Poutanen K., 2001. Effect of drying treatment conditions on sensory profile of germinated oat. *Ce-*

real Chemistry, 78(6), 707-714.

- Huang A.H.C., 1992. Oil bodies and oleosin in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43, 177-200.

- Hugues M., Boivin P., Gaillard F., Nicolas J., Thiry J.M. and Richard-Forget F., 1994. Two lipoxigenases from germinated barley-heat and kilning stability. *Journal of Food Science*, 59(4), 885-889.

- Hutchinson J., Martin H. and Moran T., 1951. Location and destruction of lipase in oats. *Nature*, 167, 758-759.

- Kaukovirta-Norja A., Kotiranta P., Aurola A.M., Reinikainen P., Olkku J., and Laakso S., 1998. Influence of water processing on the composition, behavior, and oxidizability of barley and malt lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1556-1562.

- Laidman D.L. and Tavener R.J.A., 1971. Triglyceride mobilization in germinating wheat grain. *Biochemical Journal*, 124(2), 4-5.

- Lehtinen P., 2003. Reactivity of lipids during cereal processing. *Applied Biochemistry and Microbiology Report I/2003*.

- Liukkonen K.H., Montfoort A. and Laakso S., 1992. Water-induced lipid changes in oat processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 126-130.

- Liukkonen K., Kaukovirta N. and Laakso S., 1993. Elimination of lipid hydrolysis in aqueous suspension of oat flour. *Journal of Cereal Science*, 17, 255-265.

- Loury M., 1967. Journée d'étude sur l'altération oxidative des corps gras. *ITERG, Marseille*, 11.

- Ma L., Persson M., Adlercreutz P., 2002. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 1024-1029.

- Mäkinen M. and Hopia A., 2000. Effects of α -tocopherol and ascorbyl palmitate on the isomerization and decomposition of methyl linoileate hydroperoxides. *Lipids*, 35(11), 1215-1223.

- Mäkinen M., Kamal-Eldin A., Lampi A.M. and Hopia A., 2001. α -, γ - and δ -Tocopherols as inhibitors of isomerization and decomposition of *cis,trans* methyl linoleate hydroperoxides, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(5), 286-291.

- Malekian F., Rao R.M., Prinyawiwatkul W., Marshall W.E., Windhauser M., Ahmedna M., 2000. Lipase and Lipoxigenase Activity, Functionality, And Nutrient Losses in Rice Bran During Storage. LSU AgCenter Research & Extension, Bulletin Number 870.
- McClements D.J. and Decker E.A., 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282.
- Naudet M., 1967. Journée d'étude sur l'altération oxydative des corps gras. ITERG, Marseille, 25.
- Neff W.E., Frankel E.N. and Fujimoto K., 1988. Autoxidative dimerization of methyl linoleate and its monohydroperoxides, hydroperoxy epidioxides and dihydroperoxides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(4), 616-623.
- Nicolas J., Dapron R., 1977. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, p. 284.
Nicolas J., 1981. Etude des effets d'enzymes d'oxydoréduction en panification. Thesis, Paris.
- Nishiike T., Ichikawa J., Kikugawa N., Takamura H., Matoba T., 1999. Effects of amino acids, sugars, and ascorbic acid on the stability of linoleic acid hydroperoxide in the water phase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(11), 1997-2000.
- O'Connor T.P. and O'Brien N.M., 1991. Significance of lipoxygenase in fruits and vegetables. In *Food Enzymology*. Fox P.F. (ed). Elsevier Science Publishing Co., Inc.N.Y., 338-364.
- O'Connor J., Perry H.J. and Harwood J.L., 1989. Solubilization and studies of cereal lipases. *Biochemical Society Transaction*, 17(4), 687-688.
- O'Connor J., Perry H.J. and Harwood J.L., 1992. A comparison of lipase activity in various cereal grains. *Journal of Cereal Science*, 16, 153-163.
- Ottaviani P., 1977. Etude de quelques produits d'altération, thermooxydative des corps gras. Thesis, Marseille.
- Outinen M., 1999. Effect of malting on oat lipids. M.Sc Thesis, TKK.
- Pehowich D.J., Gomes A.V. Barnes J.A., 2000. Fatty acid composition and possible health effects of coconut constituents. *West Indian Med. J.*, 49(2), 128-133.
- Peterson D.M., 1999. Lipase activity and lipid metabolism during oat malting. *Cereal Chemistry*, 76(1), 159-163.

- Prevot A., 1971. Journée d'Etude sur quelques aspects analytiques des problèmes d'autoxydation. ITERG, Marseille, 26.
- Richardson T. and Hyslop, 1985. Enzymes. In Food Chemistry. Fennema, O.R. (ed). Marcel Dekker Inc., NY 2nd ed., p 447.
- Royo J., Vancanney T.G., Perez A.G., Sanz C., Stormann K., Rosahl S. and Sanchez-Serrano J.J., 1996. Characterization of three potato lipoxygenase with distinct activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. Journal of Biological Chemistry, 271(35), 21012-21019.
- Saunders, R.M., 1985. Rice bran: composition and potential food sources. Food Review International. 1(3): 465-495.
- Schmitt N.F. and Van Mechelen J.R., 1997. Expression of lipoxygenase isoenzymes in developing barley grains. Plant Science, 128(2), 141-150.
- Shiiba K., Negishi Y., Okada K. And Nagao S., 1991. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes from wheat germ. Cereal Chemistry, 68(1991) 115-122.
- Shukla V.K.S. and Perkins E.G., 1991. The presence of oxidative polymeric materials in encapsulated fish oils. Lipids, 26(1), 23-26.
- Sjövall O., Virtalaïne T., Lapveteläinen A. and Kallio H., 2000. Development of rancidity in wheat germ analyzed by headspace gas chromatography and sensory analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8), 3522-3527.
- Smouse T.H., Chang S.S., 1967. J.Am.Oil Chem. Soc., 509.
- Svensson I., Wehtje E., Adlercreutz P. and Mattiasson B., 1994. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymic esterifications. Biotechnology and Bioengineering, 44(5), 549-556.
- Takano K., 1993. Mechanism of lipid hydrolysis in rice bran. Cereal Foods World. 38(9), 695-698.
- Tappel A.L., 1961. Biocatalysts: lipoxygenase and hematin compounds. In : Lundberg W.O. (Ed). Autoxidation and Antioxidants, Vol.1, 325.
- Tappel A.L., 1963. Lipoxygenase. In Enzymes. Boyer P.D., Lardy H., Myrback K. (eds); 2nd ed. Academic Press: NY. Vol B., 275.
- Tavener R.J.A. and Laidman D.L., 1969. Induction of lipase activity in the starchy endosperm of germinating wheat grains. Biochemical Journal, 113(3), 32.

- Tzen J.T.C. and Huang A.H.C. 1992. *J. Cell Biol.* 117, 327-335.
- Urquhart A., Altosaar I., and Matlashewski G., 1983. Localization of lipase activity in oat grains and milled oat fractions. *Cereal Chemistry*, 60, 181-183.
- Van Mechelen J.R., Schuurink R.C., Smits M., Graner A., Douma A.C., Sedee N.J.A., Schmitt N.F. and Valk B.E., 1999. Molecular characterization of two lipoxygenases from barley. *Plant Molecular Biology*, 39(6), 1283-1298.
- Van der Stelt M., Noordermeer M.A., Kiss T., Van Zadelhoff G., Merghart B., Veldink G. A. and Vliegthart J. F. G. (2000) - Formation of a new class of oxylipins from *N*-acyl(ethanol)amines by the lipoxygenase pathway. *Eur. J. Biochem.* 267, 2000-2007.
- Vertucci C.W. and Roos E.E. (1990) - Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology*, 94, 1019-1023.
- Wang X., 2001. Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 211-231.
- Wehtje E. and Adlercreutz P., 1997. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(5), 798-806.
- Yamamoto A., Fujii Y., Yasumoto K. And Mitsuda H., 1980. Partial purification and study of some rice germ lipoxygenase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34(8), 1169-1177.
- Yasuhide O., Toshio M. and Aki O., 1997. Positional specificity and stereoselectivity of a lipase preparation from oat seeds acting on 1,2,3-trioxanoylglycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), 166-167.

L'IMPIEGO DELLA FARINA DI SEMI DI PISELLO (*Pisum sativum L.*) NELL'ALIMENTAZIONE DEL CONIGLIO DA CARNE.¹

Bonomi A., Bonomi B.M., Quarantelli A.

Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti. Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione. Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma.

INTRODUZIONE

Non da oggi l'utilizzazione della farina di semi di pisello (*Pisum sativum L.*) nell'alimentazione animale è oggetto di studio da parte di numerosi ricercatori soprattutto stranieri. Le risultanze ottenute dalle ricerche condotte hanno messo in luce la favorevole influenza esercitata dal prodotto sulle performances produttive e sui parametri zoeconomici dei ruminanti (1÷4) e dei monogastrici con particolare riferimento ai polli (5÷25) e ai suini (26÷29), anche se le risposte degli animali sono state caratterizzate da una certa variabilità probabilmente dovuta ai diversi protocolli sperimentali adottati dai ricercatori soprattutto per quanto concerne la formulazione dei mangimi, le cultivar utilizzate e la composizione chimico-bromatologica delle stesse nonché le dosi di impiego del prodotto.

Sulla base delle risultanze sortite da nostre indagini condotte in tema di composizione chimico-bromatologica della granella di pisello (v. tabelle dall'1 al 5) è stato possibile osservare che:

1) - la farina di semi di pisello, posta a confronto con la farina di estrazione di soia, si differenzia per un minor contenuto di protidi grezzi e di ceneri, cui fa riscontro un più elevato tenore di estrattivi inazotati, in massima parte rappresentati da amido, nonché per un maggior apporto di energia metabolizzabile;

2) - per quanto concerne il corredo in aminoacidi dei protidi in toto, la farina di semi di pisello rappresenta, rispetto alla farina di estrazione di soia, un tenore superiore di lisina, arginina, treonina, serina, glicina e metionina e inferiore di prolina, cistina, valina. Le differenze più marcate sono state registrate per la lisina e per la treonina.

Tabella n. 1 - Composizione chimica (valori medi)

Componenti		Farina di semi di pisello	Farina di estrazione di soia
Umidità	%	12.00	11.00
Ceneri gregge	% s.s.	3.00	6.00
Proteina greggia	“	28.50	50.00
Sostanze grasse gregge	“	1.80	1.90
Cellulosa greggia	“	4.70	4.85
Estrattivi inazotati	“	62.00	37.25
Amido	“	54.50	5.00
Energia metabolizzabile	Kcal/Kg s.s.	3.350	2.600

¹ Ricerche effettuate con il contributo finanziario del M.U.R.S.T. (quota 60%). Indirizzo per corrispondenza: Prof. Alberto Bonomi - Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione - Via del Taglio, 8 - 43100 PARMA. Tel. 0521 032620; fax 0521 032622; e-mail: alberto.bonomi@unipr.it

Tabella n. 2 - Contenuto in aminoacidi (valori medi)

Aminoacidi	Farina di semi di pisello		Farina di estrazione di soia	
	In 100 di s.s. con il 28,50% di protidi	In 100 di protidi il 50% di protidi	In 100 di s.s. con	In 100 di protidi
Triptofano	0.370	1.298	0.600	1.200
Lisina	2.200	7.719	3.200	6.400
Istidina	0.680	2.385	1.350	2.700
Arginina	2.490	8.736	4.000	8.000
Ac. aspartico	2.970	10.421	5.500	11.000
Treonina	1.420	4.982	1.890	3.780
Serina	1.410	4.947	2.200	4.400
Ac. glutammico	5.000	17.543	9.000	18.000
Prolina	1.270	4.456	3.900	7.800
Glicina	1.300	4.561	2.200	4.400
Alanina	1.280	4.491	2.300	4.600
Cistina	0.350	1.228	0.700	1.400
Valina	1.300	4.561	2.700	5.400
Metionina	0.360	1.263	0.600	1.200
Isoleucina	1.400	4.912	2.300	4.600
Leucina	2.000	7.017	4.000	8.000
Tirosina	0.900	3.158	1.800	3.600
Fenilalanina	1.800	6.316	1.760	3.520

Tabella n. 3 - Stima del valore biologico delle proteine.

Aminoacidi	Contenuto in aminoacidi dei protidi dell'uovo (sul 16% azoto) (Mitchell e Block)	Percentuale di deficit	
		Farina di semi di pisello	Farina di estrazione di soia
Treonina	4.9	- 0	- 22.85
Cistina	2.4	- 51.16	- 41.66
Valina	7.3	- 37.52	- 27.39
Metionina	4.1	- 69.19	- 73.00
Isoleucina	8.0	- 38.60	- 40.50
Leucina	9.2	- 31.11	- 25.00
Tirosina	4.5	- 29.82	- 28.00
Fenilalanina	6.3	- 0	- 47.50
Triptofano	1.5	- 13.46	- 20.00
Lisina	7.2	+ 6.94	+ 16.66
Istidina	2.1	- 0	- 0
Arginina	6.4	+ 36.40	+ 25.00
Fattore limitante	0	Metionina	Metionina
Valore biologico	100	58.14	55.72

- La formula di Mitchell e Block per calcolare il valore biologico è la seguente:
V.B. = 102 - 0,634 x X, dove X = percentuale di deficit del fattore limitante

Tabella n. 4 - Contenuto in elementi minerali (valori medi)

Componenti		Farina di semi di pisello	Farina di estrazione di soia
Calcio	g/Kg s.s.	1.62	3.00
Fosforo	“	4.70	8.15
Magnesio	“	1.51	3.10
Potassio	“	12.00	19.20
Sodio	“	0.40	0.85
Rame	mg/Kg s.s.	12.30	22.60
Ferro	“	110.26	160.38
Zinco	“	54.71	51.20
Manganese	“	18.20	35.40
Selenio	“	0.21	0.18
Vanadio	“	0.24	0.23
Cromo	“	0.17	0.15

Tabella n. 5 - Contenuto percentuale in acidi grassi (valori medi).

Acidi grassi		Farina di semi di pisello	Farina di estrazione di soia
Ac. miristico (C14)	%	0,348	0,083
Ac. palmitico (C16)	%	10,704	12,227
Ac. palmitoleico (C16:1)	%	tracce	0,055
Ac. stearico (C18)	%	2,485	3,891
Ac. oleico (C18:1)	%	19,993	24,022
Ac. linoleico (C18:2)	%	53,495	53,231
Ac. linolenico (C18:3)	%	12,975	6,491
Ac. grassi insaturi	%	86,463	83,799
Ac. grassi saturi	%	13,537	16,201
Insaturi/saturi	%	6,387	5,172

Tabella n. 6 – Formulazione dei mangimi di 1° periodo.

Gruppi		1	2	3
Farina di mais	Kg	25.00	22.00	19.00
Farina di orzo	“	10.00	10.00	10.00
Farina di soia (estr. 50% prot.)	“	10.00	8.00	6.00
Farina di girasole (estr. 50% prot.)	“	4.00	4.00	4.00
Farina di pesce	“	5.00	5.00	5.00
Farina di medica integrale	“	10.00	10.00	10.00
Farina di medica dis.	“	5.00	5.00	5.00
Farina di pisello	“	-	5.00	10.00
Crusca di frumento	“	20.00	20.00	20.00
Polpe secche di bietola	“	5.00	5.00	5.00
Melasso di canna	“	3.00	3.00	3.00
Carbonato di calcio	“	1.00	1.00	1.00
Fosfato bicalcico	“	1.00	1.00	1.00
Cloruro di sodio	“	0.50	0.50	0.50
Complesso vit. e oligomin (¹)	“	0.50	0.50	0.50

(¹) - Composizione del complesso vitaminico e oligominerale (per 1 kg) – Vit A: U.I. 4.000.000; Vit. D3: U.I. 400.000; Vit. E: mg 5.000; Vit. B1: mg 400; Vit. B2: mg 800; Vit. B6: mg 500; Vit. B12: mg 4; Vit. PP: mg 4.500; Ac. Pantotenico: mg 3.000; Ac. Folico: mg 300; Colina cloruro: mg 100.000; DL-metionina: mg 50.000; Co: mg 150; Fe: mg 5.000; I: mg 200; Mn: mg 15.000; Cu: mg 200; Zn: mg 10.000; Se: mg 20; supporto vegetale q.b. a g 1000.

Tabella n. 7 – Formulazione dei mangimi di 2° periodo.

Gruppi		1	2	3
Farina di mais	Kg	35.00	32.00	29.00
Farina di orzo	“	10.00	10.00	10.00
Farina di soia (estr. 50% prot.)	“	10.00	8.00	6.00
Farina di girasole (estr. 50% prot.)	“	4.00	4.00	4.00
Farina di pesce	“	2.00	2.00	2.00
Farina di medica integrale	“	8.00	8.00	8.00
Farina di medica dis.	“	5.00	5.00	5.00
Farina di pisello	“	-	5.00	10.00
Crusca di frumento	“	15.00	15.00	15.00
Polpe secche di bietola	“	5.00	5.00	5.00
Melasso di canna	“	3.00	3.00	3.00
Carbonato di calcio	“	1.00	1.00	1.00
Fosfato bicalcico	“	1.00	1.00	1.00
Cloruro di sodio	“	0.50	0.50	0.50
Complesso vit. e oligomin (¹)	“	0.50	0.50	0.50

(¹) - Composizione del complesso vitaminico e oligominerale (per 1 kg) – Vit A: U.I. 4.000.000; Vit. D3: U.I. 400.000; Vit. E: mg 5.000; Vit. B1: mg 400; Vit. B2: mg 800; Vit. B6: mg 500; Vit. B12: mg 4; Vit. PP: mg 4.500; Ac. Pantotenico: mg 3.000; Ac. Folico: mg 300; Colina cloruro: mg 100.000; DL-metionina: mg 50.000; Co: mg 150; Fe: mg 5.000; I: mg 200; Mn: mg 15.000; Cu: mg 200; Zn: mg 10.000; Se: mg 20; supporto vegetale q.b. a g 1000.

Tabella n. 8 – Analisi chimica dei mangimi composti integrati.

Periodi		1°	2°
Acqua	%	11.80	12.00
Ceneri gregge	“	6.00	5.70
Proteina greggia	“	18.00	16.00
Sostanze grasse gregge	“	4.50	4.00
Cellulosa greggia	“	11.50	10.50
Estrattivi inazotati	“	48.20	51.80

La stima, secondo Mitchell e Block (30), del valore biologico delle proteine contenute nella farina di semi di pisello e nella farina di estrazione di soia, tenuto presente che il fattore limitante per entrambi gli alimenti è costituito dalla metionina, ha permesso di ottenere valori pari, rispettivamente, a 58,14 e a 55,72;

3) - la composizione in minerali della farina di semi di pisello, a paragone con quella della farina di estrazione di soia, è caratterizzata da un più basso apporto di Ca, P, Mg, K, Na, Cu, Fe e Mn sulla base di differenze che oscillano attorno al 30%;

4) - nella frazione lipidica della farina di semi di pisello sono presenti gli

acidi miristico, palmitico, palmitoleico, stearico, oleico, linoleico e linolenico. Elevato è il contenuto di acidi grassi insaturi, i quali rappresentano circa l'86% degli acidi grassi totali. Rispetto alla farina di estrazione di soia il corredo acidico del seme di pisello si differenzia per un tenore superiore di ac. linoleico e inferiore di ac. palmitico e di ac. oleico.

Mancando in letteratura informazioni circa l'impiego della farina di semi di pisello nell'alimentazione del coniglio da carne, ci è parso interessante condurre in proposito una serie di ricerche, sulle cui risultanze intendiamo relazionare nella presente memoria.

MATERIALE E METODI

La sperimentazione ha interessato 300 conigli di razza Nuova Zelanda dell'età di circa 30 giorni, tutti maschi appena svezzati e distinti in tre gruppi di 100 soggetti cadauno, contrassegnati con i numeri dall'1 al 3.

L'allevamento, praticato in gabbie collettive (10 soggetti per ogni gabbia), in condizioni di ambiente uniformi per i vari gruppi, ha avuto la durata di 60 giorni.

I soggetti del gruppo 1, considerato di "controllo", hanno ricevuto, durante il primo periodo (dal 30° al 60° giorno) ed il secondo (dal 61° al 90° giorno) due mangimi completi, la cui composizione è raccolta nelle tabelle nn. 6 e 7.

Per l'alimentazione dei gruppi 2 e 3, considerati "di esperimento", si è provveduto con gli stessi mangimi addizionati però di farina di semi di pisello alle rispettive dosi del 5% e del 10% in sostituzione parziale della farina di estrazione di soia e della farina di mais, sulla base di una formulazione che ha subito i necessari aggiustamenti atti a consentire che i medesimi mangimi risultassero, nei confronti di quello di "controllo", isoproteici, isominerali ed isoenergetici.

Nella tabella n. 8 sono riportati i risultati dell'analisi chimica effettuata sui mangimi di 1° e di 2° periodo. La determinazione del contenuto in principi immediati è stata effettuata secondo la tecnica consigliata dalla C.V.A. dell'ASP (31).

Nel corso ed al termine della prova istituita sono stati effettuati i seguenti rilievi:

- a) - il controllo giornaliero dello stato di salute degli animali;
- b) - la verifica dell'incremento ponderale individuale e del consumo di alimenti;
- c) - la determinazione di alcuni parametri ematici.

Sui campioni di sangue, prelevati da 10 soggetti scelti nell'ambito di ciascun gruppo, sono stati determinati i contenuti di proteine totali, di albumina, di globuline, di glucosio, di fosfatasi alcalina, di bilirubina totale, di colesterolo totale, di col. HDL, di col. LDL, di trigliceridi, di fosfolipidi, di lipidi totali, di lipoproteine a e b, con kit della Boehringer Italia;

- d) - il controllo della resa di macellazione e la valutazione delle carcasse alla spoltatura;
- e) - l'analisi chimico-bromatologica della carne secondo la metodica A.O.A.C. (32);
- f) - la determinazione della digeribilità pepsinica "in vitro" della carne, secondo la ben nota tecnica di Sjollema - Wedemeyer;
- g) - la valutazione della tenerezza della carne, secondo il procedimento proposto da Schömberg e Lochmann, elaborato da Krüger (33) e basato sull'impiego della tripsina, adottando gli accorgimenti resi noti da uno di noi in altra memoria (34), alla quale si rimanda;

h) - la valutazione del colore della cute. Le percentuali medie di riflessione a diverse lunghezze d'onda sono state determinate per via spettrofotometrica con apparecchio Unigalvo.

I dati ottenuti a seguito delle indagini effettuate sono stati sottoposti ad analisi della varianza secondo il metodo dei minimi quadrati, adottando il seguente modello:

$$Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$$

dove

Y_{ij} = singola osservazione;

μ = media generale;

a_i = effetto della dose ($i = 1, \dots, 3$);

e_{ij} = effetto casuale residuo.

RISULTATI E DISCUSSIONE

A) - Lo stato di salute.

I conigli che hanno ricevuto il mangime contenente la farina di semi di pisello alle dosi del 5% e del 10% sono stati caratterizzati da uno stato di salute buono nel corso dell'intero periodo di allevamento. Analogamente ai controlli il sensorio e le grandi funzioni organiche hanno manifestato uno svolgimento del tutto regolare.

Il tasso di mortalità è risultato basso, avendo oscillato fra il 3% e il 5%.

Tabella n. 9 – Accrescimento ponderale (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3
Soggetti	n.	100	100	100
Durata della prova	d	60	60	60
Pesi medi iniziali (30° d)	g	700,40 \pm 30,00	715,10 \pm 34,12	721,36 \pm 35,30
Pesi medi al 60° d	g	1.750,21 \pm 85,10	1.800,36 \pm 90,11	1.820,40 \pm 88,36
Pesi medi al 90° d	g	2.800,34 \pm 110,12	2.860,20 \pm 105,30	2.875,39 \pm 107,41

Tabella n. 10 – Incrementi ponderali giornalieri (valori medi).

Gruppi		1	2	3
30° - 60° d	g	35.00	36.00	36.60
61° - 90° d	g	35.00	36.30	36.50
30° - 90° d	g	35.00	36.15	36.55

Tabella n. 11 – Indice di conversione - Kg di mangime/Kg p.v. (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3
30° - 60° d	Kg	3.65 \pm 0.18	3.53 \pm 0.21	3.50 \pm 0.23
61° - 90° d	Kg	4.20 \pm 0.30	3.98 \pm 0.28	3.95 \pm 0.31
30° - 90° d	Kg	3.90 \pm 0.26	3.75 \pm 0.29	3.70 \pm 0.30

Tabella n. 12– Parametri ematici (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3
Proteine totali	g/100 ml	6.30 \pm 0.18	6.37 \pm 0.16	6.40 \pm 0.19
Albumina	“	2.24 \pm 0.15	2.26 \pm 0.13	2.28 \pm 0.12
Globuline	“	4.06 \pm 0.20	4.11 \pm 0.24	4.12 \pm 0.21
Glucosio	mg/100 ml	100.10 \pm 8.40	104.20 \pm 8.68	106.31 \pm 8.73
Colesterolo tot.	“	130.16 \pm 10.60	126.50 \pm 10.30	125.11 \pm 10.12
Colesterolo HDL	“	35.58 \pm 9.30	30.36 \pm 9.70	28.60 \pm 10.00
Colesterolo LDL	“	70.64 \pm 11.12	66.25 \pm 11.10	64.23 \pm 11.34
Trigliceridi	“	129.60 \pm 16.30	120.72 \pm 16.00	117.15 \pm 16.24
Bilirubina tot.	“	1.40 \pm 0.15	1.34 \pm 0.13	1.31 \pm 0.11
Fosfolipidi	“	100.12 \pm 13.10	100.00 \pm 13.30	96.64 \pm 13.00
Fosfatasi alcalina	mU/ml	80.21 \pm 12.20	74.18 \pm 12.00	71.30 \pm 12.15

Tabella n. 13 – Parametri ematici (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3
Lipidi totali	mg/100 ml	430.16 \pm 15.10	424.11 \pm 13.80	421.60 \pm 13.66
Lipoproteine α	%	30.20 \pm 10.24	34.50 \pm 10.30	37.11 \pm 10.28
Lipoproteine β	%	69.80 \pm 10.24	65.50 \pm 10.30	62.89 \pm 10.28
Rapporto β/α		2.31 \pm 0.65	1.90 \pm 0.68	1.70 \pm 0.69

B) - L'incremento ponderale ed il consumo di alimenti.

I conigli sono stati pesati individualmente al 30°, al 60° e al 90° giorno di età.

Nella tabella n. 9 sono raccolti i risultati ottenuti a seguito dell'elaborazione matematico-statistica condotta sui dati primitivi, mentre nella tabella n. 10 sono riportati i valori medi relativi agli incrementi ponderali giornalieri.

Dall'esame delle tabelle si evince che la farina di semi di pisello alle dosi del 5% (gruppo 2) e del 10% di mangime (gruppo 3) non ha costituito fonte di variazione per la velocità di crescita; nei confronti dei controlli (gruppo 1) le differenze non hanno raggiunto la significatività statistica ($P>0,05$).

Nella tabella n. 11 figurano i valori relativi ai consumi medi di mangime occorsi per la produzione di 1Kg di peso vivo. Gli stessi valori mettono in luce che la farina di semi di pisello alle dosi del 5% e del 10% non ha condizionato, positivamente o negativamente, l'utilizzazione dell'alimento.

C) - I parametri ematici.

Le indagini condotte sui campioni di sangue prelevati al 30°, al 60° e al 90° giorno di età, hanno fornito le risultanze riportate nelle tabelle nn. 12 e 13, risultanze, in base alle quali è possibile accertare che:

- i contenuti di proteine totali, di albumina e di globuline sono rimasti entro i limiti della normalità senza denunciare variazioni ($P>0,05$) riferibili all'impiego nel mangime della farina di semi di pisello alle dosi del 5% e del 10%;

- il tenore di glucosio è stato caratterizzato da valori superiori nei conigli, ai quali è stato somministrato mangime contenente la farina di semi di pisello alle dosi del 5% e del 10%, sulla base però di differenze, rispetto ai controlli, che non hanno trovato conferma ($P>0,05$);

- i tassi di bilirubina totale, di colesterolo totale, di col. HDL, di col. LDL, di trigliceridi, di fosfatasi alcalina, di fosfolipidi e di lipidi totali sono risultati più bassi nei conigli che hanno assunto mangime, in cui ha trovato posto la farina di semi di pisello alle dosi del 5% e del 10%, in virtù però di differenze, nei confronti dei controlli, che non sono significative ($P>0,05$);

- le lipoproteine α e β , determinate nel sangue dei conigli che sono stati trattati con la farina di semi di pisello alle dosi del 5% e del 10%, hanno fatto registrare valori rispettivamente più alti e più bassi rispetto al lipidogramma dei controlli, sulla base però di differenze non significative ($P>0,05$).

Tabella n. 14 – Rilievi di macellazione a caldo (% p.v. - valori medi \pm D.S.).

Gruppi	1	2	3
Carcassa	48.30 \pm 1.10	48.72 \pm 1.15	48.90 \pm 1.17
Quarti anteriori	13.50 \pm 0.52	13.68 \pm 0.56	13.85 \pm 0.60
Quarti posteriori	17.26 \pm 0.66	17.41 \pm 0.70	17.68 \pm 0.71
Lombo	17.00 \pm 0.54	17.26 \pm 0.56	17.39 \pm 0.58
Carne	32.00 \pm 0.90	32.48 \pm 0.95	32.63 \pm 1.00
Grasso	3.20 \pm 0.70	3.00 \pm 0.64	2.88 \pm 0.68
Ossa	12.75 \pm 1.00	12.52 \pm 1.10	12.27 \pm 1.05
Testa e collo	11.00 \pm 1.12	10.81 \pm 1.15	10.70 \pm 1.19
Pelle	12.50 \pm 0.60	12.30 \pm 0.57	12.24 \pm 0.58
Stinchi, zampe e coda	3.00 \pm 0.50	2.75 \pm 0.58	2.60 \pm 0.61
Fegato	3.40 \pm 0.40	3.52 \pm 0.46	3.58 \pm 0.48
Milza, cuore, polmoni, reni e testicoli	3.00 \pm 0.50	2.81 \pm 0.47	2.70 \pm 0.51
Stomaco pieno	4.56 \pm 0.70	4.60 \pm 0.75	4.68 \pm 0.71
Intestino pieno	12.38 \pm 1.00	12.20 \pm 0.96	12.10 \pm 0.94

Tabella n. 15 – Composizione chimico-bromatologica della carne (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3
Acqua	%	72.20 \pm 0.58	72.45 \pm 0.61	72.63 \pm 0.63
Ceneri gregge	“	1.34 \pm 0.10	1.32 \pm 0.09	1.30 \pm 0.07
Proteina greggia	“	22.40 \pm 0.43	22.62 \pm 0.48	22.70 \pm 0.51
Sostanze grasse gregge	“	3.00 \pm 0.28	2.82 \pm 0.30	2.80 \pm 0.34

Tabella n. 16 – Digeribilità pepsinica “in vitro” della carne (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3
Proteine totali	%	22.40 \pm 0.43	22.62 \pm 0.48	22.70 \pm 0.51
Proteine indigerite	“	3.00 \pm 0.31	2.85 \pm 0.35	2.76 \pm 0.38
Proteine digeribili	“	19.40 \pm 0.68	19.77 \pm 0.70	19.94 \pm 0.65
Coefficiente di digeribilità	“	86.60 \pm 1.35	87.40 \pm 1.40	87.80 \pm 1.51

D) – Le rese di macellazione.

Su 20 conigli, scelti nell'ambito di ciascun gruppo e sacrificati dopo un periodo di digiuno di 12 ore, sono state controllate le rese in carcassa, quarti anteriori e posteriori, regione lombare, carne, grasso di deposito, ossa, testa e collo, pelle, stinchi, zampe e coda, fegato, complesso “milza, cuore, polmoni, reni e testicoli”, stomaco e intestino.

I risultati ottenuti, compendati nella tabella n.14, permettono di osservare che per tutti i parametri considerati le differenze fra i controlli e i soggetti di esperimento non sono significative ($P>0,05$).

E) - La composizione chimico-bromatologica della carne.

I campioni di carne sono stati sottoposti, previa omogeneizzazione, a disidratazione e successivamente ridotti in polvere prima di procedere alle varie indagini di ordine chimico. E' stata effettuata la determinazione del contenuto in acqua, in ceneri gregge, in proteina greggia e in grasso greggio.

I risultati ottenuti, raccolti nella tabella n. 15, mettono in luce che la composizione chimico-bromatologica della carne non è stata oggetto di modificazioni ($P<0,05$) riferibili ai particolari regimi alimentari adottati.

F) - La digeribilità pepsinica “in vitro” della carne.

Sulla carne essiccata e sgrassata, è stata determinata la digeribilità, adottando il metodo proposto da Sjollema-Wedemeyer.

I valori relativi alla proteina totale, digeribile, indigerita nonché al coefficiente di digeribilità, sono riportati nella tabella n. 16. Gli stessi valori pongono in evidenza che la carne dei conigli alimentati con mangime contenente la farina di semi di pisello alle dosi del 5% e del 10% è caratterizzata da una digeribilità statisticamente non diversa da quella della carne dei controlli ($P>0,05$).

Tabella n. 17 – Digestione tripsinica “in vitro” della carne. Sostanza indigerita espressa in % sulla carne essiccata e sgrassata (valori medi \pm D.S.).

Gruppi	Sostanza indigerita
1	3.00 \pm 0.42
2	2.85 \pm 0.45
3	2.71 \pm 0.40

G) - La tenerezza della carne.

Per la valutazione della tenerezza della carne è stato utilizzato il procedimento consigliato da Schönberg e Lochmann, elaborato da Krüger, basato sull'impiego della tripsina.

Con il medesimo procedimento si opera su carne essiccata e sgrassata che viene sottoposta a digestione enzimatica per 96 ore. Al termine di tale periodo la sostanza indigerita è rappresentata quasi totalmente dal tessuto connettivo.

Nella tabella n. 17 sono riportate le risultanze ottenute, le quali consentono

di rilevare che la carne dei conigli che hanno ricevuto mangime contenente la farina di semi di pisello alle dosi del 5% e del 10% ha all'attivo una tenerezza pressoché simile a quella che contraddistingue la carne dei controlli. Le differenze fra i contenuti di sostanza indigerita non sono risultate significative ($P > 0,05$).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti a seguito delle nostre indagini permettono la formulazione delle seguenti considerazioni e conclusioni:

1) - per la sua composizione chimica la farina di semi di pisello deve essere considerato come un alimento in possesso di un buon tenore di proteine, di un tasso di ceneri e di fibra grezza abbastanza basso e di un elevato contenuto di estrattivi inazotati, in massima parte rappresentati da amido. Esso è inoltre caratterizzato da una frazione lipidica particolarmente ricca degli acidi oleico, linoleico e linolenico e da protidi che denunciano una buona disponibilità biologica per tutti gli aminoacidi essenziali fatta eccezione per la metionina che rappresenta il fattore limitante. Il valore biologico delle proteine presenti nella farina di semi di pisello è pressoché analogo a quello della farina di estrazione di soia, che pure trova il suo fattore limitante nella metionina. Rispetto alla soia il pisello dovrebbe avere, tuttavia, funzione integrante in quanto si avvantaggia per almeno due aminoacidi indispensabili, precisamente la lisina e l'arginina;

2) - le caratteristiche della farina di semi di pisello sono sostanzialmente quelle di un mangime che può trovare buone possibilità di sfruttamento nell'alimentazione degli animali di interesse zootecnico;

3) - il prodotto, aggiunto ai mangimi per i conigli da carne alle dosi del 5% e del 10% in parziale sostituzione della farina di estrazione di soia e della farina di mais sulla base di una formulazione che ha subito i necessari aggiustamenti atti a consentire che i medesimi mangimi risultassero, nei confronti di quello di "controllo", isoproteici, isominerali e isoenergetici, non ha influenzato, positivamente o negativamente, lo stato di salute e l'efficienza produttiva degli animali.

Circa il dosaggio della farina di semi di pisello siamo d'avviso che la stessa possa trovare impiego nel mangime per una quota aggirantesi attorno al 10%.

In corrispondenza di tale dosaggio il prodotto risulta soprattutto conveniente dal punto di vista economico in quanto favorisce una riduzione dei costi per la possibilità di integrazione e di sostituzione che esso è in grado di offrire.

Nota - Il piano, l'esecuzione delle indagini e le conclusioni spettano in parti uguali agli Autori (A. Bonomi).

RIASSUNTO

Gli Autori riferiscono e commentano i risultati ottenuti a seguito di ricerche condotte allo scopo di esaminare la possibilità di impiego nell'alimentazione del coniglio da carne della farina di pisello proteico (*Pisum sativum L.*).

La medesima farina, prevista nei mangimi composti integrati alle dosi del 5% e del 10%, in sostituzione parziale della farina di estrazione di soia e di altri componenti così da realizzare diete isoproteiche, isominerali e isoenergetiche, non

produce modificazioni nello stato di salute, non influenza negativamente l'appetibilità della razione e non agisce sfavorevolmente sul metabolismo dei soggetti.

L'accrescimento ponderale, gli indici di conversione e le rese di macellazione non vengono condizionati in misura significativa dal trattamento in corrispondenza di ciascuno dei due dosaggi presi in considerazione.

Sulla scorta dei reperti registrati, gli Autori affermano che la farina di pisello proteico è un alimento degno del massimo interesse per le possibilità di integrazione e di sostituzione che esso offre. Per quanto attiene il dosaggio, essi consigliano quote comprese fra il 5% e il 10%.

Parole chiave: farina di pisello, conigli da carne, efficienza produttiva.

Summary - The use of pea meal (*Pisum sativum L.*) in the rabbits feeding

The Authors report on the results obtained from studies concerning the use of proteic pea (*Pisum sativum L.*) meal in rabbits feeding. Added at the doses of 5% and 10% of mixed feeds in isoproteic diets, in partial substitution of soybean meal and other components, pea meal does not affect the state of health, the diet palatability and the animal metabolism.

The weight gain, the feed efficiency and the dressing percentages are not significantly conditioned by single treatments.

In conclusion the Authors assert that pea meal is valuable feed, as regards its integration and substitution capabilities.

Doses between 5% and 10% are advisable, but there are no reason for rejecting higher doses.

Key words: pea meal, rabbits, productive efficiency.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BONOMIA., BONOMI B.M., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHIA. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum L.*) nell'alimentazione dei vitelli in fase di svezzamento . Riv. Sci. Alim. In corso di stampa.
- 2) BONOMI A., BONOMI B.M., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum L.*) nell'alimentazione delle manzette e delle manze. Riv. Sci. Alim. In corso di stampa.
- 3) BONOMI A., BONOMI B.M., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum L.*) nell'alimentazione delle bovine da latte. Riv. Sci. Alim. In corso di stampa.
- 4) BONOMIA., BONOMI B.M., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHIA. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum L.*) nell'alimentazione dei vitelloni. Riv. Sci. Alim. In corso di stampa.
- 5) QUARANTELLI A., BONOMI A. (1991) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum L.*) nell'alimentazione dei broilers. Rivista di Avicoltura, 3, 35-39.
- 6) QUARANTELLI A., BONOMI A. (1992) - La farina di semi di pisello (*Pisum*

- sativum L.) nell'alimentazione delle galline ovaiole. *Annali Fac. Med. Vet. di Parma*, 12, 117-132.
- 7) REDDY S.J., MC GINNIS J., MUEHLBAUER F., CAMPBELL A. (1979) - Methionine content and availability in varieties and breeding lines of peas for chicks. *Poultry Sci.*, 58, 376-381.
 - 8) BAJAJ S., MICKELSEN O., BAKER L.R., MARKARIAN D. (1971) - The quality of protein in various lines of peas. *Br. J. Nutr.*, 25, 207-212.
 - 9) VALDEBOUZE P. (1977) - Trypsin inhibiting and haemagglutinating activities in seeds of some legume species. *Prot. Qual. Leg. Crops.*, Commission of the European Communities ed., EUR 5686 EN, 87-98.
 - 10) CHRISTIANSEN M.P., KNUDSEN K.E.B., JAKOBSEN I., EGGUM B.O. (1985) - Nutritive value of different pea varieties. *Statens Husdyrbrugsforsog. Meddelse No. 587*.
 - 11) JOHNS D.C. (1987) - Influence of trypsin inhibitors in four varieties of peas (*Pisum sativum*) on the growth of chickens. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30, 169-175.
 - 12) DE MUELENAERE H.J.H. (1965) - Toxicity and haemagglutinating activity of legumes. *Nature*, 206, 4986, 827-828.
 - 13) BIENGEFORS S. (1975) - Anti-nutritional substances in peas. *Sveriges Utsadesforenings Tidskrift*, 85, 211-219.
 - 14) VALDEBOUZE P., BERGERON E., GABORIT T., DELORT-LAVAL J. (1980) - Content and distribution of trypsin inhibitors and haemagglutinins in some legume seeds. *Canadian Journal of Plant Science*, 60, 695-701.
 - 15) LUCBERT J., CASTAING J., CAMPREDON PH. (1988) - Influence of trypsin inhibitor activity of peas on the performance of broilers. *Proceeding XVIII World's Poultry Congress, Nagoya, September 4-9 (Japan)*.
 - 16) KIENHOLZ E.W., JENSE L.S., MC GINNIS J. (1962) - Evidence for chick growth inhibitors in several legume seeds. *Poultry Sci.*, 41, 367-371.
 - 17) CARRE' B., ESCARTIN R., MELCION J.P., CHAMP M., ROUX G, LECLERQ B. (1987) - Effects of pelleting and association with maize or wheat on the nutritive value of smooth pea (*Pisum sativum*) seeds in adult cockerels. *Br. Poultry Sci.*, 28, 219-229.
 - 18) WURZNER H., LETTNER F., EDER J. (1988) - Peas (*Pisum sativum* L.) and field beans (*Vicia faba* L.) in diets for broiler chickens. *Bodenkultur*, 39, 259-268.
 - 19) LETTNER VON F., STELZL J., WURZNER H. (1985) - Inset of peas (*Pisum sativum* L.) in the broiler ration I. Influence on the fattening slaughtering characteristics. *Die Bodenkultur*, 36, 339-347.
 - 20) LETTNER VON F., FURST T., WURZNER H. (1986) - Inset of peas (*Pisum sativum* L.) in the broiler ration II. Influence of the meat quality. *Die Bodenkultur*, 37, 187-192.
 - 21) VOGT H. (1984) - Nutritional values of peas in chicken feeds. *Landbanforsch Voelkenrode*, 34, 39-47.
 - 22) BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A., SUPERCHI P., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHIA. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello

- (*Pisum sativum* L.) nell'alimentazione delle faraone da carne. Riv. Sci. Alim. in corso di stampa.
- 23) BONOMI A., BONOMI B.M., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum* L.) nell'alimentazione delle anatre da carne. Riv. Sci. Alim. in corso di stampa.
 - 24) BONOMI A., BONOMI B.M., MAZZOTTI A., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum* L.) nell'alimentazione del tacchino da carne. Riv. Sci. Alim. in corso di stampa.
 - 25) BONOMIA., QUARANTELLI A., LUCCHELLI L., SABBIONIA., SUPERCHI P., BONOMI ANTONELLA (1986) - Trattamento di espansione della soia integrale: effetti di varie condizioni operative sull'attività ureasica, antitripsinica e sulle caratteristiche chimico-biologiche. Riv. Soc. It. Sci. Alim., 17, 109-112.
 - 26) BONOMI A. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum* L.) nell'alimentazione dei suini in fase di svezzamento. Suinicoltura. In corso di stampa.
 - 27) BONOMI A. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum* L.) nell'alimentazione dei suini all'ingrasso. Suinicoltura. In corso di stampa.
 - 28) BONOMI A. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum* L.) nell'alimentazione dei suini produttori di carne da consumare fresca. Suinicoltura. In corso di stampa.
 - 29) BONOMI A. (2003) - L'impiego della farina di semi di pisello (*Pisum sativum* L.) nell'alimentazione delle scrofe. Suinicoltura. In corso di stampa.
 - 30) MITCHELL HH. e BLOCK RJ. (1946) - Comparative nutrition of man and domestic animals. J. Biol. Chem., 163, 599.
 - 31) A.S.P.A. - Commissione Valutazione Alimenti (1980) - Valutazione degli alimenti di interesse zootecnico. 1. Analisi chimica. Zoot. Nutr. Anim., 6, 1, 19-31.
 - 32) A.O.A.C. (1984) - Official Methods of Analysis, Washington D.C., Association of Official Analytical Chemists, 14th Ed.
 - 33) KRUGER H. (1965) - "Ein Beitrag zur Obiektiven Bestimmung der Fleischqualität von Jungmastrindern". Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
 - 34) BONOMI A. (1975) - "Caratteristiche chimico-biologiche della carne di selvaggina in allevamento industriale". Avicoltura, 44, 3, 67.

CONTROLLO MICROBIOLOGICO DI CALAMARI (*Loligo spp.*) CONGELATI E DECONGELATI: APPLICAZIONE DI UN PIANO HACCP

**Silvia Bonardi¹, Cristina Bacci¹, Carlo Maria Bresciani²,
Marina Tiberto³, Simone Bertini⁴**

1. Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma
2. Gialloblu S.r.L., Laboratorio Analitico, Milano
3. Veterinario Libero Professionista
4. Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Endocrinologia e Farmacologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma

INTRODUZIONE

I cefalopodi, quali calamari, polpi, seppie, vengono normalmente importati in Italia da ditte specializzate che si riforniscono da paesi europei ed extraeuropei. I prodotti vengono importati allo stato congelato e sono solitamente venduti come prodotti scongelati e lavorati per dare origine ad un prodotto finito di migliore qualità organolettica. Tale processo di lavorazione, definito “arrotatura”, consiste nello scongelamento del prodotto con acqua potabile e nella successiva agitazione meccanica dei molluschi. Infine i cefalopodi vengono “arrotati” con una macchina rotativa, allo scopo di ammorbidirne le carni.

Le aziende che operano nel settore devono ovviamente mettere a punto e rispettare un piano HACCP che, nello specifico, prevede diversi controlli sia sui cefalopodi importati congelati sia sul prodotto finito scongelato e lavorato in Italia. Le cinque aziende italiane di cui ci siamo occupati hanno impostato il loro piano di autocontrollo dopo un periodo di verifica durato sei mesi, durante il quale il laboratorio addetto all’esecuzione delle analisi microbiologiche ha monitorato con particolare attenzione i prodotti ittici importati e i prodotti “arrotati” ottenuti dal processo di lavorazione.

Il piano HACCP che attualmente è stato adottato dalle aziende oggetto della nostra indagine comprende, per quanto riguarda il controllo microbiologico, analisi non solo dei prodotti congelati e scongelati, ma anche dell’acqua potabile, del ghiaccio autoprodotta, nonché diversi controlli di tipo ambientale sulle attrezzature, sui macchinari, sui servizi igienici e sugli operatori (camici, guanti, mani, ecc.). Nel piano HACCP sono indicati con esattezza le modalità del campionamento, il numero annuo di campioni da prelevare sulla base della quantità di prodotti importati e lavorati da parte delle diverse aziende, il tipo di esami microbiologici ed i limiti microbiologici per le diverse specie ittiche. In particolare, non essendo stati fissati nel nostro paese dei limiti analitici per i cefalopodi, il presente lavoro acquisisce un’importanza particolare, insita nel tentativo di “normare” un settore alimentare ancora scoperto.

Lo scopo principale del presente lavoro è quello di fornire un profilo microbiologico, il più possibile esauriente anche se ristretto ad alcuni parametri analitici, di un prodotto della pesca, quale il calamaro, il cui consumo e la cui apprezzabilità sono larga-

mente diffuse nel nostro paese.

MATERIALI E METODI

Nel triennio 2000-2002, 105 lotti di calamari (*Loligo* spp.) importati da paesi europei ed extraeuropei sono stati sottoposti a controllo microbiologico da parte di cinque aziende italiane addette all'importazione e lavorazione di prodotti ittici congelati. I campioni analizzati sono rappresentati da 53 lotti di calamari congelati, due dei quali rappresentati da ciuffi di calamari, e 52 lotti del prodotto scongelato e lavorato dalle ditte con un procedimento atto ad ammorbidirne la carne, definito "arrotatura". Il paese da cui è stata importata la maggior parte dei lotti di calamari è rappresentato dalla Spagna. Ben 38 partite delle 53 esaminate (71,7%) sono di provenienza iberica. Altre partite di calamari provengono da paesi extraeuropei, quali Sud-Africa (tre lotti), Brasile (un lotto), Argentina (un lotto di ciuffi di calamari), Perù (un lotto di ciuffi di calamari), Isole Falkland (un lotto). Per otto lotti di calamari non erano disponibili informazioni sulla provenienza del prodotto.

I controlli analitici hanno rispettato i dettami dei piani di autocontrollo delle diverse aziende, basati sull'applicazione dei principi HACCP. In particolare, per i prodotti in oggetto, il piano HACCP prevedeva la ricerca della conta aerobia mesofila totale, della conta psicrofila, il conteggio dei coliformi totali, degli enterococchi, di *Escherichia coli* e di *Staphylococcus aureus* coagulasi e DNA-asi positivi.

Per quanto riguarda le metodiche analitiche impiegate dal laboratorio incaricato di eseguire le analisi, va premesso che la diluizione dei campioni è stata eseguita in acqua peptonata allo 0,1%, secondo la norma ISO/FDIS 6887-1/1998. Per il conteggio dei batteri aerobi mesofili si è seguita la norma ISO 4833/1991, utilizzando il terreno Plate Count Agar (PCA) ed incubando le piastre a 30° C per 72 ore. La conta dei batteri psicrofili è stata eseguita seminando i campioni su PCA, incubato a 4° C per 10 giorni. La norma ISO 4832/1991 è stata di riferimento per la ricerca ed il conteggio dei coliformi totali, impiegando il terreno Violet Red Bile Agar (VRBA) ed incubando le piastre a 37° C per 24 ore. La ricerca degli enterococchi è stata eseguita impiegando il terreno Kanamicina Azide Agar (KA) e confermando le colonie sospette secondo il metodo proposto da Mossel *et al.* (1978). Per il conteggio di *E. coli* è stato utilizzato il terreno VRBA addizionato del substrato 4-metil-umbelliferil-b-D-glucuronide (VRBA-MUG) e le piastre sono state incubate a 37° C per 24 ore. La ricerca ed il conteggio di *S. aureus* coagulasi e DNA-asi positivi sono stati eseguiti nel rispetto della norma ISO 6888/1983, che prevede la semina su terreno di Baird-Parker addizionato di un'emulsione al tuorlo d'uovo e tellurito di potassio (Egg Yolk Emulsion) ed incubazione a 37° C per 48 ore.

Il laboratorio d'analisi ha fissato dei limiti di tolleranza, in assenza di limiti microbiologici sanciti da atti legislativi, per i parametri analitici inclusi nei piani di autocontrollo. Tali limiti sono stati desunti dai valori medi dei risultati analitici ottenuti dal laboratorio stesso durante un periodo di sei mesi. I limiti di tolleranza suddetti consistono in 500.000 UFC/g per la carica batterica totale aerobia e la carica totale psicrofila, 1.000 UFC/g per i coliformi totali, 500 UFC/g per gli enterococchi, 100 UFC/g per *E. coli* nonché per *S. aureus* coagulasi positivi e DNA-asi positivi.

RISULTATI

I lotti di calamari congelati hanno presentato valori contenuti di carica batterica aerobia totale, inferiore al limite di tolleranza di 500.000 UFC/g nel 96,2% dei campioni (51 campioni su 53), come illustrato nella figura n° 1. Il valore medio della carica batterica aerobia totale si è attestato su 105.540 UFC/g. Nei due campioni che hanno superato il valore soglia si è rilevata la presenza di 2.400.000 UFC/g (calamari congelati importati dal Brasile) e di 1.320.000 UFC/g (ciuffi di calamari congelati provenienti dall'Argentina).

La carica batterica psicrofila totale ha rispettato il valore limite di 500.000 UFC/g nel 90,6% dei campioni, in quanto solo 5 lotti di calamari su 53 hanno presentato valori superiori (figura n° 1). Il valore medio della carica batterica psicrofila è risultato di 226.520 UFC/g. Tra i campioni che non hanno rispettato il limite di tolleranza si sono registrati valori di 650.000 UFC/g, 920.000 UFC/g (prodotti importati dalla Spagna), 690.000 UFC/g (calamari di provenienza ignota), 2.920.000 UFC/g (calamari importati dal Brasile) e 3.400.000 UFC/g (ciuffi di calamari importati dall'Argentina).

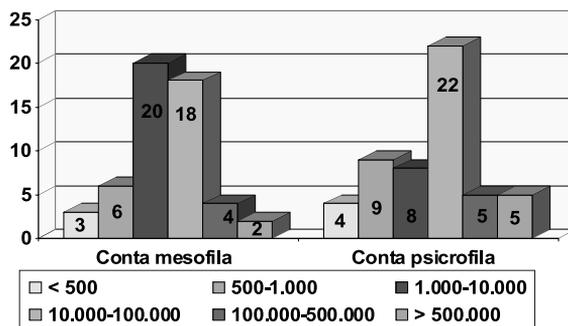


Figura 1 : Distribuzione dei valori della conta batterica aerobia mesofila totale e della conta batterica psicrofila totale nei lotti di calamari congelati.

Tra i microrganismi spia di inadeguate condizioni igieniche di lavorazione, quali coliformi totali ed enterococchi, solo i primi hanno superato il limite di tolleranza di 1.000 UFC/g nel 3,8% (2/53) dei lotti esaminati. In tali campioni si sono registrati valori di coliformi fecali pari a 1.900 UFC/g (ciuffi di calamari importati dall'Argentina) e di 18.000 UFC/g (calamari importati dalla Spagna). Il valore di *E. coli*, indicatore di contaminazione fecale, è sempre stato al di sotto del limite di rilevazione del metodo analitico, vale a dire < 5 UFC/g di prodotto. Solo un campione, pari all'1,9%, è risultato contaminato da *S. aureus* coagulasi e DNA-asi positivi in quantità superiore al limite di 100 UFC/g e precisamente da 1.000 UFC/g (calamari importati dalla Spagna).

Il prodotto finito, vale a dire i calamari "arrotati", hanno presentato valori di carica batterica aerobia totale sempre al di sotto del limite di tolleranza di 500.000 UFC/g, con un valore medio di 27.651 UFC/g (figura n° 2).

La conta psicrofila totale ha superato il valore limite solo in 2 lotti sui 52 esaminati,

vale a dire nel 3,8% dei casi (figura n° 2). In particolare, si sono rilevati valori di 670.000 UFC/g in un prodotto lavorato ottenuto da ciuffi di calamari originari del Perù e di 3.500.000 UFC/g in un prodotto finito ottenuto da calamari di origine spagnola. Il valore medio della conta psicofila si è attestato su 138.674 UFC/g.

I coliformi totali hanno superato il valore limite di 1.000 UFC/g nel 3,8% dei lotti esaminati (2 campioni su 52), con valori di 3.200 UFC/g (prodotto finito ottenuto da ciuffi di calamari provenienti dal Perù) e di 4.000 UFC/g (prodotto derivato da calamari importati dalla Spagna). Molto contenuti i conteggi degli enterococchi, pari a 50 UFC in soli 4 campioni (7,7%) di calamari "arrotati". Per *E. coli* non è mai stato superato il valore di sensibilità del metodo di 5 UFC/g. Nessun campione ha presentato valori di *S. aureus* coagulasi e DNA-asi positivi superiore al limite di 100 UFC/g

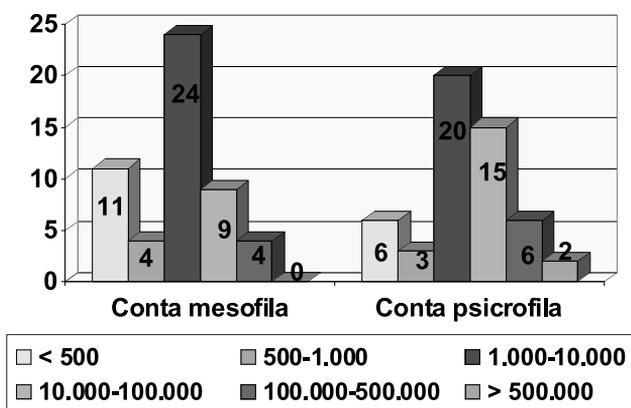


Figura 2 : Distribuzione dei valori della conta batterica aerobia mesofila totale e della conta batterica psicofila totale nei lotti di calamari decongelati ed "arrotati"

fissato dal laboratorio d'analisi.

CONCLUSIONI

Dai dati in nostro possesso, ottenuti dall'applicazione delle procedure di autocontrollo presso ditte italiane importatrici di cefalopodi congelati, emerge un quadro interessante relativo al profilo microbiologico dei prodotti importati e dei prodotti decongelati lavorati dalle ditte stesse.

In primo luogo, fissati dei criteri microbiologici di riferimento dal laboratorio di analisi, pochi campioni hanno superato tali valori di tolleranza. In assenza di limiti microbiologici stabili per legge, il laboratorio ha optato per i parametri in precedenza descritti dopo un periodo di sei mesi, durante il quale sono stati controllati i prodotti congelati e lavorati e sono stati ottenuti dei valori medi relativi ai suddetti parametri. Indubbiamente, a causa del vuoto legislativo di riferimento, molto interessante appare la definizione di tali limiti analitici, che potrebbero essere utilizzati da altre ditte o da altri laboratori chiamati ad analizzare simili prodotti della pesca.

Per quanto riguarda i prodotti congelati importati dalla Spagna e dagli altri paesi extra-europei, non sorprende osservare valori superiori di carica batterica

psicrofila rispetto alla carica mesofila totale. Inoltre, nonostante il congelamento dei cefalopodi avvenga a bordo dei pescherecci, il tenore di batteri indicatori di cattive condizioni igieniche di lavorazione, quali coliformi totali, enterococchi, *E. coli* e *S. aureus* è apparso estremamente contenuto nella stragrande maggioranza dei lotti esaminati.

I calamari vengono scongelati in acqua potabile ed il processo di agitazione meccanica viene eseguito a +4° C, grazie al continuo apporto di ghiaccio nella macchina rotativa. Tale processo di lavorazione permette un notevole abbattimento della carica batterica mesofila e della carica psicrofila, come appare dai risultati delle indagini microbiologiche sul prodotto finito. Anche gli altri microrganismi subiscono una riduzione numerica, come dimostrato dai più bassi valori riscontrati nei pochi campioni positivi per coliformi fecali ed enterococchi.

A conclusione del presente lavoro possiamo indubbiamente affermare come i calamari “arrotati” subiscano, presso le ditte che operano nel rispetto di dettagliati piani HACCP, un miglioramento non solo delle caratteristiche organolettiche, ma anche della qualità microbiologica. In tal senso la rigorosa applicazione del Decreto Legislativo n° 155 del 26 maggio 1997, istitutivo dell’obbligo di autocontrollo presso tutte le industrie alimentari, ha apportato notevoli benefici ad un settore che necessariamente si rifornisce di materia prima da paesi molto diversi tra loro. Un passo ulteriore, molto impegnativo per il mercato dei prodotti della pesca, sarà quello della tracciabilità del prodotto, ma che porterà al consumatore una sicurezza ancora maggiore.

RIASSUNTO

Nel triennio 2000-2003 sono stati esaminati 105 lotti di calamari (*Loligo spp.*) importati da paesi europei ed extra-europei nell’ambito dei piani di autocontrollo di cinque ditte dedite all’importazione e lavorazione di prodotti ittici congelati. In particolare, sono stati sottoposti a controllo microbiologico 53 lotti di calamari congelati e 52 lotti di calamari decongelati e sottoposti al processo definito di “arrotatura”. Il laboratorio d’analisi ha fissato, nel piano di autocontrollo delle ditte interessate, dei limiti microbiologici per i seguenti parametri: carica batterica aerobia mesofila (500.000 UFC/g), carica batterica psicrofila (500.000 UFC/g), coliformi totali (1.000 UFC/g), enterococchi (500 UFC/g), *Escherichia coli* (100 UFC/g) e *Staphylococcus aureus* coagulasi e DNA-asi positivi (100 UFC/g). Tali limiti di tolleranza sono stati rispettati dalla maggior parte dei lotti esaminati. Il 96,2% dei calamari congelati ha rispettato i limiti per la carica batterica aerobia mesofila, il 90,6% per la carica batterica psicrofila, il 96,2% per i coliformi totali ed il 98,1% per *S. aureus*. Tutti i lotti di calamari congelati ha rispettato il valore soglia previsto per gli enterococchi e per *E. coli*. Nel prodotto finito la carica batterica aerobia mesofila è sempre stata al di sotto del limite di tolleranza, così come per enterococchi, *E. coli* e *S. aureus*. Il 96,2% dei campioni decongelati ha rispettato il valore massimo di carica batterica psicrofila ammesso ed il valore limite di coliformi totali.

SUMMARY

From 2000 to 2002, 105 batches of squid (*Loligo* spp.) imported from European and extra-European countries have been subjected to microbiological controls by five Italian fish farms, according to their HACCP plans. A total of 53 batches of frozen squid and 52 batches of thawed end-products have been analysed. The laboratory fixed microbiological criteria for the following parameters: total aerobic bacterial count (500.000 CFU/g), psychrophilic bacterial count (500.000 CFU/g), total coliforms (1.000 CFU/g), enterococci (500 CFU/g), *Escherichia coli* (100 CFU/g) and coagulase and DNA-ase positive *Staphylococcus aureus* (100 CFU/g). The microbiological criteria were respected by 96.2% of frozen squid for total bacterial aerobic count, by 90.6% for psychrophilic bacterial count, by 96.2 % for total coliforms and by 98.1 % for *S. aureus*. Enterococci count and *E. coli* count were lower than the fixed limits in all frozen batches. Total bacterial aerobic count of thawed end-product batches never exceeded the tolerance limit and so did enterococci count, *E. coli* count and *S. aureus* count. Psychrophilic bacterial count values and total coliforms did not exceed the fixed limits in 96.2% of thawed squid end-products.

RESUME

Dans la période 2000-2002 les Auteurs ont examiné 105 échantillons de calmars importés par les pays Européens et extra-Europeens par cinq industries italiennes (in accord avec leurs plan HACCP), point de vue contrôle microbiologique. Un total de 53 échantillons de calmars congelés et 52 échantillons de calmars ouvragé et décongelés a été examiné. Le laboratoire a établi les critères microbiologiques pour les paramètres suivants: compte bactérien total (500.000 UFC/g), compte des bactéries psychrophiliques (500.000 UFC/g), coliformes totaux (1.000 CFU/g), entérocoques (500 CFU/g), *Escherichia coli* (100 CFU/g) et *Staphylococcus aureus* coagulase et DNA-ase positif (100 CFU/g). Les critères microbiologiques ont été observés pour le 96.2% de calmars congelés pour ce qui concerne le compte des bactéries totales, pour le 90.6 % (compte des bactéries psychrophiliques), pour le 96.2 % (coliformes totaux) et pour le 98.1 % (*S. aureus*). Le compte des entérocoques et *E. coli* a été au-dessous des limites établis pour les calmars congelés dans tous les échantillons. Dans le analyses des calmars ouvragés et décongelés, le compte des bactéries totales, des entérocoques, *E. coli* et *S. Aureus* n'a jamais dépassé les limites établis; le compte des bactéries psychrophiliques et des coliformes totaux est rentré dans les limites dans le 96.2 % des échantillons.

Parole chiave: *Loligo* spp., calamari congelati, calamari decongelati, parametri microbiologici

Key words: *Loligo* spp., frozen squid, thawed squid, microbiological criteria

Mots clés : *Loligo* spp., calmars congelés, calmars décongelés, paramètres microbiologiques

BIBLIOGRAFIA

- Decreto Legislativo 26 Maggio 1997, n° 155: Attuazione delle Direttive 93/43/CEE e 96/3/CEE concernenti l'igiene dei prodotti alimentari". Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n° 136 del 13 giugno 1997.
- Mossel A.A., Bijker P.G. and Eelderink I. 1978. Streptococci of Lancefield groups A, B and D and those of buccal origin in foods: their public health significance, monitoring and control. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 7: 315.
- Norma ISO 6887-1/1988. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- Norma ISO 4833/1991. Microbiology - General guidance for the enumeration of micro-organisms. Colony count technique at 30° C.
- Norma ISO 4832/1991. Microbiology - General guidance for the enumeration of coliforms. Colony count technique.
- Norma ISO 6888/1983. Microbiology – General guidance for enumeration of *Staphylococcus aureus*. Colony count technique.

LACTOBACILLUS CASEI IN LATTI FERMENTATI: INDIVIDUAZIONE CON METODICHE TRADIZIONALI, BIOMOLECOLARI E CARATTERIZZAZIONE ENZIMATICA

Bacci C.*, Paris A.*, Brindani F.*

Introduzione

E' ormai ampiamente documentato che un corretto apporto nutrizionale di principi attivi può produrre un sostanziale miglioramento di alcune funzioni dell'organismo quali il transito intestinale, la difesa dai danni ossidativi e la risposta immunitaria contribuendo, pertanto, alla prevenzione delle disfunzioni biochimico-metaboliche che sono all'origine di eventi patologici.

Le recenti conoscenze acquisite in campo alimentare hanno portato l'individuo ad un atteggiamento più attento ai problemi della salute e alla correlazione esistente tra alimentazione e benessere. E' prevedibile, quindi, che il consumatore sia orientato a privilegiare alimenti con elevate caratteristiche di qualità e "naturalità", equilibrati nella loro composizione, nel loro valore nutrizionale e biologico. Seguendo questa inevitabile evoluzione è fondamentale che l'industria produca alimenti con elevato valore nutrizionale e funzionale, sia per rispondere ad una precisa richiesta di mercato, sia per contribuire al miglioramento della qualità della vita. Questa tendenza è confermata anche dalle indagini effettuate dalla Commissione Europea, in relazione alle quali i progetti che contemplano i "functional foods" sono considerati di notevole importanza strategica (6).

Questi prodotti, sempre più richiesti dal mercato, contengono microrganismi che devono presentare una serie di requisiti sanitari e probiotici. Tra questi ultimi sono di fondamentale importanza la provenienza intestinale, la resistenza al succo gastrico, agli acidi biliari e alla digestione enzimatica, nonché la stabilità biologica durante la preparazione e la conservazione del prodotto. Altra proprietà richiesta ai probiotici è quella di essere "generally regarded as safe" (GRAS), ovvero di non provocare effetti collaterali come, ad esempio, la secrezione di enzimi che degradano gli antibiotici, nei consumatori debilitati o immunocompromessi.

Oggi, dopo circa un secolo dall'intuizione di Metchnikoff, il concetto di "probiotico" è stato rivisto con le dovute considerazioni, perché la ricerca ha confermato che quanto avviene nell'intestino è, sicuramente, di fondamentale importanza per la salute dell'uomo.

L'obiettivo dei più recenti studi è, infatti, quello di individuare i ceppi "buoni" di tali batteri per introdurli con la dieta quotidiana, ciò è realizzabile più facilmente con alimenti quali lattici fermentati, formaggi e yogurt (3). I microrganismi presenti in questi prodotti, appartengono in prevalenza ai batteri lattici mesofili o termofili e,

**Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale, Università degli Studi di Parma.*

per alcune tipologie, anche a bifidobatteri, acetobatteri, lieviti e muffe. Tali microrganismi sono utilizzati per mantenere le fermentazioni sotto controllo, per ottimizzare e standardizzare il prodotto dal punto di vista della sicurezza, della qualità organolettica e della resa di trasformazione. I batteri lattici sono peraltro adatti a partecipare al metabolismo e al processo digestivo dell'ospite, come conseguenza delle attività proteolitiche, lipolitiche e amilolitiche (2).

Facendo riferimento ai recenti sviluppi riguardanti il miglioramento della qualità della dieta, lo scopo della presente ricerca è stato quello di verificare l'effettiva presenza della specie *Lactobacillus casei* in latti fermentati reperibili sul mercato. Per il raggiungimento di tale obiettivo ci si è avvalsi, in parallelo, di test tradizionali e di biologia molecolare. Inoltre, essendo *Lb. casei*, uno dei batteri lattici con più spiccate caratteristiche probiotiche (1, 9), ci si è proposti di effettuare una valutazione qualitativa delle attività enzimatiche del microrganismo, a diverse condizioni di tensione d'ossigeno.

Materiali e Metodi

Sono stati isolati, da tre tipologie di latti fermentati, 99 ceppi appartenenti alla specie *Lb. casei*, in ugual numero. Come controllo positivo è stato utilizzato il type *Lb. casei* 172I fornitoci dal Centro Sperimentale Lattiero Caseario di Milano. L'isolamento degli stiptipi è avvenuto su terreno selettivo MRS Agar (Man Rogosa Sharpe, Oxoid), le piastre sono state incubate a 32°C per 48 ore in condizioni di anaerobiosi. Il riconoscimento è avvenuto, inizialmente, mediante esame morfologico delle colonie (grandi, tonde, regolari, lattescenti e convesse) e, successivamente, sottoponendo le stesse a colorazione di Gram e a osservazione microscopica (corti bacilli Gram positivi, lunghi e sottili). Ogni ceppo è stato identificato a livello di specie, impiegando il sistema API 50 CHL (bioMérieux) che fornisce informazioni sull'attività metabolica dei carboidrati. La tecnica di biologia molecolare, "Polymerase Chain Reaction" (PCR), ha permesso l'amplificazione *in vitro*, della sequenza genica caratteristica di *Lb. casei* (1.200 bp). Per l'estrazione del DNA batterico è stato utilizzato un protocollo che prevede l'impiego del Chelex al 5%, mentre l'amplificazione è avvenuta con 30 cicli (94°C per 15 sec., 60°C per sec., 72°C per 90 sec.) preceduti da denaturazione a 94°C per 2 min. e seguiti da una estensione a 72°C per 7-10 min. (7). Per la corsa elettroforetica è stato impiegato un gel all'1,2% di agarosio.

I ceppi risultati positivi alla PCR sono stati, poi, indagati in merito alle loro attività enzimatiche (API ZYM, bioMérieux). Ogni attività enzimatica è stata saggiata incubando i ceppi per 4 ore a 37°C, a diverse condizioni di tensione di ossigeno: aerobiosi, anaerobiosi e microaerofilia (10% CO₂).

Risultati

La conta degli anaerobi totali non ha evidenziato una significativa differenza nei tre prodotti analizzati: i valori ottenuti differiscono, infatti, tra loro per meno di un'unità logaritmica. I ceppi sono stati identificati, dopo 24 ore di incubazione, mediante il sistema biochimico-enzimatico prima ricordato, come *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. pentosus* e dopo 48 ore come *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus* e *Lactococcus lactis* (!). Nessun ceppo è risultato appartenere alla specie *Lb. casei* con

il sistema API 50 CHL mentre gli stessi ceppi, sottoposti ad indagine biomolecolare, hanno presentato ampliconi di 1.200 bp tipici della specie in questione (Figura n. 1).

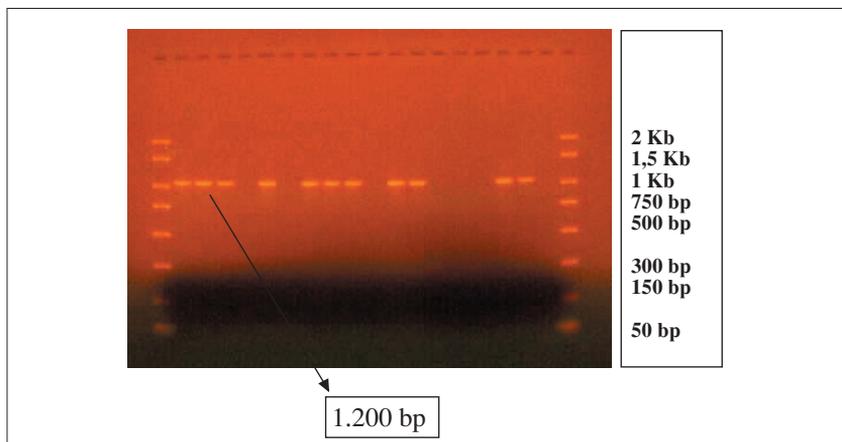


Figura n. 1: Tracciato elettroforetico degli ampliconi caratterizzanti la specie *Lb. casei*.

Mediante il sistema di rivelazione delle attività enzimatiche, è stato possibile individuare cinque categorie di enzimi elaborati da *Lb. casei*: fosfatasi, lipasi, arilamidasi, proteasi e glucosidasi.

Le variazioni più marcate, nel profilo di tali attività hanno riguardato gli enzimi fosfatasi alcalina, cistina arilamidasi, α -chimotripsina e β -glucosidasi. Per quanto concerne la produzione del primo enzima, essa è variata notevolmente in relazione all'appartenenza dei ceppi ai diversi campioni. Le condizioni di tensione d'ossigeno migliori per la sua elaborazione, sembrano essere state quelle di microaerofilia: l'80% (nei campioni A e B) e il 100% (nel campione C) degli stipiti presentano l'enzima in questione (Figura n. 2). Risultati meno omogenei si sono ottenuti in anaerobiosi: nel campione A il 100% degli stipiti evidenzia tale attività enzimatica, nel B solamente il 70% e nel campione C nessun ceppo ha rivelato attività fosfataseica. Situazione analoga si è registrata in merito alle condizioni di aerobiosi, anche se con differenze meno evidenti.

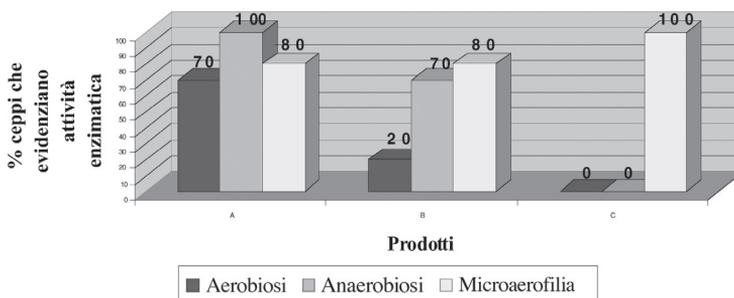


Figura n. 2: Percentuale dei ceppi di *Lb. casei* che evidenziano attività enzimatica (fosfatasi alcalina).

L'enzima cistina arilamidasi è stato prodotto da un elevato numero di stipiti in condizioni di aerobiosi, mentre con ridotte tensioni di ossigeno la sua elaborazione è risultata modesta.

Un enzima particolarmente attivo, nelle stesse condizioni prima ricordate, è l' α -chimotripsina. In condizioni di microaerofilia e di anaerobiosi, nessun microrganismo proveniente dal campione C, ha elaborato l'enzima sopra ricordato mentre negli stipiti isolati dai campioni A e B, la sua attività viene manifestata dal 20% - 30% dei ceppi (Figura n. 3).

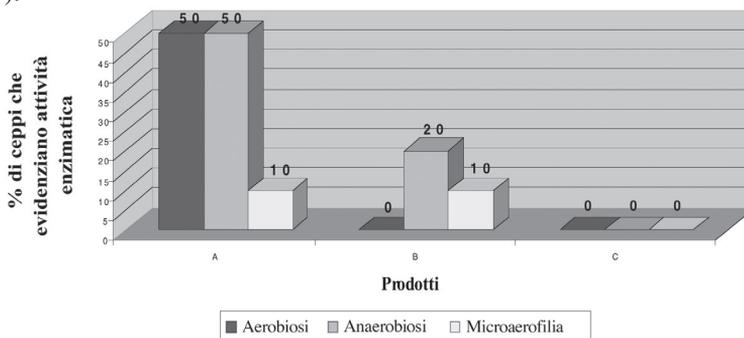


Figura n. 3: Percentuale dei ceppi di *Lb. casei* che evidenziano attività enzimatica (β -chimotripsina).

Relativamente alla β -glucosidasi si è rilevato che gli stipiti risultano in grado di evidenziare tale attività enzimatica prevalentemente in anaerobiosi; il migliore profilo enzimatico è riconducibile al campione A, seguito dal B. Nessun ceppo isolato dal campione C ha prodotto tale enzima (Figura n. 4).

La fosfatasi acida e l'esterasi (C4) sono apparsi come enzimi elaborati da analoghe percentuali di ceppi, nelle tre tipologie di prodotti. Il primo, presente nei ceppi appartenenti ai tre campioni in tutte le condizioni di crescita, è stato maggiormente evidenziato in microaerofilia. L'esterasi (C4), presente in tutti gli stipiti testati, viene elaborata, solamente, dal 50% dei ceppi in condizioni di aerobiosi, solo nel campione C. Nello stesso campione sono stati ottenuti risultati analoghi per l'enzima esterasi lipasi (C₈).

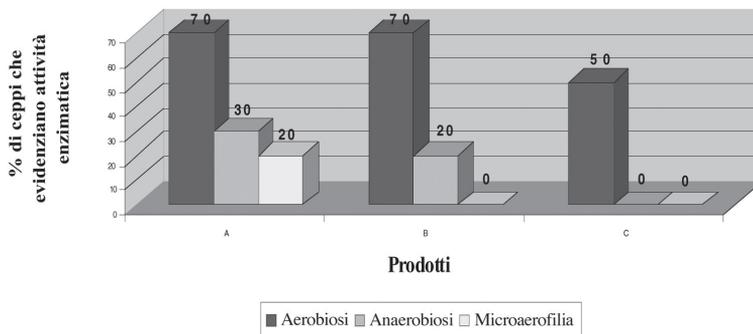


Figura n. 4: Percentuale dei ceppi di *Lb. casei* che evidenziano attività enzimatica (β -glucosidasi).

Tutti i ceppi, isolati dai tre prodotti, hanno dimostrato di essere in grado di elaborare gli enzimi valina arilamidasi, leucina arilamidasi, naftol-AS-BI-fosfoidrolasi, β -galattosidasi e α -glucosidasi, in ogni condizione di crescita. Mentre nessuno stipite ha evidenziato la produzione di lipasi (C_{14}), tripsina, β -glucuronidasi, N-acetil- β -glucosaminidasi, α -mannosidasi e α -fucosidasi.

Considerazioni e Conclusioni

La lettura del test di identificazione dopo 48 ore è risultata discordante nel 27,3% dei casi con quella effettuata dopo 24 ore. Frequentemente (66,6%) si è riscontrata, in occasione delle due letture, una diversa percentuale di identificazione nei confronti della stessa specie (*Lb. paracasei*, *Lb. pentosus*). Queste discrepanze nelle percentuali possono sollevare dubbi sull'attendibilità del sistema identificativo anche perché, dopo due giorni di incubazione, viene proposta, in qualche caso (6,1%), una doppia identificazione di specie (*Lb. curvatus* e *Lc. lactis*). I dati da noi ottenuti permettono, pertanto, di affermare che il sistema identificativo, basato sul rilevamento delle caratteristiche biochimico-enzimatiche, può risultare approssimativo. Ricordiamo d'altronde che, negli ultimi dieci anni, a seguito dell'aumentata conoscenza della genetica microbica, la tassonomia dei lattobacilli ha subito notevoli variazioni.

Recente è la nuova riclassificazione di *Lb. casei*: tecniche di ibridazione del DNA hanno permesso di inserire tre sue subspecie nella nuova specie *Lb. paracasei* e una nella specie *Lb. rhamnosus* (4, 5). Sono dunque necessarie, spesso, prove di conferma sulla non ben definita posizione tassonomica delle specie *Lb. casei* e *Lb. paracasei* (10). Tuttavia non va escluso l'utilizzo del sistema biochimico-enzimatico API 50CHL come test di screening, specialmente se abbinato a metodiche di biologia molecolare; queste ultime, infatti, sono in grado di fornire risultati specifici consentendo l'inequivocabile identificazione di un determinato ceppo batterico.

Nella nostra ricerca l'impiego della tecnica PCR ha consentito di confermare la presenza della specie *Lb. casei* nei latt fermentati, come peraltro dichiarato in etichetta dalle ditte produttrici. La presenza della specie probiotica avvalora, sicuramente, la qualità dei prodotti esaminati dal momento che, come dimostrato, la sua assunzione giornaliera è in grado di diminuire notevolmente la possibilità di colonizzazione nel tratto gastro-intestinale del patogeno *Escherichia coli* O157:H7. Sembra, inoltre, che la presenza del lattobacillo possa arginare i danni istologici alla mucosa intestinale con i conseguenti fenomeni diarroici e la colite emorragica, nonché la sindrome emolitico-uremica e l'eventuale coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale (8).

Le indagini eseguite, inoltre, hanno permesso di rilevare, in merito all'attività enzimatica dei microrganismi, un quadro estremamente vario ed articolato; batteri della stessa specie, identici dal punto di vista genetico, e con molte caratteristiche fenotipiche comuni, si comportano metabolicamente in maniera molto differente.

Diversi appaiono, pure, i risultati riguardanti l'attività enzimatica degli stipiti alle differenti tensioni d'ossigeno. Le percentuali di ossigeno, utilizzate per riprodurre le condizioni che si verificherebbero nel corso della colonizzazione intestinale, hanno permesso di ottenere i vari profili enzimatici dei microrganismi e di individuare i ceppi che forniscono un migliore apporto enzimatico. Pertanto, la scelta di un prodotto rispetto ad un altro, non risulta del tutto indifferente sui benefici che può trarre la salute del consumatore.

Parole chiave: *Lb. casei*, lattii fermentati, attività enzimatica, PCR.

Key words: *Lb. casei*, fermented milks, enzymatic activity, PCR.

Mots clés: *Lb. casei*, laits fermentés, activités enzymatiques, PCR.

Riassunto

Sono stati isolati 99 ceppi appartenenti alla specie *Lb. casei* da tre tipologie di lattii fermentati. L'effettiva presenza di tale specie nei singoli prodotti è stata valutata impiegando, parallelamente, test tradizionali e di biologia molecolare. Sono state, inoltre, stimate qualitativamente le attività enzimatiche dei vari microrganismi, a diversi valori di tensione d'ossigeno. Il sistema API 50 CHL non ha identificato alcun ceppo come *Lb. casei* mentre con la metodica PCR tutti gli stipiti sono risultati appartenere alla specie considerata. I risultati relativi all'attività enzimatica hanno evidenziato un quadro estremamente vario ed articolato e differente per gli stipiti isolati dai vari prodotti.

Summary

Ninety-nine stocks belonging to the *Lb. casei* specie have been isolated from three fermented milk types. The effective presence of that specie in each product has been estimated using traditional tests and molecular biology tests in a parallel way. The microorganisms enzymatic activities have been estimated in a qualitative way too, using different oxygen pressure values. API 50 CHL system identified no stock like *Lb. casei* indeed, all the experimental stocks show their belongings to the considerate specie using PCR method. The results about the enzymatic activity showed an highly and articulate description with differences connected to the stocks, isolated from different products.

Résumé

Quatre-vingt-dix-neuf souches appartenant à l'espèce *Lb. casei*, provenant de trois typologies de laits fermentés, ont été isolées. Les activités enzymatiques des microorganismes, avec différentes tensions d'oxygène, ont été évaluées. Le système API 50 CHL n'a pas identifié souches de *Lb. casei*, tandis qu'avec la méthode PCR toutes les souches appartiennent à l'espèce considérée. Les résultats mettent en évidence un tableau varié et articulé et différent pour les souches isolées des produits.

Bibliografia

- 1) BATTISTOTTI B., BOTTAZZI V. Microbiologia e tecnologia dei lattii fermentati. ITEMS I lattii fermentati, 35-72. Istituto Danone.
- 2) BIANCHI SALVADORI B. (1998). La flora microbica dello yogurt e dei lattii fermentati speciali. Bambini e Nutrizione, 5, (1), 17-26..
- 3) CAPURSO L. (2001). Probiotici e prebiotici: una sinergia di benessere. www.saluteeuropa.it.
- 4) COLLINS M.D., PHILIPS B.A., ZANONI P. (1989). Desoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov.,

- comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 39, 105-108.
- 5) DICKS L. M.T., DU PLESSIS E. M., DELLAGLIO F., LAUER E. (1996). Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATTC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATTC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation for ATTC 334 as the neotype of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 337-340.
 - 6) DIPLOCK A.T., AGGETT P.J., ASHWELL M., BORNET F., FERN E.B., ROBERFROID M.B. (1998). Scientific concepts of functional foods in Europe, consensus document. (FF-27-de 98). Bruxelles: ILSI Europe, 17.
 - 7) DRAKE M., SMALL C.L., SPENCE K.D., SWANSON B.G. (1996). Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. In dairy products by using the polymerase chain reaction. Journal of Food Prot., 59, 1031-1036.
 - 8) OGAWA M., SHIMIZU K., NOMOTO K., TAKAHASHI M., WATANUKI M., TANAKA R., TANAKA T., HAMABATA T., YAMASAKI S., TAKEDA Y. (2001). Protective effect of *Lactobacillus casei* strain *Shirota* toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbit. Infection and Immunity, 69, (2), 1101-1108.
 - 9) OOZEER R., GOUPIL-FEULLERAT N., ALPERT C.A., VAN DE GUCHTE M., ANBA J., MENGAUD J., CORTHER G. (2002). *Lactobacillus casei* is able to survive and initiate protein synthesis during its transit in the digestive tract of human flora-associated mice. Applied and Environmental Microbiology, 7, 3570-3574.
 - 10) REUTER G., KLEIN G., GOLDBERG M. (2002). Identification of probiotic cultures in food samples. Food Research International, 35, 117-124.

***RHODOCOCCUS EQUI:* UN PATOGENO OPPORTUNISTA DI DIFFICILE ERADICAZIONE**

Fabrizio Cattabiani*

Rhodococcus equi, già denominato *Corynebacterium equi*, è un cocco-bacillo Gram positivo, aerobio e rappresenta una delle 12 specie nelle quali attualmente è suddiviso il genere *Rhodococcus*.

E' stato descritto per la prima volta da Magnusson nel 1923 (24) come agente responsabile in Svezia di broncopolmonite purulenta in giovani puledri. La sindrome, che si manifesta in puledri al di sotto dei 4-6 mesi di età, può presentarsi sotto tre aspetti clinici diversi: una polmonite acuta, una più comune forma polmonare cronica di tipo granulomatoso a carattere suppurativo e una meno diffusa colite ulcerativa con interessamento dei linfonodi mesenterici (11, 34, 39, 63).

Nei suini *R. equi* è stato isolato ripetutamente dai linfonodi submascellari interessati o meno da lesioni granulomatose simil-tubercolari (3, 23, 29, 38, 55); in altre specie animali vengono segnalate sporadiche infezioni a carattere granulomatoso-suppurativo a carico dell'apparato respiratorio, linfadeniti, infezioni di ferite e comparsa di ascessi in varie parti del corpo (6, 34). Di recente *R. equi* è emerso come importante patogeno polmonare in campo umano in individui immunodepressi, in associazione a immunodeficienza virale (AIDS) (9, 10, 14, 15, 41, 52).

Aspetti epidemiologici

Si tratta di un microrganismo ad habitat tellurico che trova condizioni ottimali di crescita nei suoli arricchiti di deiezioni animali. La più elevata concentrazione è rinvenibile nello strato superficiale, non oltre 30 cm. di profondità, ove il microrganismo si moltiplica attivamente in condizioni idonee di temperatura e di umidità, utilizzando i principi nutritivi contenuti nelle deiezioni (50): è stato valutato che nel letame equino la carica contaminante iniziale possa aumentare sino a 10.000 volte nel volgere di 2 settimane in presenza di temperatura diurna oscillante fra 15 e 37°C (4). La conseguente, progressiva microbizzazione del suolo delle scuderie, e specialmente di quelle in cui si pratica riproduzione e allevamento, rappresenta una fonte di contagio di primaria importanza che può persistere anche per decenni (37).

In queste condizioni ambientali il microrganismo è presente anche nell'aria dei ricoveri, specialmente con tempo secco e ventoso (47), ed è stato sottolineato come si registri costantemente un concomitante incremento del numero dei casi di malattia (13).

R. equi è stato isolato dalle feci o dall'intestino di un' ampia gamma di specie

*Sezione di Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma.

animali, soprattutto erbivori quali equini, bovini, ovi-caprini, ungulati selvatici, ma anche suini ed uccelli selvatici; più raramente dalle feci di cani e polli e mai da quelle di gatti (6).

Nell'ambito degli equini, che vengono ritenuti i principali eliminatori del microrganismo, sono state condotte numerose ricerche finalizzate ad accertarne la reale distribuzione sotto l'aspetto quantitativo in rapporto all'età degli animali. Takai e coll. (51) riportano, con riferimento ad animali sani, comparsa di positività a livello fecale in puledri di 1-2 settimane di età, di costante positività negli animali di 4 settimane con il raggiungimento di valori pari a 10^4 - 10^5 cellule / g di feci e mantenimento di detti valori sino all'8^a-10^a settimana; oltre tale età inizia un graduale decremento della carica batterica fecale specifica che si attesta e si stabilizza negli adulti attorno a 10^2 - 10^3 batteri / g, valore desunto dalla media dei dati riferiti dai numerosi autori che si sono occupati dell'argomento (46). In puledri affetti dalla forma polmonare, invece, si riscontra una carica fecale ben più elevata, quantificabile in 10^6 - 10^8 cellule / g (49).

Mentre non esistono prove che *R. equi* si moltiplichi nell'ambiente intestinale degli adulti, nemmeno a livello del piccolo intestino dove le condizioni di aerobiosi lo consentirebbero, nei puledri ciò si realizza regolarmente sino al compimento del secondo mese di età, allorquando si avrebbe la comparsa del microbiota autoctono definitivo (4, 20, 30, 54): ne consegue che i puledri, rifornendo costantemente l'ambiente, sarebbero i veri responsabili del mantenimento della contaminazione ambientale e quindi dell'infezione a livello di allevamento.

Patogenesi e quadri clinici

La malattia, che si manifesta nei puledri e molto più raramente negli adulti, si instaura normalmente per inalazione o, indirettamente, per ingestione (18, 46, 58). *R. equi*, parassita endocellulare facoltativo, determina a livello alveolare un imponente richiamo di macrofagi che tendono ad infiltrare localmente il parenchima polmonare e a dare inizio ad una reazione di tipo granulomatoso. La sopravvivenza alla devitalizzazione macrofagica e la contemporanea immigrazione neutrofila inducono la progressiva evoluzione ad un quadro di tipo purulento. Gli animali presentano di conseguenza broncopolmonite bilaterale suppurativa sostenuta da ascessi multipli a livello di parenchima e di linfonodi bronchiali; l'eventuale cronicizzazione può indurre la comparsa di colite ulcerativa con interessamento dei linfonodi mesenterici (21, 34, 63). I sintomi classici sono rappresentati da scolo nasale, tosse, dispnea, diarrea, depressione e ipertermia elevata (oltre 41°C) (1, 2, 13); in un terzo dei puledri compare sinovite non purulenta con tumefazione delle articolazioni e zoppie (44). Il decorso è di circa 2 settimane e la mortalità si aggira attorno al 50 %, più elevata negli animali al di sotto dei 3 mesi di età.

Nei suini *R. equi* è stato isolato ripetutamente dai linfonodi submascellari sia normali che con lesioni simil-tubercolari, in percentuale pressochè sovrapponibile, talchè rimane incerto l'effettivo ruolo svolto dal patogeno nella genesi di linfoadenite granulomatosa (23, 54). In altre specie animali ne viene segnalata, seppure con estrema rarità, la responsabilità in svariati quadri morbosi che vanno dalle classiche broncopatie e linfoadeniti granulomatoso-purulente, a piometre, mastiti e lesioni apostematose a diversa localizzazione (34).

Nell'uomo, a partire dal 1967, si sono succedute le evidenze del coinvolgimento di *R. equi* come patogeno occasionale (34): nel 60% dei casi si è trattato di localizzazione polmonare con malessere, dispnea, tosse secca, occasionalmente emottisi, febbre persistente da alcuni giorni ad alcune settimane. Nella maggioranza dei casi segnalati, oltre l'80 %, si è trattato di individui immunodepressi per AIDS conclamato, per trattamento con antitumorali o con farmaci antirigetto (5, 34).

Virulenza

La patogenicità di *R. equi* è correlata soprattutto alla sua capacità di contrastare l'azione dei macrofagi: il patogeno, infatti, dimostra di poter far ricorso ad una strategia oltremodo articolata che va dal tentativo di ostacolare la fagocitosi, alla sopravvivenza ed alla moltiplicazione all'interno del fagocita, per terminare con la devitalizzazione del macrofago stesso (16, 34, 61). I principali fattori di patogenicità sono rappresentati dalla natura polisaccaridica della capsula, tale da rendere fortemente elettronegativo il microorganismo, dall'elaborazione di fosfolipasi C e di lecitinasi, enzimi ad azione litica sulle cellule dell'ospite, dalla presenza di acidi micolici a livello di parete e di plasmidi dai quali dipende, fra l'altro, la possibilità di replicazione nella cellula macrofagica (19, 26, 62).

La constatazione che ceppi isolati da fonti diverse manifestavano livelli di virulenza diversi ha indirizzato di recente l'attenzione all'accertamento della presenza ed allo studio di eventuali determinanti genetici a localizzazione plasmidica responsabili della patogenicità. A tutt'oggi è emersa la possibilità che siano presenti due plasmidi di diversa massa molecolare. Uno, con massa molecolare oscillante fra 85-90 kb, è stato descritto in ceppi isolati da lesioni purulente a sede polmonare in puledri e condiziona l'espressione di proteine di superficie di 15-17,5 kDa, denominate VapA (Virulence-associated protein Antigens) (53, 57). Ricerche condotte su ceppi di *R. equi* alberganti il plasmidio in oggetto e parallelamente su ceppi "curati", con conseguente sua eliminazione, hanno messo in evidenza come la presenza del plasmidio condizioni la capacità replicativa del patogeno nei macrofagi di topo (19) nonchè l'espressione di VapA, che risulta assente nei ceppi "curati" (46). L'altro plasmidio presenta una massa molecolare di 79-100 kb, esprime un antigene proteico di superficie di 20 kDa, denominato VapB, ed è stato individuato in ceppi isolati da linfonodi sottomandibolari di suini con lesioni simil-tubercolari o meno e dall'uomo (25, 45, 48).

Attualmente i ceppi vengono inquadrati in tre diversi livelli in rapporto alla patogenicità: virulenti, di virulenza intermedia e avirulenti. I ceppi virulenti sono VapA positivi, sono generalmente patogeni per il puledro, possono essere isolati anche da linfonodi sottomandibolari del suino e presentano una $DL_{50} = 10^6$ cellule nel topo; i ceppi di virulenza intermedia sono VapB positivi, sono stati isolati dal suino e dall'uomo ed hanno una $DL_{50} = 10^7$ cellule nel topo; i ceppi avirulenti, infine, non posseggono plasmidi né esprimono antigeni di superficie associati con la virulenza e non risultano letali per il topo alla dose di 10^8 cellule o più (47).

Sulla base dei più recenti riscontri epidemiologici si è propensi a ritenere che, dal momento che i ceppi di *R. equi* isolati da individui affetti da AIDS presentano nella maggioranza dei casi l'antigene VapB, la fonte di infezione più frequente per

l'uomo sia rappresentata dal suino e dal contatto con il suo ambiente (45, 48).

Aspetti immunitari

Le difese che vengono messe in atto coinvolgono sia l'immunità legata alla presenza di anticorpi specifici che l'immunità cellulo-mediata, ed è quest'ultima che consente la possibile eliminazione dei patogeni ad opera dei linfociti T.

Tenuto conto che *R. equi* può essere a buon motivo considerato come componente normale della flora batterica dell'ambiente di allevamento, non sorprende che la presenza di anticorpi specifici sia stata segnalata costantemente anche negli animali sani o provenienti da allevamenti indenni (12, 17, 43, 55, 59). A questo proposito è opinione condivisa che il puledro sviluppi immunità attiva a seguito della continua stimolazione antigenica a livello intestinale, ambiente in cui *R. equi*, veicolato dal foraggio, lettiera ecc., diverrebbe componente microbico normale (8, 36, 47, 54).

Una caratteristica immunitaria peculiare è costituita dal fatto che il titolo anticorpale nei puledri, pur aumentando in corso di infezione naturale o indotta sperimentalmente, rimane ugualmente basso (7, 31, 35, 59) e nelle forme gravi di malattia il titolo in anticorpi risulta decisamente inconsistente (17). Si ritiene che l'insorgenza di malattia, soprattutto nelle sue forme più gravi, sia conseguenza, oltre che di una abnorme carica batterica ambientale, di un tasso anticorpale di origine colostrale eccessivamente basso, tale da indurre una insufficiente opsonizzazione del microrganismo (16, 56); una siffatta condizione può essere la conseguenza, più che della ridotta reattività immunitaria della madre, dell'età del puledro: infatti, il titolo anticorpale di origine colostrale diminuisce sino a risultare scarsamente protettivo alla 5^a-6^a settimana e ad azzerarsi attorno alla 8^a settimana allorchè iniziano a comparire gli anticorpi prodotti attivamente dal sistema immunitario del puledro (1, 17). Ed è appunto nell'intervallo fra la 6^a e la 8^a settimana di vita, allorchè il puledro risulta più esposto, che viene di norma segnalata la comparsa della malattia.

Comunque sia, l'immunità umorale svolge un ruolo decisivo solo nella fase iniziale dell'infezione; successivamente, a seguito della localizzazione endocellulare dei microrganismi, è il meccanismo di immunità cellulare che può essere in grado di controllare l'infezione.

Le linee cellulari linfocitarie responsabili della risposta immunitaria nel topo, animale utilizzato di prassi come modello (33), sono i linfociti T CD4+ e CD8+; benchè dai risultati di indagini basate su esperimenti di deplezione selettiva (22) si desuma che entrambe le linee linfocitarie partecipano alla eliminazione di *R. equi*, sono i linfociti T CD4+ quelli che sembrano giocare un ruolo decisivo (40). I linfociti T CD4+, cioè i linfociti T helper (Th), possono essere suddivisi, nel topo, in due sottopopolazioni in base al corredo di linfocine prodotte, Th1 e Th2 (27, 28). I linfociti T helper 1 (Th1) producono interferone γ (IFN- γ) e interleuchina 2 (IL-2), mentre i linfociti T helper 2 (Th2) producono IL-4, IL-5 e IL-10. Dall'equilibrio delle due sottopopolazioni Th1 e Th2 dipende il buon esito della risposta immunitaria, compresa l'eliminazione dei patogeni a sede intracellulare (42, 60). IFN- γ risulta svolgere il ruolo preminente nell'ambito delle linfocine, in quanto si segnala come il maggiore attivatore dei macrofagi alveolari, deputati alla eliminazione dei patogeni, influenzando il processo di devitalizzazione ossigeno-dipendente, stimolando la fusione

fagolisosomiale nonché aumentando l'espressione dei recettori FC (27, 32).

Da quanto accennato, emerge il profilo di un patogeno opportunisto a diffusione endemica negli ambienti di scuderia, specie di quelle in cui si pratica la riproduzione. E' opinione condivisa che tutti gli animali vengano a contatto con il microrganismo e che solo i puledri che non realizzano una buona risposta immunitaria primaria contraggano la malattia, mentre gli altri elaborerebbero una immunità umorale e cellulo-mediata sufficiente a proteggerli per tutta la vita, durante la quale si comporterebbero da portatori sani.

A fronte di una evidente difficoltà di eradicazione del patogeno, si pone il problema irrisolto del controllo e della prevenzione della malattia. Nonostante negli ultimi 15 anni siano stati compiuti passi significativi in merito allo studio dei meccanismi coinvolti nella specifica risposta immunitaria – ricerca dell'antigene "giusto" da utilizzarsi nell'allestimento di un vaccino, tentativo di ottenere colostro con più elevato titolo in anticorpi specifici vaccinando la cavalla gravida, individuazione dell'età migliore per un ipotetico, precoce intervento di vaccinazione dei puledri - le conoscenze acquisite non sono ancora sufficienti a consentire la messa in opera di una profilassi affidabile.

Parole chiave: *Rhodococcus equi*, puledri, patogenicità, diffusione.

Key words: *Rhodococcus equi*, foals, pathogenicity, spread.

RIASSUNTO – Sono passate in rassegna le più recenti acquisizioni in tema di diffusione, persistenza nell'ambiente, patogenicità, aspetti antigenici ed immunitari relativi a *Rhodococcus equi*, un temibile patogeno opportunisto che colpisce puledri in giovane età e persone a contatto con l'ambiente di allevamento e/o immunodepressi.

SUMMARY – An overview of epidemiology, pathology, antigens and immune responses of *Rhodococcus equi*, an important bacterial pathogen in foals and in immunosuppressed humans, is presented.

Bibliografia

1. ARDANS A.A., HIETALA S.K., SPENSLEY M.S., SANSOME A. (1986). Studies of naturally occurring and experimental *Rhodococcus equi* (*Corynebacterium equi*) pneumonia in foals. Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 32, 129-144.
2. BAIN A.M. (1963). *Corynebacterium equi* infection in the equine. Aust. Vet. J., 39, 116-121.
3. BARTON M.D, HUGHES K.L. (1980). *Corynebacterium equi*: a review. Vet.Bull., 50, 65-80.
4. BARTON M.D., HUGHES K.L. (1984). Ecology of *Rhodococcus equi*. Vet. Microbiol., 9, 65-76.
5. BELL K.S., PHILIP J.C., AW D.W.J., CHRISTOFI N. (1998). The genus *Rhodococcus*. J. Appl. Microbiol., 85, 195-210.
6. CARMAN M.G., HODGES R.T. (1987). Distribution of *Rhodococcus equi* in animals, birds and from the environment. N. Z. Vet. J., 35, 114-115.

7. CARTER G.R., HYLTON G.A. (1974). An indirect hemagglutination test for antibodies to *Corynebacterium equi*. *Am. J. Vet. Res.*, 35, 1393-1395.
8. CHIRINO-TREJO J.M., PRESCOTT J.F., YAGER J.A. (1987). Protection of foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization. *Can. J. Vet. Res.*, 51, 444-447.
9. DONISI A., SUARDI M.G., CASARI S., LONGO M., CADEO G.P., CAROSI G. (1996). *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected patients. *AIDS*, 10, 359-362.
10. DRANCOURT M., BONNET E., GALLAIS H., PELOUX Y., RAOULT D. (1992). *Rhodococcus equi* infection in patients with AIDS. *J. Infect.*, 24 123-131.
11. DUNGWORTH D.L. (1993). *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* infection, p. 652-655, In: Pathology of domestic animals, Jubb K.V.F., Kennedy P.C. and Palmer N., (eds.), Academic Press, San Diego.
12. ELLENBERGER M.A., KAEBERLE M.L., ROTH J.A. (1984). Equine humoral immune response to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 2428-2430.
13. FALCON J., SMITH B.P., O'BRIEN T.R., CARLSON G.P., BIBERSTEIN E. (1985). Clinical and radiographic findings in *Corynebacterium equi* in pneumonia of foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 186, 593-599.
14. GRADON J.D., TIMPONE J.G., SCHNITTMAN S.M. (1992). Emergence of unusual opportunistic pathogens in AIDS: a review. *Clin. Infect. Dis.*, 15, 134-157.
15. HARVEY R.L., SUNSTRUM J.C. (1991). *Rhodococcus equi* infection in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Rev. Infect. Dis.*, 13, 139-145.
16. HIETALA S.K., ARDANS A.A. (1987). Neutrophil phagocytic and serum opsonic response of foal to *Corynebacterium equi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 14, 279-294.
17. HIETALA S.K., ARDANS A.A., SANSOME A. (1985). Detection of *Corynebacterium equi*-specific antibody in horses by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 13-15.
18. HONDALUS M.K. (1997). Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.*, 56, 257-268.
19. HONDALUS M.K., MOSSER D.M. (1994). Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infect. Immun.*, 62, 4167-4175.
20. HUGHES K.L., SULAIMAN I. (1987). The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. *Vet. Microbiol.*, 14, 241-250.
21. JOHNSON J.A., PRESCOTT J.F., MARKHAM J.F. (1983). The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intragastric challenge. *Vet. Pathol.*, 20, 450-459.
22. KANALY S.T., HINES S.A., PALMER G.H. (1993). Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4+ T-lymphocyte-deficient transgenic mice. *Infect. Immun.*, 61, 4929-4932.
23. KATSUMI M., KODAMA N., MIKI Y., HIRAMUNE T., KIKUCHI N., YANAGAWA R., NAKAZAWA M. (1991). Typing of *Rhodococcus equi* isolated from submaxillary lymph nodes of pigs in Japan. *Zentrabl. Veterinaermed., Reihe B*, 38, 299-302.

24. MAGNUSSON H. (1923). Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein Neuer Eitererger beim Pferd. Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkd., 50, 22-37.
25. MAKRAI L., TAKAI S., TAMURA M., TSUKAMOTO A., SEKIMOTO R., SASAKI Y., KAKUDA T., TSUBAKI S., VARGA J., FODOR L., SOLYMOSI N., MAJOR A. (2002). Characterisation of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, human and soil in Hungary. Vet. Microbiol., 88, 377-384.
26. McNEIL M.M., BROWN J.M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin. Microbiol. Rev., 7, 357-417.
27. MOSMANN T.R., COFFMANN R.L. (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol., 7, 145-173.
28. MOSMANN T.R., SAD S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today, 17, 138-146.
29. MUTIMER M.D., WOOLCOCK J.B. (1980). *Corynebacterium equi* in cattle and pigs. Vet. Quarterly, 2, 25-27.
30. NAKAZAWA M., HARITANI M., SUGIMOTO C., ISAYAMA Y. (1983). Virulence of *Rhodococcus equi* for mice. Jpn. J. Vet. Sci., 45, 679-682.
31. NAKAZAWA M., ISAYAMA Y., KASHIWAZAKI M. (1987). Diagnosis of *Rhodococcus equi* infection in foals by the agar gel diffusion yest with protein antigen. Vet. Microbiol., 15, 105-113.
32. NATHAN C.F., MURRAY H.W., WIEBE M.E., RUBIN B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J. Exp. Med., 158, 670-689.
33. NORDMANN P., RONCO E., NAUCIEL C. (1992). Role of T-lymphocyte subsets in *Rhodococcus equi* infection. Infect. Immun., 60, 2748-2752.
34. PRESCOTT J.F. (1991). *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin. Microbiol. Rev., 4, 20-34.
35. PRESCOTT J.F., MARKHAM R.J.F., JOHNSON J.A. (1979). Cellular and humoral immune response of foals vaccination with *Corynebacterium equi*. Can. J. Comp. Med., 43, 356-364.
36. PRESCOTT J.F., OGILVIE T.H., MARKHAM J.F. (1980). Lymphocyte immunostimulation in the diagnosis of *Corynebacterium equi* pneumonia of foals. Am. J. Vet. Res., 41, 2073-2075.
37. PRESCOTT J.F., TRAVERS M., YAGER-JOHNSON J.A. (1984). Epidemiological survey of *Corynebacterium equi* infections on five Ontario horse farms. Can. J. Comp. Med., 48, 10-13.
38. RAO M.S., ZAKI S., KESHAVAMURTHY B.S., SINGH K.C. (1982). An outbreak of acute *Corynebacterium equi* infection in piglets. Indian Vet. J., 59, 787-788.
39. ROONEY J.R., ROBERTSON J.L. (1996). Respiratory system, p. 23-56, In: Equine pathology, Iowa State University Press, Ames.
40. ROSS T.L., BALSON G.A., MINERS J.S., SMITH G.D., SHEWEN G.D., PRESCOTT P.E., YAGER J.A. (1996). Role of CD4+, CD8+ and double negative T cells in the protection of SCID/beige mice against respiratory challenge with *Rhodococcus equi*. Can. J. Vet. Res., 60, 186-192.
41. SCOTT M.A., GRAHAM B.S., VERRAL R., DIXON R., SCHAFFNER W.,

THAM K.T. (1995). *Rhodococcus equi* – an increasingly recognized opportunistic pathogen – report of 12 cases and review of 65 cases in the literature. *Am. J. Clin. Path.*, 103, 649-655.

42. SCOTT P. (1991). IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 response in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*, 147, 3149-3155.

43. SKALKA B. (1987). Dynamics of *equi*-factor antibodies in sera of foals kept on farms with differing histories of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Vet. Microbiol.*, 14, 269-276.

44. SWEENEY C.R., SWEENEY R.W., DIVERS T.J. (1987). *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial agents. *Vet. Microbiol.*, 1, 329-336.

45. TAKAI S., IMAI Y., FUKUMAGA N., UCHIDA Y., KAMISAWA K., SASAKI Y., TSUBAKI S., SEKIZAKI T. (1995). Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*, 172, 1306-1311.

46. TAKAI S. (1997). Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. *Vet. Microbiol.*, 56, 167-176.

47. TAKAI S., FUJIMORI T., KATSUZAKI K., TSUBAKI S. (1987a). Ecology of *Rhodococcus equi* in horses and their environment on horse-breeding farms. *Vet. Microbiol.*, 14, 233-239.

48. TAKAI S., FUKUNAGA N., OCHIAI S., IMAI Y., SASAKI Y., TSUBAKI S., SEKIZAKI T. (1996). Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 1034-1037.

49. TAKAI S., IIMORI S., TSUBAKI S. (1986a). Quantitative fecal culture of early diagnosis of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* enteritis in foals. *Can. J. Vet. Res.*, 50, 479-484.

50. TAKAI S., NARITA K., ANDO K., TSUBAKI S. (1986b). Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in soil on a horse-breeding farm. *Vet. Microbiol.*, 12, 169-177.

51. TAKAI S., OHKURA H., WATANABE Y., TSUBAKI S. (1986c). Quantitative aspects of fecal *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in foals. *J. Clin. Microbiol.*, 23, 794-796.

52. TAKAI S., SASALI Y., IKEDA T., UCHIDA Y., TSUBAKI S., SEKIZAKI T. (1994). Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from patients with and without AIDS. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 2887-2889.

53. TAKAI S., SEKIZAKI T., SUGAWARA Y., WATANABE Y., TSUBAKI S. (1991). Association between a large plasmid and 15-to 17 kiloDalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 439-443.

54. TAKAI S., TAKEUCHI T., TSUBAKI S. (1986). Isolation of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* and atypical mycobacteria from the lymph nodes of healthy pigs. *J. Vet. Med. Sci.*, 48, 445-448.

55. TAKAI S., TSUBAKI S. (1985). The incidence of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in domestic animals and soil. *J. Vet. Med. Sci.*, 47, 1291-1293.

56. TAKAI S., YAMAGATA T., TSUBAKI S. (1989). Serum immunoglobulin concentrations in foals infected with *Rhodococcus equi*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51, 1291-1293.

57. TKACHUK-SAAD O., PRESCOTT J.F. (1991). *Rhodococcus equi* plasmids:

- isolation and partial characterization. J. Clin. Microbiol., 29, 2696-2700.
58. WADA R., KAMADA M., ANZAI T., NAKANISHI A., KANEMARU T., TAKAI S., TSUBAKI S. (1997). Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. Vet. Microbiol., 56, 301-312.
59. WILKS C.R., BARTON M.D., ALLISON J.F. (1982). Immunity to and immunotherapy for *Rhodococcus equi*. J. Reprod. Fertil. Suppl., 32, 497-505.
60. YAMAMURA M., UYEMURA K., DEANS R.J., WENBERG K., REA T.H., BLOOM B.R., MODLIN R.L. (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. Science, 254, 277-279.
61. ZINK M.C., YAGER J.A., PRESCOTT J.F., FERNANDO M.A. (1987). Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. Vet. Microbiol., 14, 295-305.
62. ZINK M.C., YAGER J.A., PRESCOTT J.F., WILKIE B.N. (1985). In vitro phagocytosis and killing of *Corynebacterium equi* by alveolar macrophages of foals. Am. J. Vet. Res., 46, 2171-2174.
63. ZINK M.C., YAGER J.A., SMART N.L. (1986). *Corynebacterium equi* infections in horses 1958-1984: a review of 131 cases. Can. Vet. J., 27, 213-217.

FACTORS AFFECTING OSTRICH MEAT COMPOSITION AND QUALITY¹

A.Sabbioni^{2,3}, P.Superchi², C.Sussi², A.Quarantelli², P.G.Bracchi², A.Pizza⁴,
G.Barbieri⁴, V.Beretti², A.Zanon², E.M.Zambini², M.Renzi²

INTRODUCTION

Ostrich farming has been introduced in Italy in 1990 (Endrighi et al., 1997), as ostrich slaughtering is a recent activity, officially allowed just in 1998 (Ministry of Health bulletin no.3, March 9th 1998, according to the Presidential Decree no. 559, December 30th 1992, published on "Gazzetta Ufficiale" no.28, February 4th 1993). Until then, birds were reared just for reproduction, meat consumption was very low and provided exclusively by imported slaughtered birds and topics related to quality were not considered. Meanwhile, researchers started to take this kind of meat into account, comparing its quality with others, but collecting samples, from imported slaughtered birds, already packed from supermarkets (Paleari et al., 1998).

When the first facilities for ostrich slaughtering were built up, questions concerning slaughtering conditions and animal type for meat production sprang out.

Quarantelli et al. (2000) carried out a research to verify the productive characteristics and meat quality of ostrich reared in Italy and they concluded that slaughter weight should be about 100 kg and that carcass weight affects its own characteristics and meat quality.

The aim of this study was to evaluate the effects of several factors, related to the bird, to the type of breeding and slaughtering conditions on meat chemical composition and some qualitative parameters.

MATERIAL AND METHODS

Sixty-five African Black x Blue Neck ostriches (*Struthio camelus*), from 12 farms in the north of Italy, were slaughtered during 3 months in the same slaughter house. The birds, 55 males and 10 females, from 10 to 54 months old (mean \pm s.e.: 14.8 ± 0.8), were fed the same concentrate from commerce (n=35) or concentrate plus hay (n=30) and they were slaughtered after a resting period varying from 2 to 26 hours (mean \pm s.e.: 13.2 ± 1.9).

Ostriches were weighted before and after slaughtering to evaluate yields; from left side of carcass of each animal a sample of *fibularis longus* (FL) muscle, about 600 g, was collected, immediately vacuum-sealed packed and brought to the laboratory for analysis.

¹ Ricerche condotte con contributo MURST (COFIN99).

² Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università di Parma.

³ Corresponding Author: alberto.sabbioni@unipr.it

⁴ Stazione Sperimentale per l'Industria e le Conserve Alimentari, viale Tanara 31/a, 43100 Parma.

Analysis included:

- the chemical composition (moisture, ash, protein, fat) (A.O.A.C., 1990) and gross energy content, using an adiabatic calorimeter bomb (IKA C400);
- the colour recorded with a Minolta Chromameter Reflectance II CR100/08, set at channel 1, containing a calibration with a Standard Gardner pink tile no. CG6625 ($Y=45.97$; $x=0.3658$; $y=0.3250$). Colour values were expressed as CIE L^* a^* b^* (Novelli *et al.*, 1991). The values of hue and chrome were calculated, respectively, as $\arctg(b^*/a^*)$ and $\sqrt{(a^{*2}+b^{*2})}$;
- the fatty acid content, by a capillary gas-chromatograph (PERKIN-ELMER mod.8420) after cold extraction with chloroform/methanol 2/1 v/v, under the following conditions: capillary column: MEGAWAX 30m x 0.25mm ID x 0.25 μ thickness; carrier: Helium, 1.08 ml/min; detector: FID (Flame Ionization Detector), 300°C; injection: split, 70:1, 220°C; oven: 120°C (8 min) to 200°C at 5°C/min (7 min), to 250°C at 10°C/min (5 min); atherogenic and thrombogenic indexes have been calculated according to Ulbright and Southgate (1991);
- thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) content at 0, 3, 6 day from slaughtering (Faustman *et al.*, 1992);
- meat tenderness, using 20 g heavy samples, vacuum-sealed packed, cooked in bain-marie at 70°C for 20 min.; on cylindrical samples 11.5 mm diameter and 30 mm long, with fibres perpendicular to cutting axis, using Instron Universal Testing texturometer 5564, following Warner-Brazler test; shear force (N) and shear resistance (mm) were evaluated (Klettner and Bielig, 1975).

Data were processed by means of covariance analysis, using the following model (SPSS, ver.11.5.1, 2002):

$$Y_{ijk} = m + S_i + F_j + \beta_0 A_{ijk} + \beta_1 PSR_{ijk} + \beta_2 CW_{ijk} + \beta_3 A_{ijk}^2 + \beta_4 PSR_{ijk}^2 + \beta_5 CW_{ijk}^2 + \epsilon_{ijk}$$

where Y is a dependent variable, S and F are the fixed effects of sex and feeding type, respectively, A (age in months), PSR (pre-slaughtering rest length in hours) and CW (carcass weight in kg) are linear and squared covariates, β_0 - β_5 are regression coefficients and ϵ is residual error.

RESULTS AND DISCUSSION

Average (\pm s.e.) body weight at slaughtering was 81.7 ± 2.3 kg. Males were heavier than females (83.9 vs 79.5 kg, resp.) and birds fed hay plus concentrates were heavier than those fed just concentrates (83.6 vs 79.7 kg, resp.). Nevertheless, because of high variability (CV = 17.3%), sex and feeding type effects were not significant ($P>0.05$). Average carcass weight (\pm s.e.) was 48.4 ± 1.7 kg; males and birds fed also hay had heavier carcasses than females and those fed just concentrate, respectively (49.5 vs 47.3 kg; 49.1 vs 47.6 kg), but differences were not significant ($P>0.05$). On carcass weight a significant effect has been shown by pre-slaughtering rest, both in linear ($\beta_1 = 0.799$; $P=0.03$) and in squared shape ($\beta_4 = -0.012$; $P=0.04$).

The chemical composition of fibularis longus (FL) muscle is reported in table 1. Data are in agreement with those reported by Sales (1996) on FL muscle of African Black ostriches 8-14 months old, with the exception of fat, that in our study results higher by 273% (0.895% vs 0.24%). Because the analytical method was similar (pe-

troleum ether extraction), the difference could be related to the more intensive Italian breeding system. Sex did not affect chemical composition ($P>0.05$) but the presence of hay into the ration induced an increase of ash content (+18.6%; $P<0.05$), as compared with a feeding system with concentrates only. Among covariates, age significantly affected protein content and protein/energy ratio, both in linear ($\beta_0 = 0.104$ and 0.204 ; $P=0.08$ and 0.06 , respectively) and in squared shape ($\beta_3 = -0.002$ and -0.004 ; $P=0.06$ and 0.06 , respectively); pre-slaughtering rest length affected fat content and fat energy/total energy ratio both in linear ($\beta_1 = 0.048$ and 0.364 ; $P<0.01$ and <0.01 , respectively) and in squared shape ($\beta_4 = -0.001$ and -0.006 ; $P<0.01$ and <0.01 , respectively). Carcass weight gave no significant variations.

The increase of protein content with age increasing confirms that ostrich reaches maturity late, particularly when it is reared under climate conditions much different from those of origin. Therefore age of maturity achievement would be successive to slaughtering age, as confirmed by growth curves' studies (Sabbioni et al., 1999). During pre-slaughtering rest, drinking water was available but not food, and the linear increasing of fat could be due to mobilisation of muscular glycogen reserves or to dehydration caused by stress. The second hypothesis seems to be the most probable, and it is also supported by bibliography. As reported by Grosskopf et al. (1988) in cattle, the longer is the pre-slaughtering rest, the higher is blood concentration of some metabolites, due to dehydration. They also assert that one-night pre-slaughtering rest is not able to modify muscular glycogen levels and, as a consequence, meat pH values.

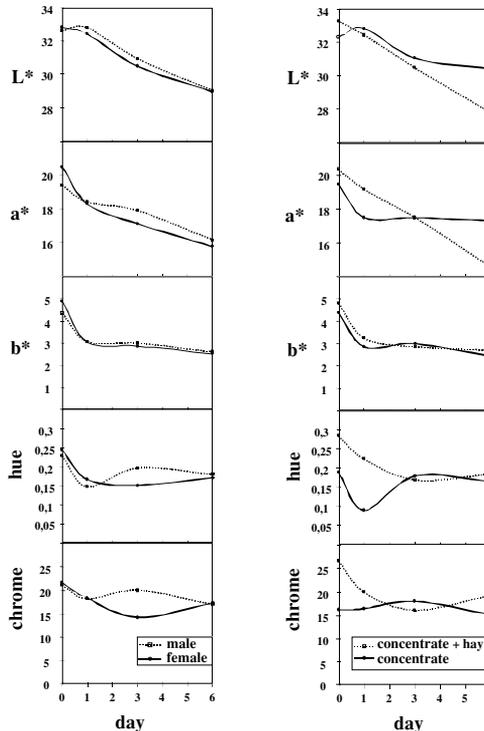


Table 1 - Chemical composition of ostrich meat, as affected by sex and type of feeding (least-squares means \pm se), and significance of linear (L) and quadratic (Q) coefficients for age (months), pre-slaughtering rest length (hours) and carcass weight (kg).

	Sex	Type of feeding				Age			Pre-slaughtering rest			RSD	
		Males		Hay + Concentrate concentrate		L	Q	L	Q	L	Q		
		Females											
Moisture	g/100 g	76.67 \pm 0.28	76.62 \pm 0.12	76.58 \pm 0.24	76.70 \pm 0.22	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.58
Ash	"	1.16 \pm 0.06	1.21 \pm 0.03	1.29 b \pm 0.05	1.09 a \pm 0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.13
Protein	"	21.46 \pm 0.32	21.44 \pm 0.14	21.31 \pm 0.28	21.59 \pm 0.25	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.66
Fat	"	0.94 \pm 0.11	0.85 \pm 0.05	1.04 \pm 0.10	0.75 \pm 0.09	n.s.	n.s.	***	***	***	n.s.	n.s.	0.24
Protein/energy		42.12 \pm 0.62	42.06 \pm 0.27	41.82 \pm 0.55	42.36 \pm 0.49	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1.30
Lipid energy/total energy		7.21 \pm 0.86	6.46 \pm 0.37	7.94 \pm 0.76	5.72 \pm 0.68	n.s.	n.s.	***	***	***	n.s.	n.s.	1.80

a, b : P<0.05

n.s.: not significant; *, P<0.10; ***, P<0.01

Meat colour (figure 1) was not significantly affected by sex ($P>0.05$), but type of feeding got to a significant difference of brightness 6 days after slaughtering ($P<0.05$). Meat from birds fed just concentrates was significantly brighter than that from birds fed also hay. That is important for consumer's appreciation. In fact, ostrich meat is characteristically quite dark (Sales and Horbanczuk, 1998) and it has the tendency to

become darker with ageing. Consumer does not like it, believing it is a consequence of a bad or too long preservation. The opportunity to influence this parameter during breeding, using just concentrates, seems to be of interest; in fact, previous studies (Sabbioni et al., 2000) have pointed out that the colour was not modifiable by supplying diet with high doses of vitamin E, as in other species.

Fatty acids content (table 2) was not affected by sex, type of feeding or carcass weight ($P>0.05$). Age linearly increased palmitic ($\beta_0 = 1.518$; $P=0.05$), palmitoleic ($\beta_0 = 0.701$; $P=0.04$) and oleic acids ($\beta_0 = 1.266$; $P=0.06$), saturated/unsaturated ratio ($\beta_0 = 0.011$; $P=0.08$), atherogenic ($\beta_0 = 0.022$; $P=0.009$) and thrombogenic ($\beta_0 = 0.027$; $P=0.04$) indexes and reduced stearic acid ($\beta_0 = -1.160$; $P=0.06$) and PUFA ($\beta_0 = -1.258$; $P=0.05$). Squared component of age significantly affected palmitic ($\beta_3 = -0.024$; $P=0.07$) and palmitoleic acids ($\beta_3 = -0.012$; $P=0.05$) and atherogenic ($\beta_3 = -0.0003$; $P=0.03$) and thrombogenic ($\beta_3 = -0.0003$; $P=0.09$) indexes. Pre-slaughtering rest length has been related to linear and squared variations of polyunsaturated ($\beta_1 = -0.853$, $P=0.02$; $\beta_4 = 0.017$, $P=0.01$) and saturated fatty acids ($\beta_1 = 0.510$, $P=0.01$; $\beta_4 = -0.008$, $P=0.01$), of saturated/unsaturated ratio ($\beta_1 = -0.011$, $P=0.004$; $\beta_4 = -0.0002$, $P=0.008$) and of thrombogenic index ($\beta_1 = 0.022$, $P=0.003$; $\beta_4 = -0.0004$, $P=0.004$). Horbanczuk and Sales (1998) and Horbanczuk et al. (1998) did not find significant differences in saturated and monounsaturated fatty acids content among different muscles and ostrich breeds, as they found differences in polyunsaturated fatty acids concentrations. In the cited paper, C18:3w3, C18:2w6, C20:5w3, C22:6w3 e C22:6w6 showed the highest variations.

TBARS (table 3) rose faster in meat from ostriches fed just concentrates than in birds fed also hay (at d 3: $P<0.05$; at d 6: $P<0.10$); that could be due to the higher content of polyunsaturated fatty acids of the former. In fact, as reported by Jakobsen and Bertelsen (2000), unsaturation degree of fatty acids is one of the most important factors affecting oxidative status of lipids. Pre-slaughtering rest length was linearly and negatively related to TBARS at d 3 ($\beta_1 = -0.032$; $P=0.01$) and 6 ($\beta_1 = -0.033$; $P=0.01$) from slaughtering.

Shear force and shear resistance have not been significantly affected by fixed factors of the model (table 3). Shear force was slightly higher in males than in females (63.27 vs. 62.06), as shear resistance was higher in females (19.14 vs 18.20; $P=0.07$). Also type of feeding did not significantly affect tenderness. Meat samples from ostriches fed concentrate plus hay were characterised by higher shear force and lower shear resistance, that is in agreement with more rigidity of meat. With reference to covariates in the model, shear force increased and shear resistance decreased linearly with age and pre-slaughtering rest. The variations were not significant but they could mean a less tough meat in young animals and less elasticity of meat of birds with a long pre-slaughtering rest. Moreover TBARS and shear force decreased with the increasing of age and pre-slaughtering rest. It would mean a correlation between fat variation and meat consistency. Most probably shear force increasing was due to a contemporary modification of protein and fat, this last because of an increasing of unsaturated fatty acids and a decreasing of saturated. The correlation would be not direct but consequent to two independent and parallel processes, showing an ageing of meat. Values concerning rheological parameters were slightly different from those

reported by Paleari et al. (1998). As we pointed out a higher shear force, data are not really comparable, because the tests were different and samples had no definite provenience and identification.

Table 2 - Fatty acid content (%) of ostrich meat, as affected by sex and type of feeding (least-squares means \pm se), and significance of linear (L) and quadratic (Q) coefficients for age (months), pre-slaughtering rest (hours) and carcass weight (kg).

Fatty acid	Sex		Type of feeding				Age		Pre-slaughtering rest		Carcass weight		RSD
	Females	Males	Hay + concentrate	Concentrate	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q	
Myristic Acid	C14	0.76 \pm 0.31	0.66 \pm 0.17	0.68 \pm 0.31	0.74 \pm 0.30	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.30
Palmitic Acid	C16	22.02 \pm 3.49	18.16 \pm 1.87	19.97 \pm 3.42	20.22 \pm 3.41	**	*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	3.30
Palmitoleic Acid	C16:1	6.56 \pm 1.57	5.11 \pm 0.85	6.30 \pm 1.54	5.37 \pm 1.54	**	*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	1.49
Stearic Acid	C18	10.23 \pm 2.86	12.45 \pm 1.54	11.02 \pm 2.80	11.66 \pm 2.79	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	2.71
Oleic Acid	C18:1	31.83 \pm 3.16	30.82 \pm 1.69	31.59 \pm 3.09	31.05 \pm 3.08	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	2.99
Linoleic Acid	C18:2	17.04 \pm 1.22	18.74 \pm 0.84	17.93 \pm 1.47	17.85 \pm 1.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	2.73
Eicosenoic Acid	C20:1	0.28 \pm 0.06	0.23 \pm 0.03	0.25 \pm 0.06	0.23 \pm 0.06	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.05
Arachidonic Acid	C20:4	9.96 \pm 3.09	12.35 \pm 1.66	10.42 \pm 3.03	11.89 \pm 3.02	n.s.	n.s.	**	**	**	**	n.s.	2.93
Saturated		32.94 \pm 1.08	31.47 \pm 0.74	31.49 \pm 1.30	31.84 \pm 0.92	n.s.	n.s.	***	***	***	***	n.s.	2.19
MUFA		38.73 \pm 1.96	36.00 \pm 1.34	37.30 \pm 2.36	35.96 \pm 1.67	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	3.95
PUFA		28.32 \pm 2.20	32.53 \pm 1.51	31.20 \pm 2.65	32.19 \pm 1.84	**	n.s.	**	**	***	***	n.s.	4.45
Saturated/unsaturated		0.49 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02	0.46 \pm 0.03	0.47 \pm 0.02	*	n.s.	***	***	***	***	n.s.	0.05
Atherogenic index		0.37 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	0.33 \pm 0.04	0.31 \pm 0.03	***	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.06
Thrombogenic index		0.89 \pm 0.04	0.84 \pm 0.03	0.82 \pm 0.05	0.87 \pm 0.04	**	*	***	***	***	***	n.s.	0.09

n.s.: not significant; *: P<0.10; **: P<0.05; ***: P<0.01

Table 3 - TBARS content (absorbance at 532 nm), shear force (Newton) and shear resistance (mm) of ostrich meat, as affected by sex and type of feeding (least-squares means \pm se), and significance of linear (L) and quadratic (Q) coefficients for age (months), pre-slaughtering rest (hours) and carcass weight (kg).

	Sex		Type of feeding				Age			Pre-slaughtering rest			Carcass weight			RSD
			Hay + concentrate		Concentrate		L	Q	L	Q	L	Q	L	Q		
	Females	Males														
TBARS at:																
d 0 post-slaughter	0.095 \pm 0.023	0.099 \pm 0.009	0.112 \pm 0.018	0.083 \pm 0.018	*	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.045
d 3 post slaughter	0.264 \pm 0.079	0.339 \pm 0.030	0.198a \pm 0.061	0.405b \pm 0.063	n.s.	n.s.	***	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.141
d 6 post slaughter	0.384 \pm 0.133	0.445 \pm 0.051	0.282A \pm 0.102	0.547B \pm 0.106	n.s.	n.s.	**	**	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.241
Shear force	62.06 \pm 6.26	63.27 \pm 3.13	66.51 \pm 6.52	58.82 \pm 5.34	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	13.09
Shear resistance	19.14B \pm 0.43	18.20A \pm 0.21	18.39 \pm 0.45	18.95 \pm 0.36	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.89

A, B: P<0.10; a, b: P<0.05

n.s.: not significant; *: P<0.10; **: P<0.05; ***: P<0.01

CONCLUSIONS

Meat quality depends on several factors related to birds, feeding regime and slaughtering conditions. In “traditionally” slaughtered species, the knowledge of these variables allowed to standardise meat processing and to get products both homogeneous and meeting consumer’s demand. Regarding ostrich meat in Italy, research about such factors affecting meat quality is still lacking.

In practice, a transition from “slaughtering what it is available” to “keeping for slaughtering” is taking place and for this purpose it is quite important to evaluate the effects of several factors on meat characteristics.

Sex has never been significant, except for a more tender male meat, as the type of feeding has affected ash content and oxidation resistance: to prevent oxidative stress, the addition of hay to concentrates seems to be particularly effective.

Continuous variables of the statistical model (age, pre-slaughtering rest, carcass weight) had an interesting behaviour. The hypothesis that ostrich has a late growth (Sabbioni et al., 1999) seems to be confirmed from the increasing of meat protein but not of fat content as age increased. The age also affected fat quality; particularly it induced an increase of saturated/unsaturated fatty acids ratio, of atherogenic and thrombogenic indexes and also a reduction of PUFA content. Carcass weight has never been found significant, probably because its variability has been absorbed from age factor. Pre-slaughtering rest length positively affected meat’s fat content and quality (reduction of saturated fatty acids and PUFA) and also made the meat more sensitive to oxidative stress.

The research does not allow to assess optimal conditions for each parameter, but just to point out which is important. In conclusion, the results show the need to assess technological parameters during ostrich breeding and slaughtering, if one considers their effect on meat quality.

SUMMARY

Effects of sex, type of feeding, age, pre-slaughtering rest and carcass weight on chemical composition, fatty acid content and quality parameters (colour, oxidation status, tenderness) of ostrich meat have been evaluated. Sex influenced meat tenderness ($P < 0.10$), as type of feeding influenced meat ash content ($P < 0.05$) and oxidation resistance. Age linearly affected meat protein content and fat quality (increasing saturated/unsaturated fatty acids ratio and atherogenic and thrombogenic indexes, reducing PUFA). Carcass weight has never been significant. Pre-slaughtering rest affected fat content and quality (reducing saturated fatty acids and PUFA) and increased meat sensitivity to oxidative stress.

Key words: ostrich, meat, chemical composition, quality

RIASSUNTO - Fattori che influenzano la composizione e la qualità della carne di struzzo.

Sono stati valutati gli effetti del sesso, del tipo di alimentazione, dell’età, della durata della sosta pre-macellazione e del peso della carcassa sulla composizione chimica centesimale, sul contenuto di acidi grassi e su alcuni parametri qualitativi (colore,

stato ossidativo, tenerezza) della carne di struzzo. Il sesso non ha determinato variazioni significative, se si eccettua una maggior tenerezza della carne nei maschi ($P < 0.10$), la tipologia di alimentazione ha prodotto effetti sul contenuto in ceneri della carne ($P < 0.05$) e sulla resistenza alla ossidazione. Circa l'effetto dei fattori a variabilità continua inseriti nel modello, l'età è risultata linearmente associata con un aumento del contenuto proteico della carne e con variazioni della qualità del grasso (aumento del rapporto fra acidi grassi saturi ed insaturi e degli indici di aterogenicità e trombogenicità, riduzione del tenore di PUFA). Il peso della carcassa non è mai risultato significativo. La durata della sosta prima della macellazione ha determinato variazioni a carico del contenuto in grasso della carne, in senso positivo, e della qualità dello stesso (riduzione del contenuto di acidi grassi saturi e di PUFA), oltre che una maggiore sensibilità della carne allo stress ossidativo.

Parole chiave: struzzo, carne, composizione chimica, qualità

REFERENCES

- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.
- Endrighi E., Bianchi A. and Zucchi G. 1997. La Ratititcoltura nel Nord Italia. Rivista di Avicoltura, 66, 1/2, 13-20.
- Faustman C., Specht S.M., Malkus L.A. and Kinsman D.M. 1992. Pigment oxidation in ground veal: influence of lipid oxidation, iron and zinc. Meat Science, 351-362.
- Grosskopf J.F.W., Meltzer D.G.A., Van Den Heever L.W., Collet F.A., Van Resburg J.J., Mulders M.S. and Lombard M.S. 1988. Blood biochemical parameters and meat pH of feedlot cattle slughtered on arrival or after overnight rest at an abattoir. Journal of the South African Veterinary Association, 59, 3, 149-152.
- Horbanczuk J. and Sales J. 1998. Total lipid and cholesterol content and fatty acid composition of meat obtained from ostriches reared on a commercial farm. Animal Science Papers and Reports, 16, 1, 51-54.
- Horbanczuk J., Sales J., Celeda T., Konecka A., Zieba G. and Kawka P. 1998. Cholesterol content and fatty acid composition of ostrich meat as influenced by subspecies. Meat Science, 50, 385-388.
- Jakobsen M. and Bertelsen G. 2000. Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time and modified atmosphere composition. Meat Science, 54, 49-57.
- Klettner P.G. and Bielig H.J. 1975. Rheologische und rheometrische Probleme bei pflanzlichen Lebensmitteln. Fortschritte in der Lebensmittelwissenschaft. Technische Universitaet, Institut fuer Lebensmitteltechnologie, Berlin.
- Novelli E., Campesato E., Camapanin G., Dazzi G., Madarena G., Badiani A. and Chizzolini R. 1991. Valutazione strumentale della qualità della carne suina. 1. Premessa. Rivista di Suinicoltura, 32, 2, 39-49.
- Paleari M.A., Camisasca S., Beretta G., Renon P., Corsico P., Bertolo G. and Crivelli G. 1998. Ostrich meat: physico-chemical characteristics and comparison with turkey and bovine meat. Meat Science, 48, 3-4, 205-210.

- Quarantelli A., Superchi P. and Sabbioni A. 2000. Caratteristiche delle carcasse e delle carni di struzzo. *Rivista di Avicoltura*, 69, 5, 67-70.
- Sabbioni A., Superchi P., Bonomi A., Summer A. and Boidi G. 1999. Growth curves of intensively reared ostriches (*Struthio camelus*) in Northern Italy. *Book of Abstracts of the 50th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, Zurich, Switzerland, 22-26 August, 143.
- Sabbioni A., Superchi P., Renzi M., Zambini E.M., Bonomi A. and Predari G. 2000. Effetti della supplementazione con vitamina E sulla stabilità ossidativa e sul colore della carne di struzzo (*Struthio camelus*). *Atti S.I.S.Vet.*, 57, 491-492.
- Sales J. 1996. Histological, biophysical, physical and chemical characteristics of different ostrich muscles. *J. Sci. Food Agric.*, 70, 109-114.
- Sales J. and Horbanczuk J. 1998. Ratite meat. *World's Poultry Science Journal*, 54, 1, 59-67.
- Ulbright T.L.V. and Southgate D.A.T. 1991. Coronary hearth disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338, 985-992.

RELATIONSHIP BETWEEN NUTRITION AND REPRODUCTIVE EFFICIENCY IN OSTRICH (*Struthio camelus*): YOLK FATTY ACID CONTENT AND FERTILITY

C. Sussi, P. Superchi*, A. Sabbioni, E.M. Zambini, V. Beretti, A. Zanon

INTRODUCTION

Scarce reproductive performance is one of the most important problems that affect ostrich farm productivity in Italy: 20% of laid eggs is not fertile and just 60% hatches (Salghetti, 2000). Good incubation practices are quite important to improve low hatchability (Gonzales et al., 1999), but nutrition is also a key element. In several farms at the beginning of reproductive period laying percentage and chicks' conditions are pretty good, but later on the number of laid eggs, fertility and hatchability percentages get worse and worse and mortality increases. The laying period lasts 6-7 months and already at its beginning the ostrich hen has almost the totality of follicles. Moreover, since all the nutrients required for embryo development are prepackaged in the egg prior to laying, worsening of the performance could be due to a progressive consumption of some nutrients (Angel, 1994).

Yolk lipids are the primary nutrient source for the avian embryo. The fatty acid components of lipids provide the energy needed for development and are also vital for the synthesis of the phospholipids which form the cell membranes of the growing tissue. Certain tissues of the embryo require large amounts of particular long-chain highly-polyunsaturated fatty acids (Speake, 1999).

The polyunsaturated profile of the yolk varies greatly between avian species (Surai et al., 1999): the composition of yolk lipids and their utilization by the avian species have been described in several review articles (Noble and Cocchi, 1990; Kuksis, 1992; Speake et al., 1998). Fatty acids profile of yolk is also largely a reflection of the fatty acid composition of the diets, as demonstrated in poultry (Hargis et al., 1991; Nash et al., 1995; Halle, 2001).

An adequate knowledge of nutrient requirements is quite important to achieve a "correct" yolk lipid composition and the studies of the nutritive profile of ostrich eggs, as a sign of chick's conditions, can be useful to better comprehend these topics. Yolk lipid amount of ostrich eggs do not much differ from the other avian species (Sales et al., 1996), but confronted with poultry, ostrich showed difference in fatty acid composition. In poultry the most represented polyunsaturated fatty acid is linoleic acid and its importance in embryo development, particularly embryo's brain and retina, results in a major consideration in diet formulation, while in ostrich the predominant polyunsaturated fatty acid is linolenic and its content is much greater than in poultry (21.8% vs 1.4%) (Leskanich and Noble, 1997).

* Corresponding author: superchi@unipr.it

Several studies have demonstrated that certain avian species maintained in captivity produce eggs with markedly different fatty acid profiles than those of their counterparts in the wild (Surai et al., 2001): ostriches (Noble et al., 1996), pheasants and geese (Speake et al., 1999).

Noble et al. (1996) compared nutritive profile of eggs produced in captivity to the profile of eggs collected from wild animals, in which hatchability rises the 90%: the fatty acid profile of the first ones was deeply different from the second, in particular α -linolenic acid content was 80% lower in farmed ostrich's eggs. Considering the importance of linoleic acid in poultry and supposing a similar role of linolenic acid in ostrich, the same authors suggested that low hatchability and neonatal viability characteristics of farmed ostriches may be due to inadequate amounts of n-3 fatty acids in the yolk.

The aim of the work was to modulate yolk fatty acid composition of ostrich egg by feeding a high linolenic acid content diet, and to evaluate the effect on reproductive performance.

MATERIAL AND METHODS

Thirty-two ostrich females, reared in two farms, housed in couples or trios in 60x15 m fenced pens, were fed 2.5 cm cutted alfalfa hay *ad libitum* and 1kg/bird/d of a pelleted ratide breeder ration with addiction of 0, 3 or 6% of linseed oil.

Chemical composition of the three diets is reported in table 1. To accustom the animals to the diets, experimental feeding started one month before the expected laying period beginning (December) and it lasted until laying end (July).

Table 1 - Chemical composition of diets as fed

	0%	3%	6%
Moisture	8.99	7.68	8.62
Ash	10.10	9.86	9.37
CP	17.14	16.11	15.72
EE	3.58	6.53	8.61
CF	10.81	11.43	10.35
NFE	49.38	48.39	47.33

The 1st and then each 20th egg were collected during the whole laying period. Eggs were kept at +4°C till they arrived at the laboratory, than they were promptly opened and yolk sampled.

Total lipids from a known weight of the yolk were extracted and purified by homogenization and refluxing in a suitable excess of chloroform : methanol (2:1 v/v). All lipid extracts were then stored in chloroform at -20°C until analyses.

Fatty acids were converted into their corresponding methyl esters adding 2.5 ml KOH/MeOH2N and refluxing with hexane. Fatty acid methyl esters have been analyzed by capillary gas chromatography (Supelco, SP-2560, 100mx0.25mm ID, 0.20 μ m film; Sigma-Aldrich) in GC Perkin-Elmer mod. 8420. The column was main-

tained at 240°C for 5 min following injection of the sample, then increased at 4°C/min to 240°C, hold 15 min.

Fatty acids profile of the diets is reported in table 2.

Table 2 - Fatty acid composition (% total lipids) of diets.

	GROUP		
	0%	3%	6%
C12:0	0.09	0.05	0.04
C14:0	0.21	0.15	0.10
C15:0	0.10	0.07	0.06
C16:0	14.20	9.77	9.31
C16:1	0.17	0.19	0.15
C17:0	0.12	0.08	0.07
C17:1	0.04	0.04	0.03
C18:0	2.27	3.07	3.22
C18:1	19.14	19.63	20.21
C18:2 n6	51.13	31.87	27.67
C20:0	0.38	0.26	0.27
C18:3 n6	0.09	0.12	0.14
C18:3 n3	10.91	34.27	38.24
C20:2 n6	0.07	0.04	0.05
C22:0	0.38	0.22	0.27
C20:3 n3	0.13	0.05	0.06
C20:4 n6	0.41	0.05	0.06
C22:6	0.16	0.07	0.09

By linseed oil addition it was possible to improve linolenic acid content of diets: it was 3 times higher in 3% group feed and almost 4 in 6% group feed compared with control group feed. To evaluate the relationship between fatty acid profile and reproductive parameters, the following element were recorded for each female: total number of laid eggs, fertility (number of fertile eggs out of the laid eggs), birthrate (number of viable born chicks out of laid eggs), and hatchability (number of fertile eggs that hatched).

Data were processed by the analysis of variance, using two models: model(1) for fatty acid composition of yolk lipids and model(2) for reproductive data.

$$(1) Y_{ij} = m + D_i + F_j + b1X1_{ij} + e_{ij}$$

$$(2) Y_{ij} = m + D_i + F_j + b2X2_{ij} + e_{ij}$$

where:

Y_{ij} = single observation;

m = overall mean;

D_i = fixed effect of diet;

F_j = fixed effect of farm;

$b1X1_{ij}$ = regression coefficient with laying order (H1: no. egg);

$b2X2_{ij}$ = regression coefficient with female age (H2: year);

e_{ij} = residual error

RESULTS AND DISCUSSION

Fatty acid composition of yolk lipids is shown in table 3.

The most represented fatty acids are palmitic and oleic. The first one significantly decreased with treatment ($P<0.01$), oleic acid has a similar trend but it has not been significantly affected.

Table 3 –Fatty acid composition and fatty acid profile of yolk lipids (%)

	GROUP			COVARIATE Laying order	SEM
	0%	3%	6%		
C14:0	0.592B	0.496A	0.511A	ns	0.06
C14:1	0.078B	0.046A	0.056A	ns	0.01
C15:0	0.185	0.175	0.188	ns	0.02
C16:0	30.26B	27.21A	27.85A	ns	1.25
C16:1	8.13C	5.21A	6.66B	ns	0.65
C17:0	0.150a	0.190b	0.163ab	+0.003*	0.03
C17:1	0.135a	0.141a	0.175b	-0.004*	0.03
C18:0	4.78a	6.31b	5.35ab	ns	1.07
C18:1	39.10	37.67	36.86	-0.284**	1.96
C18:2	10.36a	14.08b	12.48ab	ns	1.54
C20:0	0.045	0.045	0.033	ns	0.01
C18:3 n6	0.078	0.077	0.081	ns	0.01
C20:1	0.157	0.173	0.155	ns	0.02
C18:3 n3	3.86a	5.57b	7.08c	+0.370**	0.78
C21:0	0.205B	0.112A	0.134A	ns	0.03
C20:2 n6	0.109a	0.163b	0.136ab	ns	0.04
C22:0	0.059	0.027	0.032	ns	0.02
C20:3 n6	0.037a	0.061b	0.072b	ns	0.02
C20:3 n3	0.031A	0.041A	0.061B	+0.003**	0.01
C20:4 n6	1.025	1.543	1.453	-0.453*	0.46
C20:5 n3	0.058	0.065	0.071	ns	0.02
C22:6 n3	0.493	0.595	0.627	ns	0.16
Saturated	36.26b	34.56a	34.25a	-0.048*	1.58
Mono-unsaturated	47.61b	43.24a	43.73a	-0.033*	2.13
Poly-unsaturated	15.45a	22.19b	21.98b	+0.074*	2.42
n-3	4.12a	6.24b	7.81c	+0.343**	1.55
n-6	11.33a	15.95c	14.17b	+0.042*	1.64
n-6:n-3	3.70c	2.83b	1.88a	ns	0.32

A, B: $P<0.01$; a,b: $P<0.05$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$; ns: not significant

Not surprising the major polyunsaturated were linoleic and linolenic acids (12.3% and 5.5% on average, respectively). Linseed oil supplementation significantly affected their proportion. Linolenic acid showed the most important variation: it was markedly and significantly higher both in 3% group and 6% group (almost twice) compared with control group ($P<0.05$), but it was sufficient to reach just about half of the mean content found in eggs of wild ostrich by Noble et al. (1996).

Also laying order has affected the content of some fatty acids and linolenic acid in particular ($P<0.01$): actually it accumulates in yolk progressively.

Saturated and mono-unsaturated contents were higher in control group than in experimental groups (on average +5 and +9%, respectively). The main effect was to increase n-3 polyunsaturated content (+29 and +25%, respectively 3% and 6% vs 0%; $P<0.05$) and proportion in experimental group confronted with control group at the expense of n-6, thereby reducing ($P<0.05$) n-6/n-3 ratio (table 3), as expected. Also laying order has affected fatty acid profile, except n-6/n-3 ratio: saturated and mono-unsaturated fatty acids decreased, while poly-unsaturated, n-3 and n-6 content grew, in particular the increase in n-3 content was highly significant.

Notwithstanding the modulation of fatty acids profile, we did not affect reproductive performance. A greater number of laid eggs in experimental groups than control group has been noted, but the variability was particularly high and the results were not significant. Neither fertility, nor birthrate or hatchability were improved (table 4).

Table 4 – Reproductive performance

		GROUP			COVARIATE	SEM
		0%	3%	6%	Female age	
Eggs	no.	36.76	47.47	45.20	+2.72*	22.40
out of all eggs:						
Fertility	%	57.84	56.06	57.91	ns	7.46
Birthrate	%	37.73	36.48	39.92	ns	15.83
out of fertile eggs:						
Hatchability	%	63.79	63.45	62.18	ns	22.06

* $P<0.05$; ns: not significant

CONCLUSIONS

Linseed oil is a source of polyunsaturated fatty acids able to modify acid composition of ostrich eggs. At the dosage and for the period of time of this research, linseed oil supplementation reduced but did not cancel the difference in n-3 fatty acid content between farmed and free ostriches. Furthermore it did not significantly improve reproductive efficiency.

If linolenic acid has a basic role during reproductive period, as supposed by Noble et al. (1996), it could be possible to use the high digestive exploitation of fat in ostrich, feeding linseed oil at the dosage of 9% or more for the whole reproductive period.

Particular attention has to be placed in feedstuff fattening process, to not negatively affect its technological characteristics.

ACKNOWLEDGEMENTS: This research was supported by Italian MIUR (Progetto Giovani Ricercatori e Ricercatori Singoli, bando 2001).

Key words: ostrich, eggs, linseed oil, linolenic acid, reproductive performance

Stichworte: Strauss, Eier, Leinöl, Linolensäure, reproduktive Leistungsmerkmale

Parole chiave: struzzo, uova, olio di lino, acido linolenico, efficienza riproduttiva

SUMMARY - N-3 fatty acid deficiency affects avian embryo development and α -linolenic acid seems to have a basic role in ostrich. Thirty-two ostrich females, divided into 3 groups, were fed a diet without (group 0), with 3% (group 3) or 6% (group 6) of linseed oil, from 1 month before laying beginning until its end. The 1st, 20th, 40th and 60th egg were collected. Number of laid eggs, fertility and hatchability were recorded. Yolk fatty acid content was analyzed by gas chromatography on capillary column. Data were processed by ANOVA. Linseed oil supplementation significantly affected α -linolenic acid (3.86, 5.57, 7.08% for group 0, 3 and 6, respectively; $P<0.05$), n-3 fatty acid content (4.12, 6.24, 7.81%, respectively; $P<0.05$) and n-6/n-3 ratio (3.70, 2.83, 1.88%, respectively; $P<0.05$). Reproductive efficiency parameters showed no significant variations. In conclusion, under our farm conditions it was possible to modulate yolk fatty acid content of ostrich egg by feeding, but reproductive performance was not positively affected.

RIASSUNTO – Rapporto fra efficienza riproduttiva e nutrizione nello struzzo (*Struthio camelus*): contenuto di acidi grassi nel tuorlo e fertilità.

La carenza in acidi grassi n-3 influenza negativamente lo sviluppo embrionale e in particolare per lo struzzo, l'acido linolenico sembra avere un ruolo essenziale. 32 femmine di struzzo, divise in tre gruppi, sono state alimentate con tre diete contenenti lo 0%, il 3% o il 6% di olio di lino, a partire da un mese prima dell'inizio del periodo di ovodeposizione e per tutta la sua durata. Sono stati raccolti il 1°, 20°, 40° e 60° uovo e sono stati rilevati i parametri riproduttivi per ciascuna femmina: numero totale di uova deposte, percentuale di uova fertili e di uova schiuse. Attraverso gascromatografia capillare è stato analizzato il contenuto in acidi grassi della componente lipidica del tuorlo. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza. La supplementazione o meno con olio di lino ha influenzato il profilo acidico, variazioni significative si sono avute per l'acido α -linolenico (3.86, 5.57, 7.08% per il gruppo 0%, 3% e 6%, rispettivamente; $P<0.05$), il contenuto totale di acidi grassi n-3 (4.12, 6.24, 7.81%, rispettivamente; $P<0.05$) e il rapporto n-6/n-3 (3.70, 2.83, 1.88%, rispettivamente; $P<0.05$). I parametri riproduttivi non hanno mostrato variazioni significative. In conclusione, attraverso la somministrazione di olio di lino, è stato possibile modulare il rapporto fra i diversi acidi grassi, ma le performance riproduttive non hanno mostrato miglioramenti.

ZUSAMMENFASSUNG - Verhältnis zwischen Nahrung und reproduktiven Leistungsmerkmalen im Strauß (*Struthio camelus*): Dotterfettsäuremuster und Fruchtbarkeit.

N-3 Fettsäurekarenz beeinflusst Embryoentwicklung und α -Linolensäure scheint sehr wichtig im Strauß zu sein. 32 Legesträube, in drei Gruppen verteilt, wurden von einem Monat vor Anfang der Legezeit bis deren Ende (von Dezember bis August) mit 3 verschiedenen Futterm, die 0%, 3% oder 6% Leinöl enthielten, ernährt. Die 1., 20., 40. und 60. Eier wurden gesammelt und Gesamtbetrag von gelegten Eiern, Prozentsätze der Fruchtbarkeit und des Ausbrütens wurden gemessen. Die Fettsäure des Dotters wurden durch Gaschromatographie analysiert. Die Ergebnisse wurden mit ANOVA ausgearbeitet.

Die Verabreichung beeinflusst α -Linolensäure (3.86, 5.57, 7.08% bzw. in der Gruppe 0, 3 und 6; $P < 0.05$), n-3 Fettsäure (4.12, 6.24, 7.81%, bzw.; $P < 0.05$) und n-6/n-3 Bericht (3.70, 2.83, 1.88%, bzw.; $P < 0.05$). Die reproduktiven Parameter hatten keine signifikante Veränderung. Es wurde also damit möglich den Fettsäureinhalt zu modulieren, aber die reproduktiven Leistungsmerkmale wurden nicht verbessert.

LITERATURE

Angel R., 1994. Diet effect on egg nutrients in a high producing ostrich. Proc. Assoc. Avian Vet., Reno, NV, 121-126.

Gonzales A., Satterlee G., Moharer F., Cadd G.G., 1999. Factors affecting ostrich egg hatchability. Poultry Sci., 78, 1257-1262.

Halle I., 2000. Untersuchungen zum Einfluss einer gestaffelten Supplementierung von Fischöl, Leinöl oder einer Kombination aus beider Ölen auf Legeleistungsmerkmale, Einzusammensetzung und Dotterfettsäuremuster bei Legehennen. Arch. Geflügelk., 65: 13-21.

Hargis P.S., Van Elswyk M.E., Margis B.M., 1991. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. Poult. Sci., 70: 874-883.

Kuksis A., 1992. Yolk lipids. Biochim. Biophys. Acta, 1124: 205-222.

Leskanich C.O. and Noble R.C., 1997. Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid composition of avian eggs and meat. World's Poultry Sci. J., 53: 155-183.

Nash D.M., Hamilton R.M.G., Hulan H.W., 1995. The effect of dietary herring meal on the omega-3 fatty acid content of plasma and egg yolk lipids of laying hens. Can. J. Anim. Sci., 75: 247-253.

Noble R.C. and Cocchi M., 1990. Lipid metabolism and the neonatal chicken. Prog. Lipid Res., 29: 107-140.

Noble R.C., Speake B.K., McCartney R.J., Foggin C.M., Deeming D.C., 1996. Yolk lipids and their fatty acids in the wild and captive ostrich (*Struthio camelus*). Comp. Biochem. Physiol., 113B: 753-756.

Sales J., Poggenpoel D.G., Cilliers S.C., 1996. Comparative physical and nutritive characteristics of ostrich eggs. World's Poultry Sci. J., 52: 45-52.

Salghetti A., 2000. Alcune caratteristiche strutturali ed economiche di allevamenti di struzzi. Annali Fac. Med. Vet. Parma, 20: 63-82.

Speake B.K., 1999. Eggs, embryos and evolution: the role of the yolk's fatty acids. Scottish Agricultural College, Annual Report Final, 2: 32-35.

Speake B.K., Murray A.M.B., Noble R.C., 1998. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. Prog. Lipid Res., 37: 1-32.

Speake B.K., Surai P.F., Noble R.C., Beer J.V., Wood N.A.R., 1999. Differences in egg lipid and antioxidant composition between wild and captive pheasants and geese. Comp. Biochem. Physiol., 124B: 101-107.

Surai P.F., Speake B.K., Borlotti G.R., Negro J.J., 2001. Captivity diets alter egg

yolk lipids of a bird of Prey (the American Kestrel) and of a Galliforme (the Red-Legged Partridge). *Physiol. Biochem. Zool.*, 74: 153-160.

Surai P.F., Speake B.K., Noble R.C., Mezes M., 1999. Species-specific differences in the fatty acid profiles of lipids of the yolk and of the liver of the chick. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 733-736.

ALLERGIA ALIMENTARE PER CONSUMO DI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE: STATO DELL'ARTE

Pizzin¹ G., Bentley S.¹, Maggi¹ E.

Introduzione

L'incidenza delle allergie alimentari è in aumento nelle nazioni industrializzate. Le ragioni di tale fenomeno sono state ricondotte a diversi fattori: il consumo di nuovi prodotti (Moneret-Vautrin et al., 1997), l'evoluzione delle tecniche di produzione degli alimenti e l'incremento della sensibilità ad allergeni dei pollini che ha portato ad un incremento delle reazioni crociate con gli alimenti (Jaffuel et al., 1996).

La percezione delle allergie alimentari da parte dell'opinione pubblica è diversa da quella dei medici; infatti il manifestarsi di reazioni secondarie agli alimenti è spesso considerato come evento di natura allergica, quando in realtà rappresenta per lo più un'intolleranza o una semplice avversione per un alimento. Recenti sondaggi dimostrano che circa il 20% della popolazione adulta ritiene di avere allergie alimentari ma, quando si compiono valutazioni approfondite, si evidenzia che solo nell'1-2% dei casi la diagnosi sia corretta (Bousquet et al., 1998). Studi condotti finora documentano un'incidenza di allergia alimentare pari all'1-2% nell'adulto e al 2-8% nel bambino (Jaffuel et al., 2001; Kimber et al., 2002). Questo dato di riferimento sembra comunque essere sottostimato, per una oggettiva difficoltà diagnostica.

La comunità scientifica ha portato ormai da tempo l'attenzione su questa materia, che solo recentemente è stata riconosciuta come problema di sanità pubblica, e attualmente le allergie alimentari sono oggetto di attività normativa sia a livello comunitario sia extracomunitario.

Definizione di allergia

Il termine "allergia" è stato definito già nel 1906 da Von Piquet come la capacità dell'organismo di reagire specificatamente in maniera diversa. La risposta "diversa" può essere sia una risposta protettrice (risposta immunitaria) sia patologica.

Questo significa che l'esposizione di un soggetto ad un allergene è necessaria per stimolare il suo sistema immunitario. In senso generale, l'allergia è dunque un meccanismo immunitario "normale" di difesa dell'organismo; ciò testimonia che questo reagisce contro tutti gli elementi che gli sono estranei. Se non reagisse, inoltre, sarebbe vittima di tutti i batteri, virus e parassiti con cui venisse in contatto.

Sotto il termine generico di allergie ed ipersensibilità alimentari vengono

¹ Sezione di Ispezione Alimenti di origine animale - Facoltà di medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma

incluse diverse entità cliniche che hanno in comune un'anomala o esagerata risposta immunologica a specifiche proteine alimentari, con conseguenti diverse manifestazioni cliniche (Sampson, 1999). Purtroppo il termine "allergia alimentare" viene impiegato in modo improprio, anche per indicare reazioni agli alimenti dovute a difetti metabolici, carenza di enzimi intestinali, effetti tossici (Vigi et al., 2000). Negli ultimi anni, grazie alle recenti acquisizioni scientifiche, è stata uniformata la terminologia impiegata nella letteratura medica internazionale circa la corretta definizione di tutte quelle manifestazioni cliniche che propriamente o impropriamente vengono definite come allergia alimentare (Bjorksten, 2001; Bousquet et al., 1997), che si riporta:

Allergia-Ipersensibilità Alimentare (Food allergy-hypersensitivity): reazione immunologica conseguente all'ingestione di un alimento o di un additivo alimentare. Spesso tale termine è ritenuto sinonimo di reazione IgE mediata; ciò è vero in molti casi, anche se altri meccanismi immunologici possono essere coinvolti.

Anafilassi alimentare (food anaphylaxis): reazione sistemica ad un alimento o ad un additivo alimentare, IgE mediata, che coinvolge particolari mediatori chimici.

Intolleranza alimentare (food intolerance): termine generico che indica la presenza di una risposta anomala ad un alimento o ad un additivo alimentare, in cui mancano i riscontri di un meccanismo immunitario, ma che chimicamente si avvicina alla reazione della ipersensibilità.

Reazione avversa (adverse reaction): termine generico che definisce una risposta clinica abnorme ad un alimento o ad un additivo alimentare.

Reazione idiosincrasica risposta quantitativamente abnorme ad un alimento che si discosta dalle risposte farmacologiche o fisiologiche, non legata a meccanismi immunitari, ma che somiglia alle reazioni di ipersensibilità.

Reazione metabolica: reazione che dipende da un'interazione negativa di un alimento o un additivo alimentare sul metabolismo di un individuo.

Reazione farmacologica: effetto di tipo farmacologico legato ad una sostanza naturale o chimica presente negli alimenti.

Tossicità alimentare: azione diretta di un alimento o di un additivo alimentare, senza il coinvolgimento dei meccanismi immunitari; le tossine possono essere contenute negli alimenti o prodotte da microrganismi che li contaminano (Vigi et al., 2000).

L'allergia alimentare, quindi, è fondata su un meccanismo immunitario, a volte semplice, a volte più complesso: un elemento estraneo (antigene o allergene) provoca da parte dell'organismo una reazione immunitaria (sintesi di un anticorpo o stimolazione di cellule immunocompetenti).

Nel 1963, due immunologi britannici, Gell e Coombs, hanno proposto una classificazione delle manifestazioni di ipersensibilità che, anche se troppo schematica e leggermente inesatta, è ancora molto utilizzata (Jaffuel et al., 2001) e che le ripartisce in quattro tipi:

Tipo I: corrisponde all'ipersensibilità immediata (o anafilattica); questo tipo di allergia è IgE mediata, con liberazione di mediatori chimici, preformati o di neosintesi, da mastociti e di basofili. Insorge in 2-30 minuti dall'ingestione dell'alimento

Tipo II: prevede una reazione citotossica anticorpo-mediata; gli anticorpi IgG o IgM reagiscono con antigeni presenti sulla superficie cellulare, con attivazione del complemento e distruzione della cellula coinvolta. Insorge dopo 5-6 ore.

Tabella I - Classificazione delle reazioni di ipersensibilità secondo Gell e Coombs

<i>Esempi</i>	<i>Meccanismi</i>		<i>Tempo di reazione</i>
	Cellule attivate	Mediatori solubili	
<i>Ipersensibilità immediata</i> <i>Tipo I:</i> Anafilassi sistemica e locale; atopie (febbre da fieno, asma, orticaria, allergie alimentari)	Mast-zellen Granulociti basofili Piastrine (solo in alcune specie)	Istamina, bradichinina, serotonina, SRS-A*, prostaglandine, PAF**	2-30 minuti
<i>Tipo II:</i> Reazioni trasfusionali; malattia emolitica neonatale da incompatibilità materno-fetale; malattie da autoanticorpi (anemia emolitica, trombocitopenia, agranulocitosi)	In alcuni casi i linfociti "Killer"	No	5-6 ore
<i>Tipo III:</i> Fenomeno di Arthus; malattia da siero eterologo; malattie da immunocomplessi (glomerulonefriti post-streptococciche, vasculite in corso di lupus eritematoso sistemico, coriomeningite linfocitaria)	Neutrofili	Enzimi lisosomiali	2-8 ore
<i>Ipersensibilità ritardata</i> <i>Tipo IV:</i> Allergie in corso di malattie infettive (tubercolosi, brucellosi, sifilide, micosi), dermatiti da contatto; rigetto dei trapianti.	Linfociti T Macrofagi Basofili	Linfocine	24-72 ore

Da Poli G., 1991 (modificato)

*SRS-A=Slow Reacting Substance of Anaphylaxis

**PAF= Platelet Activating Factor

Tipo III: reazione mediata da immuno-complessi; formazione negli spazi extracellulari di complessi antigene anticorpo (IgG o IgM) che si depositano in vari tessuti con attivazione del complemento e successiva reazione infiammatoria. Insorge dopo 2-8 ore.

Tipo IV: ipersensibilità cellulo-mediata; interazione fra antigeni tissutali e linfociti TDHTH con liberazione di citochine che attivano i macrofagi o linfociti Tc, mediatori del danno tissutale. Insorge dopo 24-72 ore (Vigi et al., 2000).

La nozione di reazione legata all'ingestione di un alimento risale a più di 2000 anni fa; fu Ippocrate a documentare i primi casi di allergia al latte.

Alimenti coinvolti

Come già ricordato, il problema delle allergie alimentari è noto da moltissimo tempo; il mondo scientifico è stato più volte chiamato a rispondere sulle cause e soprattutto sugli alimenti responsabili di tali allergie; un documento ufficiale che riassume tali conoscenze è stato redatto, nel Novembre 1995, da una Commissione di esperti della FAO. La lista degli alimenti considerati è attualmente utilizzata dalla Commissione del Codex Alimentarius per l'etichettatura dei prodotti alimentari.

Il suddetto documento (Report of the FAO, Roma 1995) contiene la lista di 8 classi di alimenti "potenzialmente patogeni" quali:

1. Orzo, avena, grano, triticale e prodotti derivati (compresi glutine e amido).
2. Crostacei, frutti di mare e prodotti derivati;
3. Uova e ovoprodotti;
4. Pesce e prodotti a base di pesce;
5. Legumi, piselli, arachidi, soia e prodotti derivati;
6. Latte e prodotti a base di latte;
7. Solfiti in concentrazioni maggiori di 10 mg/kg;
8. Nocciole, semi di papavero, semi di sesamo e prodotti derivati.

Questa lista, naturalmente, è ritenuta come un punto di partenza per tutta una serie di considerazioni e aggiornamenti che già sono stati apportati dalla commissione europea per le allergie alimentari: International Life Sciences Institute (ILSI Europe Food Allergy Task Force), che ha già aggiunto alla lista altri alimenti quali il sedano e i *Prunoideae* (pesca, susina, albicocca, ciliegia, mandorla); la nuova lista pubblicata recentemente è contenuta nell'allegato III bis della Direttiva 2003/89/CE.

Questa commissione inoltre sta valutando la possibilità di stabilire dei valori soglia dei cibi allergenici, e di stabilire se le lavorazioni dei prodotti possono modificare il potere allergenico dei cibi (Bousquet et al., 1998).

Naturalmente accanto a questi cibi, dei quali è stato dimostrato il potere allergenico, effettuato prevalentemente con un test di provocazione in doppio con un placebo positivo (Bousquet et al., 1998), ve ne sono molti altri. Possiamo affermare che tutti i cibi possono, potenzialmente, provocare una reazione allergica anche se, come detto sopra, poche classi di cibi sono risultate responsabili della maggioranza delle allergie alimentari finora diagnosticate (Hugh et al., 2003).

Tra gli alimenti di origine animale sono stati recentemente segnalati numerosi casi di allergie alimentari, che finora non erano state evidenziate, dovute a: carne di

maiale (Atanaskovic-Markovic et al., 2002), carne di manzo, (Orhan e Sekerel, 2003; Fiocchi et al., 1995; Martelli et al., 2002), carne di rana (Hilger et al., 2002; Romano et al., 2000) e carne di ovino (Fiocchi et al, 1995).

Allo stato attuale, dalle indagini epidemiologiche, emerge che, tra gli alimenti di origine animale, 5 classi sono responsabili del 90% delle allergie alimentari: il latte e derivati, le uova, il pesce, i crostacei e i molluschi (Bousquet et al., 1998).

Latte e derivati

L'intolleranza al latte vaccino è stata accertata nel 2-5% dei bambini. Questa intolleranza, riconducibile all'intolleranza al lattosio, non deve essere confusa con una vera allergia al latte (IgE dipendente) che, da numerosi studi, sembra sostenuta dalla caseina ($\alpha\beta\gamma\chi$) (Bos d 8), dalle sieroproteine α -lactalbumina (Bos d 4) e β -lactoglobulina (Bos d 4) e dall'albumina (Bos d 7). La caseina è considerata il più potente allergene in grado di provocare reazioni cutanee e la betaglobulina l'allergene che dà il più alto numero di positività ai test di provocazione. I processi di pastorizzazione del latte non riducono l'allergenicità delle proteine del latte vaccino dato che la maggior parte degli allergeni è resistente al calore e alla degradazione proteolitica, mentre i trattamenti ad alta temperatura eliminano l'allergenicità di alcune proteine. Le tecniche migliori per ridurre l'allergenicità delle proteine alimentari sono rappresentate dalla idrolisi enzimatica o, più ancora, da una combinazione di metodiche di idrolisi associate al trattamento al calore e ad ultrafiltrazione. Nel latte vaccino le proteine native sono gli allergeni più frequenti, anche se i processi di trasformazione alimentare possono crearne di nuovi. L'allergicità e l'antigenicità delle proteine del latte vaccino risultano essenzialmente età-dipendenti, in quanto la risposta allergica alla componente proteica del latte tende, nella maggior parte dei casi, ad esaurirsi proprio con l'età (Vigi et al., 2000).

Uova

Gli studi sul potere allergenico di questo alimento si sono principalmente soffermati sulla valutazione delle uova di gallina, dimostrando che l'albume ha un potere allergizzante maggiore rispetto al tuorlo, anche se si sono osservati pazienti le cui IgE erano dirette contro quest'ultimo (Langeland, 1983).

I maggiori agenti allergizzanti dell'uovo sono descritti nella tabella II.

Inoltre, nel tuorlo si ipotizza la presenza di un allergene, l'alfa-livitina, che sembra il più importante allergene dell'uovo introdotto per via inalatoria (Van Toorenbergen et al., 1994).

Tabella II - Allergeni dell'uovo: nomenclatura secondo IUIS (in corsivo)

Codice Nome	Organismo	Allergene	MW
F1 Albume d'uovo	<i>Gallus Domesticus</i>		
F233 Ovomucoide	<i>Gallus Domesticus</i>	<i>Gal-d 1</i>	28 KDa
F232 Ovoalbumina	<i>Gallus Domesticus</i>	<i>Gal-d 2</i>	44 KDa
F83-III Conalbumina (Ag22), ovotransferrina	<i>Gallus Domesticus</i>	<i>Gal-d 3</i>	78 KDa
F84-IV Lisozima	<i>Gallus Domesticus</i>	<i>Gal-d 4</i>	14 KDa
F75 Tuorlo d'uovo liofilizzato	<i>Gallus Domesticus</i>		
F245 Uovo intero	<i>Gallus Domesticus</i>		

Da Poulsen et al., 2001

Pesce

In più studi è stata dimostrata l'allergia alimentare sostenuta dalla carne di pesce; sono stati identificati degli allergeni maggiori, che sono: (Gad c 1) allergene maggiore del merluzzo, chiamato ancora allergene M (una parvoalbumina riscontrata nel muscolo) (Elsayed et al., 1975) e (Sal s 1) allergene maggiore del salmone (anch'esso una parvoalbumina). Entrambi sono all'origine di una reazione crociata tra le varie specie di pesci ma anche con i prodotti derivati come il surimi.

Crostacei e molluschi

In queste classi di alimenti bisogna distinguere: crostacei, costituiti da gamberetti, gamberi, aragoste, granchio, astice; molluschi bivalvi (vongole, ostriche, cozze, conchiglie Saint-Jacques); gasteropodi, lumache di mare e cefalopodi quali polipo, calamari, seppie. La reazione allergica ai gamberetti è stata dimostrata più volte e l'allergene maggiormente implicato è una proteina di 36 KDa (Pen i) che deriva dalla tropomiosina. Questo antigene origina anche una reazione crociata IgE-dipendente con altri crostacei e /o molluschi (Leung et al., 1996).

Per quanto riguarda i molluschi sono stati riportati casi di allergia dopo ingestione di calamari (Carillo et al., 1992), balano e orecchia di mare, o addirittura dopo semplice contatto olfattivo con gli stessi; è tuttavia ancora da dimostrare la responsabilità di questi alimenti nelle allergie alimentari.

Strumenti normativi per la tutela e l'informazione del consumatore allergico

La Commissione delle comunità europee, al fine di garantire una maggior tutela della salute dei consumatori ed il diritto ad una corretta informazione, ha richiesto il riesame della normativa in vigore, ossia la Direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio in materia di "ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità". Il riesame della suddetta Direttiva si è reso necessario per

regolamentare la problematica sulle allergie alimentari, di interesse sempre più attuale, visto il numero crescente di soggetti che rivelano tale affezione e di cibi coinvolti.

Il lavoro della Commissione si è concluso con l'emanazione della Direttiva 2003/89 del 10 Novembre 2003, dove si precisa la necessità di una corretta informazione al consumatore finale circa la composizione degli alimenti (per evitare che il sempre maggior numero di persone affette da allergia alimentare possa avere "ansia da alimento"), evitando in etichetta, presentazione e pubblicità tutte quelle formule che potrebbero lasciare dubbi circa l'effettiva composizione; appare ad esempio evidente, come l'attuale enunciato in etichetta "può/potrebbe contenere" riferito a ingredienti potenzialmente allergici (benché coerente con le finalità di informazione del consumatore) debba, con l'acquisizione di nuove conoscenze scientifiche e di conseguenti azioni volte alla gestione del rischio, essere superato da informazioni sempre più precise.

Il Comitato scientifico, ancora in questa Direttiva, afferma che "l'incidenza delle allergie alimentari è tale che esse condizionano la vita di numerose persone, provocando malattie di cui alcune sono benigne, ma altre possono anche rivelarsi mortali". Lo stesso Comitato, riconoscendo ancora negli additivi, nei coadiuvanti tecnologici e nelle altre sostanze di cui all'art. 6, paragrafo 4, lettera a) della Direttiva 2000/13/CE effetti allergenici, invita i produttori ad una precisa, puntuale e completa etichettatura.

Un passo normativo senz'altro importante questo, che riconosce le allergie alimentari quale problema di salute pubblica. Sarà però necessario puntualizzare questo primo passo normativo con l'aiuto di monitoraggi, corretta diagnosi e coordinamento con il mondo scientifico, giuridico e produttivo se si vorranno raggiungere gli obiettivi che questa Direttiva si è prefissata.

Conclusioni

In tema di sicurezza alimentare le allergie sono sempre più considerate, sia dal mondo scientifico, sia giuridico. Le cause che hanno determinato questa attenzione sono molteplici: l'accresciuta sensibilità individuale del consumatore verso molti alimenti, la maggiore varietà di prodotti proposti dal mercato, l'affinarsi delle tecniche diagnostiche sulle allergie alimentari hanno portato ad individuare un sempre maggior numero di consumatori, specialmente nella fascia dell'infanzia, affetti da questo tipo di patologia.

La valutazione ed il monitoraggio di questo rischio si stanno sempre più definendo grazie ad un insieme di fattori: un'accresciuta attenzione e consapevolezza del consumatore verso ciò che mangia e che sempre più "teme", una sempre maggior sensibilità del medico, che riesce a diagnosticare più agevolmente di prima una probabile allergia alimentare infine maggiori conoscenze scientifiche, che riescono ad individuare e riconoscere gli allergeni responsabili di tali manifestazioni cliniche.

Naturalmente le conoscenze acquisite sono ancora davvero esigue a fronte degli innumerevoli quesiti circa la corretta identificazione degli allergeni, la dose soglia responsabile di allergia, gli effetti delle nuove tecnologie di produzione sui componenti dei cibi e ancora l'introduzione dei cibi prodotti con Organismi Geneticamente

Modificati.

In questo momento storico sembra quasi che alimentarsi non sia più un piacere, ma stia diventando una “timorosa” necessità. Per allontanare ogni apprensione da questo momento della vita, sarà necessario fornire al consumatore ogni tranquillizzante ragguaglio scientifico anche in tema di allergie alimentari.

Key words: Food allergy, food of animal origin, labelling.

Mots Clés: Allergie alimentaire, aliments d'origine animale, législation.

Parole Chiave: Allergia alimentare, alimenti di origine animale, normativa

Riassunto

Le allergie alimentari sono diventate sempre più oggetto di attenzione negli ultimi anni da parte della comunità scientifica, a causa del continuo aumento dei casi registrati, tanto che anche i recenti sviluppi normativi prendono in esame quella che fino a poco tempo fa era considerata una categoria di consumatori marginale. Gli Autori puntualizzano lo stato delle conoscenze scientifiche sul determinismo dei fenomeni allergici legati al consumo di alimenti di origine animale e la legislazione attualmente in vigore ai fini della prevenzione del rischio e l'informazione del consumatore.

Abstract

Food allergies have become more and more a matter of concern throughout the last few years, due to the steep increase in their prevalence, the role of new food technologies and the interest for food-related risk analysis in selected groups of consumers. The Authors highlight the scientific state-of-the-art in regard of allergies related to consumption of food of animal origin, as well as European law currently in force in regard of food labelling and consumers' information.

Résumé

Les allergies alimentaires représentent, des plus en plus, un sujet important pour la santé.

L'incidence de l'allergie alimentaire est en augmentation et maintenant la législation européen a considéré ce problème avec l'objectif de la prévention du risque parmi des renseignements précis au consommateur. Les auteurs ont envisagé le problème relativement aux aliments d'origine animale.

Bibliografia

1. Atanaskovic-Markovic M., Gavrovic-Jankulovic M., Jankov R. M., Vuèkovic O., Nestorovic. (2002). Food allergy to pork meat. *Allergy* 57, 960-961.
2. Bjorksten B. (2001). The epidemiology of food allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 1, 225-7.
3. Bousquet J., Bjorkstén B., Bruijnzeel-Koomen CAFM., Huggett A., Ortolami C., Warner J. O., Smith M., (1998). Scientific criteria and selection of allergic food for product labelling.

- Allergy 53; 3-21.
4. Bousquet J., Metcalf D., Wormer J. (1997). Food allergy position paper of the Codex Alimentarius. *Allergy Clin. Immunol Int.* **10**,21.
 5. Carillo T., M, Castillo R., Caminero J. (1992). Squid Hypersensitivity : a clinical and immunological study *Ann. Allergy.* 68: 483-7.
 6. Elsayed S., Bennich H. (1975). The primary structure of allergen M from cod. *Scand J. Immunol.* 4: 203-8.
 7. FAO. (1995). Report of the Report of the Technical Consultation on Food Allergies, Rome, Italy, 13-14 Nov.
 8. Fiocchi A., Restani P., Riva E. (1995). Meat allergy II-Effects of food processing and enzymatic digestion on the allergenicity of bovine and ovine meat.
 9. Fiocchi A., Travaini M., Terraciano L. (2001). Natural history of beef allergy in children. *Allergy.* 56; 176 A.
 10. GUCE L 308/25/11/2003, Direttiva 2003/89/CE del 10 Novembre 2003, che modifica la direttiva 2000/13/CE per quanto riguarda l'indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari.
 11. Hilger C., Grigioni F., Thill L., Mertens L., Hentges F. (2002). Severe IgE-mediated anaphylaxis following consumption of fried frog legs: definition of alfa-parvalbumin as the allergen in cause. *Allergy*, 57, 1053-1058.
 12. Hugh A., Sampson M.D. (2003). Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111; S540-547.
 13. Jaffuel D., Demoly P., Dhivert-Donnadieu H., Bousquet J., Michel F.B., Godard P. (1996). Epidémiologie et génétique de l' asthme. I. Epidémiologie descriptive et analytique des facteurs environnementaux. *Rev. Mal. Respir.* 13, 455-65.
 14. Jaffuel D., Demoly P., J. Bousquet J. (2001). Les allergies alimentaires. *Rev. Fr Allergol. Immunol.* 41; 169-186.
 15. Kimber I., Dearman R.J. (2002). Factors affecting the development of the food allergy. *Proceedings of the Nutrition Society*; 61, 435-439.
 16. Langeland T. (1983). A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. Occurrence of proteins cross-reacting with allergens in hen's egg white as studied in egg white from turkey, duck, goose, seagull, and in hen egg yolk, and hen and chicken sera and flesh. *Allergy* . 38: 399-412.
 17. Leung P.S., Chou W.K., Duffey S., Kwan H.S., Gershwin M.E., Chu K.H. (1996). IgE reactivity against a cross-reactive allergen in Crustacea and Mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98, 954-61.
 18. Martelli A., De Chiara A., Corvo M., Restani P., Fiocchi A. (2002). Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89(S), 38-43.
 19. Moneret-Vautrin D. (1997) Les allergènes alimentaires et leurs modification par les technologies agroalimentaire. *Cah Agricultures.* 6, 21-9.
 20. Orhan F., Sekerel E. (2003). Beef allergy: a review of 12 cases. *Allergy*, 58, 127-131
 21. Poli G. (1991) *Microbiologia e Immunologia II^a Eds UTET.*
 22. Poulsen L.K., Hansen T.K., Nergaard A., Vestergaard H., Skov P.S., Bindslev-Jensen C. (2001). Allergens from fish and egg. *Allergy*; 56 S67; 39-42
 23. Romano C., Ferrara A.M., Cislighi C., Falagiani P. (2000). Food allergy to frog. *Allergy* 55; 584-585.
 24. Sampson H. A. (1999). Food Allergy: Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin Immunol.* 103; 717-728.
 25. Van Toorenbergen A.W., Huijskes-Heins M.I.E., Van Wijk R.G. (1994). Different pattern of IgE binding to chicken egg yolk between patients with inhalant allergy to birds and food-allergic children. *Int Arch Allergy Immunol*; 104, 199-203.
 26. Vigi V., Fanaro S. (2000). Le allergie alimentari nella prima infanzia. *Minerva pediatrica*; 52, 4, 215-225.

LE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE IN CANI E GATTI CON DEFICIT NEUROLOGICI DELLA MINZIONE CONSEQUENTI A LESIONI DEL MIDOLLO SPINALE O DELLA CAUDA EQUINA

De Risio L., Ossiprandi M.C., De Razza P., Venzi C.

RIASSUNTO

LE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE IN CANI E GATTI CON DEFICIT NEUROLOGICI DELLA MINZIONE CONSEQUENTI A LESIONI DEL MIDOLLO SPINALE O DELLA CAUDA EQUINA.

In medicina umana, la letteratura internazionale ha approfondito la problematica correlazione tra SCI e insorgenza di UTI, studiando la patogenesi, l'epidemiologia, i fattori di rischio, i batteri più frequentemente coinvolti e la profilassi di queste infezioni.

In letteratura veterinaria, le informazioni relative ad incidenza, fattori di rischio e profilassi delle UTI in cani e gatti con SCI sono piuttosto limitate.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la prevalenza di UTI in cani e gatti affetti da lesioni del midollo spinale e della cauda equina, di gravità tale da causare deficit neurologici della minzione.

Sono stati inclusi nello studio 27 cani e 7 gatti esaminati dal Novembre 2001 al Dicembre 2003 per lesioni al midollo spinale associate a disturbi della minzione. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame neurologico e a diverse indagini collaterali. Particolare attenzione è stata posta all'esame batteriologico dell'urina.

Nella nostra casistica, le UTI si sono verificate in circa la metà dei soggetti inclusi nello studio. Il pattern di specie batteriche isolate, complessivamente e considerando anche le recidive, è rappresentato da *Enterococcus* (37,5%), *Escherichia coli* (25%), *Pseudomonas aeruginosa* (25%) e *Proteus mirabilis* (6,25%). Questi risultati sono analoghi a quanto riportato in medicina umana.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una stretta correlazione tra SCI e UTI nei cani e nei gatti. Si può concludere che una diagnosi precoce e una corretta gestione della vescica nel paziente neurologico con deficit della minzione sono di fondamentale importanza al fine di ridurre l'incidenza delle infezioni del tratto urinario e consentire il percorso riabilitativo.

SUMMARY

UTI IN DOGS AND CATS WITH NEUROLOGICAL MICTURITION DISORDERS CAUSED BY SPINAL CORD OR CAUDA EQUINA INJURIES.

In human medicine the international literature has examined the correlation between SCI and UTI, studying the pathogenesis, the epidemiology, the risk factors, the most frequently involved bacteria and the prophylaxis of these infections.

In veterinary literature there is few information on the incidence, risk factors and prophylaxis of UTI in dogs and cats with SCI.

The purpose of this study was to assess the prevalence of UTI in dogs and cats with spinal cord or cauda equina injuries causing neurological deficits of micturition.

27 dogs and 7 cats with neurological disorders of micturition secondary to spinal cord or cauda equina disease were included in the study. All cases were examined from November 2001 to December 2003. All patients underwent general physical and neurological examination, urine culture and sensitivity, and several diagnostic procedures. In our case series UTI occurred in almost half of the cases. The pattern of bacterial species isolated, including recurrence, showed a frequency of *Enterococcus* (37.5%), *Escherichia coli* (25%), *Pseudomonas aeruginosa* (25%) and *Proteus mirabilis* (6.25%). These results are similar to those reported in human medicine.

Our results show a close correlation between SCI and UTI in dogs and cats. We can conclude that an early diagnosis and a correct management of the bladder in neurological patients with micturition disorders are very important to reduce the incidence of UTI.

RESUME

LES INFECTIONS DU TRAIT URINAIRE DES CHIENS ET DES CHATS AVEC DES DEFICITS NEUROLOGIQUES DE LA MICTION CONSEQUENTS AUX LESIONS DE LA MOELLE EPINIÈRE OU DE LA CAUDA EQUINA.

La littérature internationale de Médecine humaine a approfondi la corrélation problématique entre le dommage de la moelle épinière et le développement des infections du trait urinaire, en étudiant la pathogénie, l'épidémiologie, les facteurs de risque et les bactéries les plus souvent impliquées et la prophylaxie de ces infections.

La littérature vétérinaire est plutôt limitée pour ce qui concerne l'incidence, les facteurs de risque et la prophylaxie des infections du trait urinaire des chiens et des chats avec un dommage de la moelle épinière.

Le but de cette étude concerne la valuation de la prévalence des infections du trait urinaire des chiens et des chats avec des lésions graves de la moelle épinière et de la cauda equina qui provoquent des déficits de la miction.

Dans l'étude on a compris 27 chiens et 7 chats examinés depuis Novembre 2001 à Décembre 2003 pour des lésions de la moelle épinière associées aux troubles de la miction. Tous les patients ont été soumis à l'examen neurologique et aux plusieurs examens collatéraux. Surtout on a fait attention à l'examen bactériologique de l'urine. Dans notre casuistique à peu près la moitié des animaux inclus dans l'étude a présenté l'infection du trait urinaire. Les espèces bactériennes isolées, comptant les récidives aussi, mettent en évidence une prévalence d'*Enterococcus* (37,5%), *Escherichia coli* (25%), *Pseudomonas aeruginosa* (25%) et *Proteus mirabilis* (6,25%). Ces résultats correspondent à ce qui est porté dans la médecine humaine.

Les résultats obtenus ont mis en évidence une forte corrélation entre le dommage de la moelle épinière et les infections du trait urinaire dans les chiens et les chats. On peut affirmer que un diagnostic précoce et une gestion correcte de la vessie du patient neurologique avec un déficit de la miction est très important pour réduire l'incidence des infections du trait urinaire et pour permettre le parcours de réhabilitation.

PREMESSA

In medicina umana le infezioni delle vie urinarie (UTI– *Urinary Tract Infection*) costituiscono la seconda causa di morte nei pazienti affetti da lesioni del midollo spinale (SCI- *Spinal Cord Injury*).^{11, 13, 18, 26, 35, 36} In questi soggetti le UTI sono caratterizzate da elevata morbilità e frequenti complicanze quali pielonefriti, nefriti e setticemie.³⁶ Uno studio condotto dall'Università della California ha rilevato che il 57% dei pazienti con SCI manifestava UTI o batteriuria nell'anno successivo al trauma spinale.^{11, 26} Le UTI, inoltre, interferiscono con i programmi di riabilitazione e prolungano il tempo di ricovero, ostacolando il pieno recupero della funzionalità urinaria nei soggetti che hanno subito un grave trauma spinale.¹⁸

In medicina umana la letteratura internazionale ha approfondito la problematica correlazione tra SCI e insorgenza di UTI, studiando la patogenesi, l'epidemiologia, i fattori di rischio, i batteri più frequentemente coinvolti e la profilassi di queste infezioni.^{2, 11-15, 18, 19, 24, 26, 35, 36, 38}

In letteratura veterinaria, le informazioni relative ad incidenza, fattori di rischio e profilassi delle UTI in cani e gatti con SCI sono piuttosto limitate.^{28, 34, 37} Prima di approfondire queste tematiche esponendo la nostra esperienza, riteniamo opportuno fare una breve premessa sulla neurofisiologia della minzione.

La minzione è un complesso meccanismo che permette l'eliminazione coordinata d'urina, in risposta ad una distensione graduale della vescica urinaria.⁴ La reazione della minzione è regolata dall'attività integrata del sistema nervoso autonomo (Simpatico e Parasimpatico) e dal sistema nervoso somatico ed è modulata da centri nervosi superiori quali la corteccia cerebrale, il cervelletto e il ponte.^{4, 31} Le lesioni del midollo spinale di una certa gravità interrompono la possibilità da parte dei centri superiori di controllare e coordinare l'attività dei nervi Pelvico, Ipogastrico e Pudendo. Il nervo Pelvico (Sistema Nervoso Parasimpatico) origina dai metameri spinali sacrali S1-S2-S3. E' costituito da fibre sensoriali che forniscono informazioni relative allo stato di replezione della vescica e da fibre motorie che determinano la contrazione del muscolo detrusore e un rilasciamento degli sfinteri uretrali.⁵ Quando predomina l'attività del Parasimpatico si ha lo svuotamento della vescica (FASE DI SVUOTAMENTO).³¹

Il nervo Ipogastrico (Sistema Nervoso Simpatico) origina dai metameri spinali lombari L1-L4 nel cane e L2-L5 nel gatto. Le fibre nervose pre-gangliari sinaptano a livello di ganglio mesenterico caudale da cui originano le fibre nervose post-gangliari che forniscono l'impulso simpatico ai recettori adrenergici della parete vescicale (recettori di tipo beta) e dello sfintere uretrale interno (recettori di tipo alfa).^{4, 5, 25, 31} L'attivazione dei recettori beta adrenergici determina un rilasciamento del muscolo detrusore e l'attivazione dei recettori alfa adrenergici causa la contrazione dello sfintere uretrale interno.³² Quando prevale l'attività del Simpatico si ha la FASE DI ACCUMULO dell'urina in vescica.³¹

L'innervazione somatica è veicolata dal nervo Pudendo che origina dai metameri spinali sacrali S1-S2-S3 ed innerva lo sfintere uretrale esterno mantenendone la contrazione durante il riempimento vescicale ed il rilasciamento durante la fase di svuotamento.⁵

Il normale svolgimento e l'alternarsi della fase di accumulo e di quella di svuotamento dipendono dall'integrità anatomica e funzionale di tutte le strutture nervose che regolano

la minzione.¹⁰

Le lesioni del midollo spinale che causano alterazione della minzione si distinguono in: lesioni da motoneurone superiore (MNS) e da motoneurone inferiore (MNI). Le prime si localizzano tra il centro pontino della minzione ed il settimo metamero spinale lombare (L7), le seconde coinvolgono i metameri spinali sacrali S1-S2-S3 e/o le radici nervose che da essi originano e/o il nervo pelvico e il nervo pudendo.³¹

Nei pazienti con lesioni da MNS le vie sensoriali e motorie che trasmettono rispettivamente afferenze ed efferenze tra il centro pontino della minzione e la vescica sono interrotte, pertanto viene meno il controllo dei centri superiori sulla minzione. La funzionalità del nervo pelvico rimane integra e, di conseguenza, il tono del muscolo detrusore è normale. La persistenza della funzionalità del nervo pudendo determina un tono dello sfintere uretrale esterno normale o aumentato, a causa della mancata inibizione dei centri superiori su un nervo somatico.^{25, 27}

Nei pazienti con lesione da MNS l'incapacità di svuotare completamente la vescica può indurre una sovradistensione della parete vescicale. Se quest'ultima persiste per 1-2 settimane, si ha una rottura irreversibile delle giunzioni serrate tra le fibrocellule del muscolo detrusore, con conseguente perdita di contrattilità ed elasticità della parete vescicale.¹⁰

Nei soggetti con lesioni da MNI si verifica la diminuzione o l'assenza di contrazione del muscolo detrusore ed una riduzione del tono degli sfinteri uretrali.⁴ Dal punto di vista clinico l'animale presenta incontinenza urinaria. La vescica si riempie e si svuota, anche se non completamente, senza controllo volontario. Lo svuotamento manuale della vescica risulta di facile esecuzione. Minori sono le resistenze durante le manualità, minore è il tono dello sfintere uretrale esterno e quindi più grave è la lesione.^{16, 27, 31}

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la prevalenza di UTI in cani e gatti affetti da lesioni del midollo spinale e della cauda equina, di gravità tale da causare deficit neurologici della minzione. Una particolare attenzione è stata rivolta al follow up a lungo termine di tutti i pazienti inclusi nel nostro studio al fine di valutare l'andamento di tali infezioni (eventuali recidive, reinfezioni o superinfezioni).

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nel nostro studio 34 pazienti con lesioni del midollo spinale o della cauda equina associate a disturbi neurologici della minzione, esaminati presso la Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza dell'Università degli Studi di Parma dal Novembre 2001 al Dicembre 2003.

Dei 34 soggetti, 27 erano cani (20 maschi e 7 femmine) e 7 gatti (3 maschi e 4 femmine). L'età media dei cani era di $6,3 \pm 3,5$ anni, quella dei gatti $1,3 \pm 0,8$ anni.

I cani appartenevano alle seguenti razze: 9 meticci, 4 Bassotti, 4 Pastori Tedeschi, 1 Maltese, 1 Bichon Frisé, 1 Shih-tzu, 1 Barbone, 1 Segugio, 1 Lagotto Romagnolo, 1 Cocker Americano, 1 Bovaro del Bernese, 1 Dalmata ed 1 Boxer. I gatti erano tutti di razza Europea.

Alla prima visita clinica è stato effettuato il segnalamento dell'animale ed è stata raccolta un'anamnesi accurata, prestando particolare attenzione al controllo volontario della minzione ed alle modalità con cui era stata gestita una eventuale disfunzione.

Inoltre tutti i pazienti sono stati sottoposti ad accurato esame obiettivo generale ed a visita neurologica.

Dei 27 cani inclusi nello studio, 19 presentavano deficit neurologici caratteristici di una mielopatia traversa del tratto T3-L3 (TAB.1.A. casi 1-19) e 8 presentavano deficit neurologici localizzabili a livello L4-S3 (TAB.1.B. casi 20-27).

TAB.1.A. Cani con localizzazione neurologica T3-L3

Caso n.	Segnalamento	Deficit motorio AP	Minzione
1	Bassotto, A 6, M	Paraparesi deambulatoria	Lieve deficit da MNS
2	meticcio, A 4, M	Paraparesi non deambulatoria	Parziale deficit da MNS
3	Maltese, A 6, M	Paraplegia	Vescica da MNS
4	Bassotto, A 6, F	Paraplegia	Vescica da MNS
5	Bichon Frisé , A 5, M	Paraplegia	Vescica da MNS
6	Shih-tzu, A 3, M	Paraplegia	Vescica da MNS
7	Bassotto, A 6, M	Paraplegia	Vescica da MNS
8	meticcio, A 4, M	Paraplegia	Vescica da MNS
9	Bassotto, A 5, M	Paraplegia	Vescica da MNS
10	meticcio, A 4, M	Paraplegia	Vescica da MNS
11	Cocker A , A 3, F	Paraplegia	Vescica da MNS
12	Pastore T, A 8, M	Paraparesi deambulatoria	Vescica da MNS
13	Pastore T, A 6, M	Paraparesi deambulatoria*	Normale*
14	Pastore T, A 6, M	Paraplegia	Vescica da MNS
15	Pastore T, m3, F	Paraplegia	Vescica da MNS (riflessa)
16	meticcio A 6, M	Paraplegia	Vescica da MNS
17	Lagotto, A 14, M	Paraplegia	Vescica da MNS
18	meticcio, A 8, M	Paraplegia	Vescica da MNS
19	Bovaro, A 3, F	Paraplegia	Vescica da MNS

Legenda: A= anni, m=mesi, M= maschio, F= femmina, AP= arti pelvici, MNS= motoneurone superiore

*questo soggetto successivamente ha sviluppato paraplegia e vescica da MNS

TAB.1.B. Cani con localizzazione neurologica L4-S3

Caso n.	Segnalamento	Deficit motorio AP	Minzione
20	meticcio, A 16, M	Paraparesi deambulatoria	Vescica da MNI
21	meticcio, m 10, F	Paraparesi non deambulatoria	Vescica da MNI
22	Segugio, A 2, M	Paraparesi non deambulatoria	Vescica da MNI
23	meticcio, A 4, M	Paraplegia	Vescica da MNI
24	meticcio, A 12, M	Paraplegia	Vescica da MNI
25	Dalmata, A 7, F	Paraparesi deambulatoria	Vescica da MNI
26	Barbone, A 8, M	Paraparesi non deambulatoria	Vescica da MNI
27	Boxer, A 4, F	Paraplegia	Vescica da MNI

Legenda: A= anni, m= mesi, M= maschio, F= femmina, AP= arti pelvici, MNI= motoneurone inferiore
 Uno dei 7 gatti (caso 34) evidenziava mielopatia traversa T3-L3, con andatura spinale e vescica da MNS, mentre gli altri 6 presentavano deficit neurologici localizzabili a livello (L7)-S1-S2-S3 e coccigeo (TAB.1.C. casi 28-33).

TAB.1.C. Gatti con localizzazione neurologica L7-S3

Caso n.	Segnalamento	Deficit motorio AP	Minzione
28	gatto Europeo, A 3, M	—	Parziale deficit da MNI
29	gatto Europeo, m 8, M	—	Vescica da MNI
30	gatto Europeo, A 1, M	—	Vescica da MNI
31	gatto Europeo, A 1, F	—	Vescica da MNI
32	gatto Europeo, m 8, F	—	Vescica da MNI
33	gatto Europeo, A 1, M	Paraplegia	Vescica da MNI

Legenda: A= anni, m=mesi, M= maschio, F= femmina, AP= arti pelvici, MNI= motoneurone inferiore

In tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati effettuati i seguenti accertamenti: esame emocromocitometrico, profilo biochimico, urocoltura previo prelievo di urina mediante cistocentesi o cateterismo sterile, e radiografie dirette. L'esame chimico-fisico delle urine è stato effettuato in diversi soggetti e spesso ripetuto nel periodo di follow up. Gli accertamenti batteriologici sulle urine sono stati effettuati presso la Sezione di Microbiologia ed Immunologia Veterinaria. Inoltre, quando indicato, sono stati effettuati l'analisi del liquido cefalorachidiano, la mielografia e la TAC. Nel gruppo dei cani con localizzazione neurologica T3-L3 è stata fatta diagnosi di: estrusione discale in 3 meticci (casi 2, 8, 10), 4 Bassotti (casi 1, 4, 7, 9), 1 Maltese (caso 3), 1 Bichon Frisé (caso 5), 1 Cocker americano (caso 11) ed 1 Shih-tzu (caso 6); di protrusione discale nei 3 Pastori Tedeschi (casi 12-14); di frattura e sublussazione vertebrale in 1 Pastore Tedesco (caso 15), 2 meticci (casi 16, 18) ed 1 Lagotto (caso 17); di neoplasia della guaina nervosa (NST) in 1 Bovaro del Bernese (caso 19). In base alla diagnosi definitiva, alla prognosi ed alla volontà del proprietario questi soggetti sono stati sottoposti a trattamento o ad eutanasia (TAB.2.A.)

TAB. 2.A. Cani con localizzazione neurologica T3-L3: diagnosi e trattamento

Caso n.	Diagnosi	Trattamento
1	Estrusione discale T12-13	Emilaminectomia T12-T13 e fenestrazione
2	Estrusione discale T11-T12	Emilaminectomia T11-T12 e fenestrazione
3	Estrusione discale T13-L1	Emilaminectomia T13-L1 e fenestrazione
4	Estrusione discale T12-T13	Emilaminectomia T12-T13 e fenestrazione
5	Estrusione discale L1-L2	Emilaminectomia T13-L1-L2 e fenestrazione
6	Estrusione discale L1-L2	Emilaminectomia L1-L2 e fenestrazione
7	Estrusione discale T13-L1	Emilaminectomia T13-L1 e fenestrazione
8	Estrusione discale T12-T13	Emilaminectomia T12-T13, T13-L1 e fenestr.
9	Estrusione discale T12-T13	Emilaminectomia T12-T13 e fenestrazione
10	Estrusione discale T11-T12	Emilaminectomia T11-T12 e fenestrazione
11	Estrusione discale T13-L1	Emilaminectomia T13-L1 e fenestrazione
12	Protrusione discale L2-L3	Emilaminectomia L2-L3
13	Protrusione discale L1-L2	Emilaminectomia L1-L2
14	Protrusione discale L1-L2	*
15	Lussazione T10-T11	*
16	Sublussazione T12-T13	Riduzione e stabilizzazione della sublux.*
17	Frattura corpo vertebr. T12	*
18	Sublussazione T13-L1	Conservativo
19	NST L2	*

Legenda: NST= Nerve Sheath Tumor, neoplasia della guaina nervosa. * Eutanasia

Caso 14: a causa della gravità e della cronicità della compressione midollare la prognosi variava dal riservato all'infuato ed il proprietario ha optato per l'eutanasia.

Caso 15: il cane è stato sottoposto ad eutanasia in quanto la lesione del midollo spinale risultava irreversibile per gravità e cronicità. Inoltre il cane presentava gravi contratture muscolo-tendinee ed articolari conseguenti all'immobilità prolungata.

Caso 16: dopo l'intervento chirurgico il cane non ha mai recuperato la sensibilità profonda, ma ha iniziato a sviluppare andatura spinale e vescica riflessa. Purtroppo, a causa delle notevoli cure di cui il cane aveva bisogno, il proprietario ne ha richiesto l'eutanasia 4 mesi dopo l'intervento.

Caso 17: l'età avanzata associata alla gravità e alla cronicità della lesione midollare secondaria a frattura vertebrale patologica da sospetta neoplasia hanno indotto il proprietario a richiedere l'eutanasia.

Caso 19: data la gravità e la cronicità del deficit neurologico e delle relative complicanze (cistite emorragica, grave epatopatia da steroidi, probabile setticemia) il proprietario ha optato per l'eutanasia. La diagnosi definitiva di NST è stata ottenuta mediante esame necroscopico che, inoltre, ha confermato la gravità delle lesioni secondarie epatiche, renali e vescicali.

Nel gruppo dei cani con localizzazione neurologica L4-S3 (casi 20-27) è stata fatta diagnosi di: frattura e/o sublussazione vertebrale in 4 meticci (casi 20, 21, 23, 24) e in 1 Segugio (caso 22) e di neoplasia vertebrale primaria (esame istopatologico) in 1 Dalmata (caso 25). Il Barbone (caso 26), pur essendo affetto da meningomielite (esito esame LCR), manifestava una sintomatologia neurologica localizzabile prevalentemente a livello L4-S3 e pertanto è stato inserito in questo gruppo. Il Boxer (caso 27) presentava anch'esso un deficit neurologico localizzabile a livello L4-S3, ma in questo soggetto non è stato possibile raggiungere una diagnosi definitiva in quanto il proprietario non ha autorizzato la mielografia. Le radiografie dirette del rachide e del torace e l'esame del LCR erano nella norma. Le diagnosi differenziali più probabili erano rappresentate da neoplasia spinale primaria o secondaria e paratopia discale.

Anche in questo gruppo, eventuali ulteriori accertamenti ed il trattamento sono stati effettuati in base alla prognosi ed alle disposizioni del proprietario (TAB.2.B.).

TAB.2.B. Cani con localizzazione neurologica L4-S3: diagnosi e trattamento

Caso n.	Diagnosi	Trattamento
20	Frattura corpo vertebrale L7	Laminectomia L7
21	Frattura e sublussazione L7	Riduzione e stabilizzazione della frattura
22	Frattura e sublussazione L7	Riduzione e stabilizzazione della frattura
23	Sublussazione L4-5 e frattura corpo vert. L4	*
24	Sublussazione L3-4 e frattura corpo vert. L4	*
25	Neoplasia vertebrale primaria L5	*
26	Meningomielite	Conservativo *
27	Non nota	Conservativo *

Legenda: *= Eutanasia

Casi 23 e 24: la prognosi infausta conseguente alla gravità e alla cronicità della lesione spinale ha indotto i proprietari a scegliere l'eutanasia. La necropsia ha evidenziato un'estesa emorragia dell'intumescenza lombo-sacrale.

Caso 25: il proprietario ha richiesto l'eutanasia a causa del progressivo peggioramento del deficit neurologico e del forte sospetto diagnostico di neoplasia vertebrale primaria, confermato poi mediante esame istologico.

Caso 26: a fronte di un ottimo recupero dell'attività motoria volontaria dopo 1 settimana di terapia medica, la persistenza di incontinenza urinaria ha indotto la proprietaria a richiedere l'eutanasia per incapacità di gestione del deficit della minzione.

Caso 27: la scarsa disponibilità economica del proprietario ha impedito l'esecuzione di più approfonditi accertamenti diagnostici. Il problema spinale è stato gestito mediante terapia medica con antibiotici ed antinfiammatori per 2 settimane. Il progressivo peggioramento del quadro clinico (perdita della sensibilità profonda) ha spinto il proprietario a richiedere l'eutanasia.

Nel gruppo dei gatti, il paziente con mielopatia trasversa T3-L3 (caso 34) aveva subito un grave trauma spinale (probabile concussione/contusione) 6 mesi prima. Le radiografie dirette non evidenziavano lussazioni o fratture vertebrali. Nei soggetti che localizzavano a livello lombo-sacrale e/o sacro-coccigeo (TAB.2.C. casi 28-33) è stata fatta diagnosi di: frattura del sacro in 3 gatti (casi 29, 30, 31); di lussazione sacro-coccigea nel caso 28, di frattura-sublussazione L7-S1 nel caso 32 e di lussazione delle vertebre L4- L5 nel caso 33.

TAB.2.C. Gatti con localizzazione neurologica L7-S3: diagnosi e trattamento

Caso n.	Diagnosi	Trattamento
28	Lussazione sacro-coccigea	Amputazione coda
29	Frattura sacro	Conservativo
30	Frattura fisi caudale S3	Amputazione coda
31	Frattura inveterata sacro	Conservativo
32	Frattura-sublussazione L7-S1	Conservativo
33	Lussazione inveterata L4-L5	Conservativo

Nel nostro studio particolare attenzione è stata rivolta all'esame batteriologico delle urine, effettuato almeno una volta in ciascun soggetto e ripetuto come monitoraggio della terapia o in caso di recidiva.

Nella maggior parte dei pazienti l'urina è stata prelevata mediante cistocentesi, metodica che, se eseguita nel rispetto delle condizioni di asepsi, minimizza il rischio di contaminazione del campione.^{8, 17} Soltanto nei casi in cui la cistocentesi risultava rischiosa per l'animale si è fatto ricorso al prelievo d'urina mediante cateterismo. I campioni di urina sono stati recapitati al laboratorio immediatamente dopo il prelievo ed esaminati entro un'ora.

Indagini microbiologiche

A. Esame colturale

Ciascun campione di urina è stato sottoposto ad esame a fresco al microscopio a contrasto di fase (100x) con la finalità di valutare approssimativamente la carica batterica. Ciò allo scopo di meglio interpretare eventuali reperti negativi all'esame

colturale dovuti all'azione inibente da parte di residui di antibiotici utilizzati nella terapia dell'animale.

Successivamente, i campioni sono stati diluiti da 10^{-1} a 10^{-6} in soluzione fisiologica; ciascuna diluizione è stata seminata per spatolamento su piastre di agar TSA (Oxoid) e McConkey (Oxoid). Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore e quindi si è proceduto al conteggio delle Unità Formanti Colonia (UFC).

L'identificazione di specie dei ceppi, previo ottenimento in coltura pura, è stata eseguita valutando dapprima l'affinità tintoriale alla colorazione di Gram e la produzione di ossidasi e catalasi. Per i Gram positivi riportabili al genere *Streptococcus* l'identificazione di specie è avvenuta attraverso il sistema API20 Strep (Bio-Mérieux), mentre nel caso dei Gram negativi si è fatto ricorso al sistema API20 E (Bio-Mérieux).

Il saggio di sensibilità agli antibiotici è stato effettuato con la tecnica della diffusione in agar con la metodica classica. Sono stati saggati i seguenti antibiotici: Amoxicillina (AML), Ampicillina (AMP), Carbenicillina (CAR), Penicillina (P), Acido Clavulanico e Amoxicillina (AMC), Cefazolina (KZ), Cefotaxime (CTX), Tetraciclina (TE), Amikacina (AK), Gentamicina (CN), Kanamicina (K), Neomicina (N), Streptomicina (S), Bacitracina (B), Claritromicina (CLR), Lincomicina (MY), Polimixina B (PB), Sulfametoxazolo (RL), Trimethoprim (W), Ciprofloxacina (CIP), Acido Nalidixico (NA), Eritromicina (E), Cloramfenicolo (C), Metronidazolo (MTZ). I ceppi sono stati classificati come resistenti (R), sensibili (S) o intermedi (I) secondo quanto descritto in letteratura.¹

B. Valutazione dell'attività inibente.

Ciascun campione d'urina è stato sottoposto alla ricerca di residui di antibiotici mediante il sistema PAR-test (Diesse), basato sulla particolare sensibilità di spore di *Bacillus subtilis* ad un'ampia gamma di principi attivi.

RISULTATI

Dei 34 pazienti inclusi nello studio, 19 (15 cani e 4 gatti) sono risultati negativi alla prima urocoltura (casi 2-9, 12, 13, 21-24, 26, 29-31, 33), mentre per i restanti 15 (12 cani e 3 gatti) l'esame batteriologico delle urine ha consentito l'isolamento di agenti appartenenti a specie diverse (Tab.3.).

Al gruppo dei soggetti negativi alla prima urocoltura apparteneva un Pastore Tedesco (caso 13) affetto da protrusione discale cronica a livello L1-L2. Prima dell'intervento chirurgico il paziente manifestava una grave paraparesi a mala pena deambulatoria, conservava il controllo volontario della minzione e l'urocoltura era negativa. Nel post operatorio si è verificato un peggioramento transitorio del deficit neurologico, probabilmente dovuto al danno da riperfusione del midollo spinale e sono subentrati paraplegia e vescica da MNS. Quest'ultima è stata diagnosticata alla visita di controllo presso la nostra struttura 10 giorni dopo l'intervento. Durante questo lasso di tempo, i proprietari non si erano accorti che l'animale non era in grado di svuotare completamente la vescica e pertanto il volume di urina residuo era molto elevato. L'urocoltura effettuata è risultata positiva, con isolamento di *Enterococcus faecium*. Al test di sensibilità agli antibiotici, il ceppo in questione risultava sensibile

a Bacitracina (B), Cloramfenicolo (C), Trimethoprim e Sulfametoxazolo (SXT), Trimethoprim (W), Amoxicillina e Acido clavulanico (AMC), Gentamicina (CN) e Claritromicina (CLR). La terapia antibiotica mirata è stata effettuata mediante l'associazione Amoxicillina ed Acido Clavulanico somministrati per via orale alla dose di 12,5 mg/kg BID per 15 giorni. La vescica è stata gestita mediante svuotamento manuale (e, solo nelle fasi iniziali, cateterismo sterile intermittente) ogni 8 ore, con manualità sempre eseguite da personale medico specializzato. La rivalutazione del paziente 1 mese dopo l'intervento chirurgico ha evidenziato un ottimo recupero dell'attività motoria degli arti pelvici e della minzione volontaria con completa guarigione da UTI. La coordinazione degli arti posteriori è ulteriormente migliorata nei mesi successivi con un recupero quasi completo, la minzione si è sempre svolta normalmente ed il cane non ha più avuto problemi di UTI con un follow-up di 21 mesi.

Nei restanti 18 pazienti negativi alla prima urocoltura, ad eccezione del caso 33, il periodo intercorso tra l'insorgenza del deficit neurologico della minzione e l'analisi batteriologica delle urine variava da 1 a 15 giorni, con una mediana di 3 giorni. Durante il suddetto periodo, tutti i soggetti sono stati sottoposti ad una corretta gestione della vescica mediante svuotamento manuale ogni 8 ore. Soltanto i casi 3 e 22 sono stati cateterizzati sterilmente (rispettivamente 2 volte e 1 volta) prima del nostro campionamento.

Nel gruppo dei pazienti positivi alla prima urocoltura il periodo intercorso tra l'insorgenza del deficit neurologico della minzione e l'analisi batteriologica delle urine variava da 2 giorni a 14 anni, con una mediana di 15 giorni. Le specie batteriche isolate in questo gruppo di soggetti sono indicate nella Tabella 3, in cui vengono elencati anche gli antibiotici risultati attivi, il tipo di deficit neurologico (vescica da MNS o da MNI) e il regime di gestione della vescica nel periodo pre-diagnosi (ossia, nel periodo intercorso tra l'insorgenza del deficit neurologico della minzione e la nostra prima visita).

I casi 14, 15, 17, 19, e 25, a causa della gravità della patologia spinale, sono stati sottoposti ad eutanasia il giorno stesso del campionamento. Nei restanti casi sono stati attuati protocolli di terapia antibiotica mirata sulla base dei risultati del test di sensibilità e in base a considerazioni riguardanti la farmacocinetica e la via di escrezione del principio attivo. In tutti questi pazienti (tranne il caso 27, soppresso dopo 2 settimane di terapia), il trattamento antibiotico è stato effettuato per un periodo di 3 settimane e spesso è stato seguito da un'urocoltura di controllo a distanza di almeno 7 giorni dall'ultima somministrazione del farmaco. L'esame batteriologico di controllo ha consentito di rilevare la completa guarigione in tutti i casi trattati tranne 4 (casi 10, 11, 32, 34) in cui sono state riscontrate persistenza e/o recidive di infezioni delle vie urinarie, talvolta con intervento di agenti (*Proteus*, *Pseudomonas*) di difficile eradicazione ed antibiotico-resistenti (TAB.4.). In questi 4 casi il deficit neurologico della minzione era grave, spesso associato ad incontinenza fecale (casi 11 e 32) e la gestione della vescica non è stata sempre ottimale (casi 11, 32 e 34) a causa della durata del problema e delle difficoltà operative dei proprietari. Il caso 10 inoltre, prima di essere riferito al Dipartimento di Salute Animale della nostra Università, era stato trattato a lungo con farmaci corticosteroidi a dosi immunosoppressive.

TAB.3.

Caso n.	Specie isolata	Deficit neurologico/ gestione vescica pre-diagnosi	Antibiotici attivi
1	<i>Escherichia coli</i>	MNS/ mai svuotata da 21 giorni	CTX W SXT PB CN
10	<i>Escherichia coli</i>	MNS/ cateterismi intermittenti da 15 giorni	C PB CTX W TE CIP AMC NA CN SXT
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MNS/ mai svuotata da 2 giorni	CN PB CIP N CTX
14	<i>Escherichia coli</i>	MNS/ mai svuotata da 4 giorni	W NA K CTX C CIP S AMC N SXT
15	<i>Escherichia coli</i>	MNS (vescica riflessa) / mai svuotata da 35 gg	CTX C CN K PB CIP AMC W KZ NA SXT
16	<i>Serratia odorifera</i>	MNS/ svuotamento manuale ogni 8 ore da 1 mese*	PB N K
17	<i>Enterococcus faecalis</i>	MNS/ mai svuotata da 4 giorni	CIP N CTZ E CLR C SXT K AMC B AMP PB TE KZ NA S
18	<i>Escherichia coli</i>	MNS/ cateterismi intermittenti da 21 giorni	NA PB SXT C AMC N S CTX CLR K RL W CIP CN TE
19	<i>Proteus mirabilis</i>	MNS/ mai svuotata da 7 giorni	AMP KZ S N CTX AK K CAR C CN
20	<i>Escherichia coli</i>	MNI/ svuotamento manuale ogni 12 ore da 14 anni	CN NA SXT N CIP C KZ PB CTX W RL
25	<i>Proteus mirabilis</i>	MNI/ mai svuotata da circa 15 giorni	AMP AK S N KZ CTX K CAR C CN
27	<i>Escherichia coli</i>	MNI/ mai svuotata da 15 giorni	CN TE SXT N AMC S RL
28	<i>Enterobacter gergoviae</i>	MNI/ svuotamento manuale ogni 8 ore da 2 anni	W RL SXT K C NA AMC S CIP N CLR TE CN CTX
32	<i>Pasteurella pneumoniae</i>	MNI/ mai svuotata da almeno 3 settimane	CTX E PB N K
34	<i>Enterococcus faecalis</i>	MNS da 6 mesi (vescica riflessa)/ mai svuotata	AMP C CIP P AML CN AMC W

* nei primi 15 giorni la vescica è stata svuotata da medici veterinari, successivamente, se ne sono occupati i proprietari, non senza difficoltà.

TAB.4. Recidive

Caso n.	Isolamenti/gg dal I campionamento
10	<i>Escherichia coli</i> (giorno 0) <i>Pseudomonas aerug.</i> (15 gg; 30 gg; 60 gg; 3 m; 8 m)
11	<i>Pseudomonas aerug.</i> (giorno 0) <i>Enterococcus faecium</i> (1 m) <i>Enterococcus faecium</i> + <i>Pseudomonas aerug.</i> (1,5 m) <i>Enterococcus faecium</i> (2 m e 23 gg) <i>Pseudomonas aerug.</i> (3,5 m) <i>Enterococcus faecalis</i> (4,5 m; 5 m e 7 gg)
32	<i>Pasteurella pneumoniae</i> (giorno 0) <i>Enterococcus faecalis</i> (10 m) <i>Proteus mirabilis</i> (13 m) <i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecium</i> (15 m) <i>Enterococcus faecium</i> (20 m)
34	<i>Enterococcus faecalis</i> (giorno 0) <i>Serratia odorifera</i> (13 gg) <i>Enterococcus faecalis</i> (4 m e 9 gg)

Legenda: gg = giorni
m= mesi

In questi 4 soggetti con persistenza/ recidive di infezione delle vie urinarie la terapia è sempre stata attuata sulla base dei risultati del test di sensibilità, alle dosi ottimali di ciascun principio attivo per la specie in questione (cane/gatto), per una durata di 2-3 settimane.

Dei 15 cani che, alla prima visita clinica, presentavano paraplegia, vescica da MNS e ritenzione urinaria, 8 risultavano positivi all'urocoltura. In particolare la cistite era presente nei soggetti con sintomatologia neurologica più grave e insorta da più tempo: 2-35 giorni (mediana: 5.5), contro un range di 1-4 giorni (mediana: 2) nei pazienti risultati negativi all'urocoltura. Nei casi 10, 11, 14, 15, 17 e 18 la gestione della vescica non era stata ottimale.

Nei 3 cani paraplegici con vescica da MNI (casi 23, 24 e 27) solo il caso 27 risultava positivo all'urocoltura. Dei 2 negativi, tuttavia, il 24 era stato trattato di recente con antibiotici prima dell'urocoltura ed il PAR TEST risultava positivo. In questo caso abbiamo ritenuto giustificato avanzare ugualmente il sospetto di cistite poiché l'esame microscopico a fresco dell'urina dimostrava la presenza di cellule batteriche.

Fra i cani che presentavano paraparesi non deambulatoria alla prima visita clinica, il caso 2 mostrava deficit parziale della minzione con vescica da MNS da 2 giorni. La vescica era stata svuotata manualmente ogni 8 ore e l'urocoltura non aveva evidenziato alcuna crescita batterica. I casi 22 e 26 avevano una vescica da MNI da 2 giorni, mentre il caso 21 da 4 giorni. In questi 3 soggetti la vescica è sempre stata gestita correttamente (svuotamento manuale ogni 6-8 ore) e l'esame batteriologico delle urine risultava negativo.

Nel gruppo di cani con paraparesi deambulatoria e localizzazione T3-L3, soltanto il caso 1 è risultato positivo alla prima urocoltura. Questo soggetto era divenuto

paraplegico 21 giorni prima ed era stato trattato in modo conservativo con corticosteroidi e riposo con un recupero lento, parziale ed incompleto. Al momento della nostra prima visita il cane era in grado di deambulare anche se con grande difficoltà e il controllo della minzione non era ottimale. Inoltre, nei precedenti 21 giorni, chi gestiva l'animale non aveva mai provveduto a favorire il completo svuotamento della vescica. Dopo l'intervento chirurgico la vescica è stata svuotata manualmente ogni 6-8 ore e sono stati somministrati Alfuzosina e Diazepam al fine di ridurre l'ipertono degli sfinteri uretrali interno ed esterno, rispettivamente. Inoltre è stata attuata una terapia antibiotica mirata in base all'esito dell'antibiogramma. La decompressione del midollo spinale ha determinato un rapido recupero neurologico e già due giorni dopo l'intervento il cane era in grado di urinare volontariamente. Grazie a tutti questi fattori l'UTI si è risolta tempestivamente senza recidive in un follow up di 1 anno.

Entrambi i cani con paraparesi deambulatoria e localizzazione neurologica L4-S3 presentavano UTI (casi 20 e 25). Il caso 20 era stato sottoposto a laminectomia di L7 e S1 14 anni prima a causa della frattura di L7. Dopo l'intervento si era verificato un buon recupero dell'attività motoria volontaria degli arti posteriori, ma permaneva incontinenza urinaria (vescica da MNI). Quest'ultima veniva gestita dal proprietario mediante svuotamento manuale ogni 12 ore. Non erano mai stati effettuati esami batteriologici delle urine. Il caso è stato sottoposto alla nostra attenzione in quanto aveva sviluppato una grave forma di sindrome vestibolare periferica idiopatica geriatrica. In tale occasione, sulla base dell'esame clinico è stato avanzato un forte sospetto di UTI, confermato poi dall'urocoltura. Si è impostata una terapia antibiotica mirata per 3 settimane accompagnata da svuotamenti manuali della vescica ogni 8 ore e maggior pulizia ed igiene del perineo. Le urocolture effettuate dopo 25 e 75 giorni dalla fine della terapia antibiotica sono risultate negative. Il caso 25 presentava una evidente sintomatologia neurologica da 15 giorni e durante questo periodo la gestione della vescica era stata nulla.

Dei 7 gatti inclusi nel nostro studio, 6 (casi 28-33) mostravano deficit neurologico della minzione da MNI e 1 (caso 34) vescica da MNS. Quest'ultimo era paraplegico senza sensibilità profonda negli arti posteriori e nella coda, ed aveva sviluppato vescica riflessa e movimenti riflessi degli arti posteriori. Prima di essere visitato presso la Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria, il gatto viveva in condizioni igieniche precarie e nessuno aveva mai svuotato la vescica. L'animale risultava positivo all'urocoltura con isolamento di *Enterococcus faecalis*. Nel caso 28 la sintomatologia era insorta 2 anni prima in seguito ad un trauma. Lo svuotamento manuale della vescica veniva effettuato dalla proprietaria regolarmente ogni 6-8 ore. L'episodio di cistite da noi diagnosticato si era verificato subito dopo un caso di grave megacolon trattato mediante numerosi enteroclistmi con frequente imbrattamento del perineo e dei genitali esterni. La terapia antibiotica mirata ha consentito di negativizzare le successive urocolture eseguite a distanza di 2 e 12 mesi dalla fine della terapia. Il caso 32 era stato trovato 4 giorni prima in condizioni igieniche pessime e non si conosceva con esattezza a quando risalisse la lesione neurologica. Dall'aspetto radiografico della frattura-sublussazione lombosacrale è stato stimato che la lesione fosse presente da almeno 21 giorni. Il caso 33, pur avendo subito un grave trauma spinale 60 giorni prima, non presentava UTI al momento del nostro esame. Questo dato, comunque era

falsato dal fatto che, nei giorni antecedenti la nostra visita, probabilmente erano stati somministrati degli antibiotici. Inoltre il gatto era in grado di svuotare in buona parte la vescica grazie a meccanismi riflessi instauratisi dopo la lesione spinale. I casi 29, 30 e 31 erano negativi all'urocoltura e la disfunzione della minzione era insorta rispettivamente da 5, 3 e 15 giorni.

DISCUSSIONE

Il 44% dei soggetti inclusi nel nostro studio ha presentato UTI al primo campionamento. Se si considera anche il caso numero 13, che ha sviluppato UTI a causa di un peggioramento neurologico nell'immediato post-operatorio, tale percentuale sale al 47%. Possiamo quindi concludere che, nella nostra casistica, le UTI si sono verificate in circa la metà dei soggetti affetti da lesioni del midollo spinale o della cauda equina tanto gravi da determinare un deficit neurologico della minzione, purtroppo percentuali analoghe sono state riportate anche in medicina umana.^{3, 36} Comunque nel nostro studio, tale dato, senz'altro preoccupante, deve essere interpretato in base alla durata del tempo intercorso tra l'insorgenza della disfunzione neurologica della minzione e il campionamento di urina da noi effettuato e le modalità di gestione della vescica durante tale periodo. Infatti la mediana della durata del deficit della minzione pre-campionamento era di 15 giorni nei soggetti con urocoltura positiva, contro una mediana di 3 giorni nei soggetti negativi. Inoltre, ad eccezione del caso 28, la vescica veniva svuotata in modo scorretto, incostante, o non veniva svuotata affatto per periodi anche molto lunghi. La permanenza di significative quantità di urina residua in vescica facilitava la colonizzazione e moltiplicazione batterica. Inoltre è stato osservato che i soggetti in cui la disfunzione neurologica della minzione era associata ad incontinenza fecale erano maggiormente predisposti a sviluppare UTI. Infatti, l'imbrattamento del perineo e dei genitali esterni con materiale fecale favorisce la penetrazione dei batteri nell'uretra e la risalita verso la vescica.² Questo fenomeno, probabilmente, ha giocato un ruolo rilevante non solo nello sviluppo di UTI (caso 28), ma anche nella persistenza o nella recidiva di UTI nei casi 11 e 32. In base a questi dati riteniamo che, per ridurre il rischio di infezioni delle vie urinarie, non solo sia necessario svuotare regolarmente la vescica ogni 6-8 ore, ma sia molto importante curare le condizioni igieniche dell'animale con particolare riguardo alla pulizia di perineo, coda e genitali esterni.

Per quel che riguarda il ruolo del cateterismo nello sviluppo di UTI non possiamo trarre conclusioni definitive dal nostro studio in quanto, dei soggetti positivi alla prima urocoltura, solo due (casi 10 e 18) erano stati cateterizzati in modo incostante ed intermittente per 15 e 21 giorni, rispettivamente. Dei pazienti negativi alla prima urocoltura solo 2 (casi 3 e 22) erano stati cateterizzati 2 e 1 volta ciascuno. Senz'altro ripetuti cateterismi sono fonte di irritazione o addirittura di traumatismo per la mucosa uretrale, inoltre nei soggetti di sesso femminile ed in generale nei gatti, è molto difficile eseguire un cateterismo realmente sterile senza sedare o addirittura anestetizzare l'animale. Uno studio condotto in medicina veterinaria sulla correlazione tra infezioni urinarie e l'uso corretto o scorretto dei cateteri sottolinea che lo sviluppo di infezioni delle vie urinarie iatrogene è influenzato da molte variabili tra cui il metodo, il tipo e la durata del cateterismo, le modalità di raccolta dell'urina (sistema di raccolta aperto

o chiuso), lo stato immunitario del paziente e il concomitante impiego di antibiotici.²¹ Inoltre lo stesso lavoro evidenzia che l'impiego del cateterismo sterile intermittente di norma riduce significativamente il rischio di sviluppare UTI rispetto all'utilizzo di cateteri permanenti. Questi ultimi vanno riservati solamente a casi particolari e devono essere collegati ad un sistema di raccolta chiuso. Secondo gli stessi autori, il rischio di introdurre agenti patogeni nelle vie urinarie cresce esponenzialmente all'aumentare del numero di cateterismi effettuati. Pertanto l'impiego di cateteri, rigorosamente sterili, va riservato ai pazienti in cui lo svuotamento manuale della vescica risulta difficile o rischioso per il paziente.²¹ In medicina umana è stato rilevato che nel caso del cateterismo permanente un ulteriore problema è costituito dalla formazione di un vero e proprio biofilm batterico che, in molti casi, si sviluppa nel lume e lungo le pareti esterne del catetere in 8-24 ore, consentendo la colonizzazione della mucosa vescicale.³⁵ In base alla nostra esperienza e, soprattutto, ai dati riportati in letteratura, per minimizzare il rischio di UTI iatrogene è bene cercare di svuotare manualmente la vescica (ogni 6-8 ore) dopo aver ridotto farmacologicamente un eventuale spasmo degli sfinteri uretrali interno ed esterno. Senz'altro le manualità di compressione vescicale devono essere eseguite con delicatezza e con cura evitando di traumatizzare la parete della vescica. Soltanto quando la compressione manuale non è sufficiente a garantire un adeguato svuotamento si può ricorrere al cateterismo che deve essere rigorosamente sterile. Inoltre è importante utilizzare cateteri urinari di silicone e del diametro più piccolo possibile.

Per quel che riguarda la risoluzione dell'UTI, sulla base dei nostri dati possiamo affermare che un ruolo importante è svolto dalla corretta gestione della vescica, dalla terapia antibiotica mirata in base all'esito dell'esame batteriologico delle urine e dal tempestivo recupero del controllo volontario della minzione. Quest'ultimo, ovviamente, può esservi solo quando la lesione del tessuto nervoso è reversibile. Spesso la reversibilità di una lesione secondaria a trauma spinale dipende dalla tempestività con cui viene attuato il trattamento che generalmente è chirurgico ed altamente specialistico. Comunque, nella nostra casistica, in 4 dei 6 soggetti con deficit neurologico della minzione irreversibile e UTI alla prima visita, è stato possibile risolvere completamente l'infezione delle vie urinarie grazie ad una migliore gestione della vescica ed alla terapia antibiotica mirata. A nostro giudizio, nei soggetti con disfunzione neurologica della minzione permanente è importante effettuare periodicamente un'urocoltura per diagnosticare tempestivamente e trattare in modo mirato eventuali recidive.

In 4 animali (casi 10, 11, 32, 34) sono state osservate persistenza e/o recidive di UTI. In questi soggetti il deficit neurologico della minzione era grave, spesso associato ad incontinenza fecale (casi 11 e 32) e la gestione della vescica non è stata sempre ottimale (casi 11, 32 e 34) a causa della durata del problema e delle difficoltà operative dei proprietari. Nel caso 10 le recidive erano attribuibili allo sviluppo di antibiotico-resistenze da parte di *Pseudomonas aeruginosa* e ad uno stato di immunosoppressione conseguente a terapia corticosteroidica protratta. In questo paziente sono state effettuate periodiche urocolture e conseguenti antibiogrammi mediante i quali si è potuto individuare l'antibiotico più efficace e in base a questi dati è stata impostata ogni volta la terapia. Comunque, la completa risoluzione del problema UTI è avvenuta solo dopo che il cane ha recuperato completamente il controllo

volontario della minzione (8 mesi dall'intervento) come testimoniato dalla negatività delle urocolture effettuate dal veterinario referente. Il caso 11 a causa della lesione spinale, oltre ai disturbi della minzione, presentava anche incontinenza fecale. Di conseguenza, per poter tenere il cane in casa, i proprietari ricorrevano all'impiego di pannolini, che spesso non potevano essere cambiati prima di 6 o più ore a causa degli impegni lavorativi di chi accudiva il cane. Le feci imbrattavano persistentemente il perineo ed i genitali esterni favorendo la risalita di batteri nelle vie urinarie. Questo inconveniente, in associazione al deficit neurologico della minzione, probabilmente spiega la persistenza di UTI in questo soggetto per oltre 5 mesi nonostante che la vescica venisse svuotata ogni 8 ore, il cane fosse lavato quotidianamente e la terapia fosse sempre mirata sulla base dell'antibiogramma. Inoltre, in questo soggetto, per poter debellare l'UTI abbiamo cercato di modificare il pH urinario acidificando le urine. Dopo 5 mesi dall'intervento chirurgico si è verificato un parziale recupero del controllo volontario della minzione e dopo 8 mesi l'urocoltura è risultata per la prima volta negativa.

Nei due gatti con recidive di UTI (casi 32 e 34) le cause della mancata guarigione, a fronte di una terapia antibiotica mirata, sono verosimilmente multifattoriali. In entrambi i soggetti il proprietario non riusciva a svuotare in maniera corretta e costante la vescica e le condizioni igieniche in cui vivevano non erano ottimali. Inoltre, nel caso 32 al deficit della minzione si associavano incontinenza fecale e urolitiasi.

Possiamo quindi concludere che i principali fattori di rischio per lo sviluppo di UTI hanno un ruolo rilevante anche nell'insorgenza di infezioni persistenti o ricorrenti.

Per quel che riguarda il pattern di specie batteriche isolate complessivamente, ovvero sia considerando anche le recidive, è stata evidenziata una prevalenza di *Enterococcus* del 37,5 % (12), di *Escherichia coli* del 25% (8), di *Pseudomonas aeruginosa* del 25 % (8) e di *Proteus mirabilis* del 6,25% (2). Questi risultati sono analoghi a quanto riportato in medicina umana. Infatti, nei pazienti con lesioni del midollo spinale affetti da UTI le forme batteriche più frequentemente isolate sono rappresentate da *Escherichia coli* nel 26 % dei casi, *Enterococcus* nel 26 %, e *Pseudomonas* spp. nel 20 %.^{24,35} Anche un altro studio afferma che gli uropatogeni più frequentemente responsabili di UTI in persone con SCI sono rappresentati da Enterococchi, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*.³³

L'isolamento della specie batterica responsabile di UTI è di fondamentale importanza per effettuare un antibiogramma e per impostare una terapia antibiotica mirata. Il trattamento delle infezioni delle vie urinarie negli animali d'affezione, così come avviene per l'uomo, dovrebbe essere effettuato ricorrendo ad antibiotici specifici, a ristretto spettro antimicrobico. In relazione all'efficacia clinica, il dosaggio ed il tempo di somministrazione dell'antibiotico devono essere ottimali onde evitare lo sviluppo di specie batteriche resistenti o di facilitare un eventuale trasferimento di geni portatori di resistenza.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una stretta correlazione tra SCI e UTI nei cani e nei gatti. Si può concludere che una diagnosi precoce e una corretta gestione della vescica nel paziente neurologico con deficit della minzione sono di fondamentale importanza al fine di ridurre l'incidenza delle infezioni del tratto urinario e consentire

il percorso riabilitativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Barry AL., Thornsberry C. *Susceptibility Test: Diffusion Test Procedures*. In: Manual of clinical microbiology, Lennette. American Society for Microbiology, 1985, Cap. 102.
2. Bennet CJ., Young MN., Darrington H. *Differences in urinary tract infections in male and female spinal cord injury patients on intermittent catheterization*. Paraplegia. 1995; 33: 69-72.
3. Beraldo, PS., Neves EG., Alves CM., Khan P., Cirilo AC, Alencar MR. *Pyrexia in hospitalised spinal cord injury patients*. Paraplegia. 1993; 31: 186-191.
4. Bernardini M. *Minzione e suoi deficit*. In: Neurologia del cane e del gatto, Manuali Pratici di Veterinaria, 2002, 327-332.
5. Bortolami R., Callegari E., *Sistema nervoso autonomo*. In: Neurologia ed estesiologia degli animali domestici, Edizioni Agricole, 1999, 159-165.
6. Botzenhart K., Ruden H. *Hospital infection caused by Pseudomonas aeruginosa*. In: Dorin G., Holder IA., Botzenhart K. Basic research and clinical aspects of *Pseudomonas aeruginosa*, Basel, 1987, 1-15.
7. Brindani F., Paterlini F., Ossiprandi MC., Perini S., Ansuini A. *Caratterizzazione di stipiti di Pasteurella multocida isolati da suini con sindromi respiratorie*. Selezione Veterinaria 1995, 36: 567-577.
8. Carter JM., Klausinstraer JS., et al. *Comparison of collection techniques for quantitative urine culture in dogs*. J Am Vet Med Assoc. 1978; 173 (3): 296-298.
9. De Groat WC., Booth AM. *Physiology of the bladder and urethra*. Ann Intern Med. 1980; 92: 312-315.
10. De Risio L. *Alterazioni neurologiche della minzione nel cane e nel gatto*. Praxis Vet. 2002; 23: 15-19.
11. De Vivo MJ., Black EJ., Stover SL. *Causes of death during the first 12 years after spinal cord injury*. Arch Phys Med Rehabil. 1993; 74: 248-254.
12. Donovan WH., Hull R., Rossi CD. *Analysis of gram negative colonization of the neurophatic bladder among patients with spinal cord injuries*. Spinal Cord. 1996; 34: 587-591.
13. Elden H., Hizmetli S., Nactarhan V., Kunt B., Göker I. *Relapsing significant bacteriuria: effect on urinary tract infection in patients with spinal cord injury*. Arch Phys Med Rehabil. 1997; 78: 468-470.
14. Erickson RP., Merritt JL., Opitz JL., et al. *Bacteriuria during follow-up in patients with spinal cord injury*. Arch Phys Med Rehabil. 1982; 63: 409-412.
15. Esclarin de Ruz A., Garcia Leoni E., Herruzo Cabrera R. *Epidemiology and risk factors for urinary tract infection in patients with spinal cord injury*. J Urol. 2002; 164: 1285-1289.
16. Ettinger SJ., Feldman EC. *Incontinenza, enuresi, disuria e nicturia*. In: Gorge E., Trattato di clinica medica veterinaria, Antonio Delfino Editore, 2001, 89-92.
17. Hamaide AJ., Martinez SA., Walker RD., et al. *Prospective comparison of four sampling methods (cystocentesis, bladder mucosal swab, bladder mucosal biopsy,*

- and urolith culture) to identify urinary tract infections in dogs with urolithiasis. J Am Anim Hosp Assoc. 1998; 34: 423-430.*
18. *Hooton TM., O'Shaughnessy EJ., Clowers D., Mack L., Candenas DD., Stamm WE. Localization of urinary tract infection in patients with spinal cord injury. J Infect Dis. 1984; 150: 85-91.*
 19. *Hull RA., Rudy DC., Wieser IE. Virulence factors of E. coli isolated from patients with symptomatic and asymptomatic bacteriuria and neurophatic bladders due to spinal cord and brain injuries. J Clin Microbiol. 1998; 36 (1); 115-117.*
 20. *Lane IF. Diagnosis and management of urinary retention. Veterinary Clinics of North America: small animal practice. 2000; 30: 25-57.*
 21. *Lees GE, Osborne CA. Urinary tract infection associated with the use and misuse of urinary catheters. Veterinary Clinics of North America: small animal practice. 1979; 9: 713- 727.*
 22. *Low DA., Braaten BA., Ling GV., et al. Isolation and comparison of Escherichia coli strains from canine and human patients with urinary tract infections. American Society for Microbiology. 1988; 10: 2601-2609.*
 23. *Madigan MT., Martinko JM., Parker J. Brock. Biologia dei microrganismi, Ambrosiana, 2003.*
 24. *Montgomene JZ., Chan E., Gilmore DS., Canawati HN., Sapico FL. Low mortality among patients with spinal cord injury and bacteremia. Rev Infect Dis. 1991; 13: 867-871.*
 25. *Moreau PM. Neurogenic disorders of micturition in the dog and cat. Compend Cont Educ Pract Vet. 1982; 4: 12-22.*
 26. *Moorton SC., Shekelle PG., Adams JL., Bennet C., Dobkin BH., Montgomerie J., Vickrey BG. Antimicrobial prophylaxis for urinary tract infection in persons with spinal cord dysfunction. Arch Phys Med Rehabil. 2002; 83: 129-138.*
 27. *O' Brien DP. Disorders of the urogenital system. Semin Vet Med Surg. 1990; 5: 57-66.*
 28. *Olby N., Levine J., Harris T., Muñana K., Skeen T., Sharp N. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). JAVMA 2003; 222: 762-769.*
 29. *Oliver JE., Bradley WE., Fletcher TF. Spinal cord representation of the micturition reflex. J Comp Neurol. 1969; 137: 329-346.*
 30. *Orskov I., Penner JL. Enterobacteriaceae. In: Bergey's manual of systematic bacteriology (1), Williams and Wilkins, 1885, 461-465.*
 31. *Osborne CA., Finco DR. Disturbi della minzione. In: Nefrologia ed urologia del cane e del gatto, UTET, 1999, 721-745.*
 32. *Purinton PT., Oliver JE. Spinal cord origin of innervation to the bladder and uretra of the dog. Exp Neurol. 1979; 65: 422-434.*
 33. *Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. The American Journal of Medicine. 2002, 113: 14-19.*
 34. *Sharp NJH., Gookin J. Visceral and bladder dysfunction dysautonomia. In: Manual of small animal neurology, BSAVA, 1995, 179-182.*
 35. *Siroky MD., Mike B. Pathogenesis of bacteriuria and infection in the spinal cord injured patients. American Journal of Medicine. 2002; 113(1A): 67-79.*

36. *Waites KB., Canupp KC., De Vivo MJ. Epidemiology and risk factors for urinary tract infections following spinal cord injury. Arch Phys Med Rehabil. 1993; 74: 691-695.*
37. *Wheeler SJ., Sharp NJH. Postoperative care. In: Diagnosis and surgery in small animal spinal disorders, Mosby-Wolfe, 1994, 210-214.*
38. *Worlitzsch D., Wolz C., Botzenhart K. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa- urinary tract infections in paraplegic patients. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1989; 189 (2): 175-184.*

Si ringrazia la dott.ssa Cinzia Reverberi per l'assistenza tecnica.

Lavori del 2003 dott.ssa Ossiprandi.

1. OSSIPRANDI M.C., CATTABIANI F., BOTTARELLI E. (2003). Batteri enteropatogeni in carne macinata destinata all'alimentazione del cane. *Ig. Mod.*, **120**, 225-239.
2. DE RISIO L., OSSIPRANDI M.C., DE RAZZA P., VENZI C. (2003). Correlazioni tra lesioni del midollo spinale e infezioni delle vie urinarie. *Ann. Fac. Med. Vet.*, **Vol. XXIII**, in corso di stampa

Lavori del 2003 dott.ssa De Risio

1. *Journal of the American Veterinary Medical Association. 2003, 222, 10, 1359-1360. What is your diagnosis? Luisa De Risio, Giacomo Gnudi, Giorgio Bertoni*
2. *Atti della Società Italiana di Chirurgia Veterinaria (X incontro annuale), 19-21 Giugno 2003, p.61-65. "Trombosi dell'aorta e delle arterie iliache in un cane con amiloidosi renale". L. De Risio, C. Quintavalla, A. Palumbo, R. Di Lecce, S. Brianza*
3. *Atti della Società Italiana di Chirurgia Veterinaria (X incontro annuale), 19-21 Giugno 2003, p.410-415. "The use of isoelectric focusing (IEF) in the analysis of dog's CSF". L. De Risio, D. Callegari, E. Bianchi, I. Cogato*
4. *Atti IV Congresso Nazionale Società Italiana Terapia con Onde d'Urto, Bari, 19-21 Giugno 2003, pp 111-112. "Trattamento con onde d'urto delle patologie scheletriche degli animali d'affezione. M. Del Bue, L. De Risio, V. Santoro, D. Ferrari*
5. *Atti IV Congresso Nazionale Società Italiana Terapia con Onde d'Urto, Bari, 19-21 Giugno 2003, pp 47-50. "Effetti delle onde d'urto sulla cartilagine di accrescimento: studio sperimentale sul coniglio". M. Del Bue, S. Montagnani, L. De Risio, C. Castaldo, F. Leonardi, A. Palumbo Piccionello, M. Marmiroli, C. Bresciani*
6. *Journal of Feline Medicine and Surgery 2003, 5, 237-240. Tetanus in a cat-an unusual presentation. L De Risio, A Gelati*
7. *Bollettino AIVPA 2003, n3, 23-30. Trombosi dell'aorta discendente e delle arterie iliache in un cane con amiloidosi renale. L. De Risio, C. Venzi, C. Quintavalla, R. Di Lecce*

FARMACOVIGILANZA DI FARMACI VETERINARI DECRETO LEGISLATIVO 9 APRILE 2003, N. 71

Signorini G.¹, Biagi G.², Luchetti E.², Nannipieri S.³, Pandolfi C.⁴

Introduzione

La farmacovigilanza, inizialmente definita come la valutazione del rischio di effetti indesiderati potenzialmente associati al trattamento farmacologico, è intesa attualmente come il mezzo di controllo costante del farmaco, già registrato ed in commercio, durante il suo impiego nella pratica medica, sia in campo umano che veterinario. Gli scopi da perseguire sono di riconoscere il più rapidamente possibile la comparsa di eventuali effetti indesiderati non previsti o ADR (Adverse Desiderate Reactions); migliorare ed allargare le informazioni su ADR sospette o già note; valutare i vantaggi di un farmaco su altri o su altri tipi di terapia; accertare e di verificare gli effetti terapeutici osservati nella sperimentazione clinica, confermandoli e/o individuandone di nuovi; comunicare l'informazione in modo da migliorare la pratica terapeutica. Queste informazioni devono essere comunicate alle Autorità Sanitarie preposte alla regolamentazione dei farmaci, che devono assolvere ai seguenti obblighi: devono apportare le adeguate modifiche al foglietto illustrativo ed alle etichette mediante l'inserimento delle avvertenze che devono essere prese dal soggetto che li deve utilizzare; devono escludere dall'impiego pratico quei farmaci con ADR particolarmente gravi; devono approfondire e verificare su larga scala gli eventuali nuovi effetti terapeutici evidenziati per i farmaci già in commercio e, in caso di conferma, provvedere all'inserimento della nuova indicazione terapeutica. Ne consegue come la farmacovigilanza possa venir identificata anche come Fase IV della sperimentazione farmacologica, in quanto contempla tutte le attività mirate allo studio sistematico dei rischi e benefici derivanti dal corretto uso terapeutico dei farmaci impiegati nella pratica clinica. In conclusione, l'obiettivo della farmacovigilanza è quello di fornire un precoce segnale (o allarme), che in genere proviene dall'osservazione su un singolo paziente o, più raramente, su popolazioni, mettendo in evidenza il più precocemente possibile nuove ADR.

Tra farmacovigilanza umana e veterinaria non esiste alcuna differenza dal punto di vista procedurale (tutte le figure professionali coinvolte nella produzione, distribuzione ed utilizzazione dei farmaci hanno l'obbligo di segnalare alle Autorità Sanitarie la comparsa di ADR e/o di nuovi effetti terapeutici osservati durante l'impiego dei farmaci) anche se nella farmacovigilanza veterinaria esistono delle differenze riguardo al rilevamento delle ADR di un farmaco in funzione della specie animale e della

¹ Scuola di Specializzazione in "Diritto e Legislazione Veterinaria" – Università Studi Parma

² Dipartimento di Clinica veterinaria – Università Studi Pisa

³ Veterinario Dirigente – ASL 6 Zona di Livorno

⁴ Libero professionista - Ancona

diversa utilizzazione negli stessi animali (d'affezione o da reddito). Nel caso dell'impiego dei farmaci negli animali d'affezione (cani e gatti) e negli animali sportivi (cavalli) la situazione è simile a quella dell'uomo poiché il farmaco viene impiegato nel singolo animale dal proprietario o allevatore. Negli animali da reddito (bovini, ovicaprini, suini, pollame, ecc.), invece, la situazione è completamente diversa poiché il farmaco viene considerato uno strumento economico; anzi, spesso si assiste ad un impiego incontrollato e fraudolento di farmaci non consentiti evitando di ricorrere al Medico Veterinario. Pertanto, in zootecnia, la farmacovigilanza è da considerarsi di difficile applicazione in quanto non si può valutare con certezza se una ADR sia dovuta all'impiego corretto di un farmaco o a pratiche illecite condotte in maniera empirica.

Il farmaco veterinario

In Medicina Veterinaria ci risulta che fino ad oggi non siano stati denunciati casi eclatanti di ADR da farmaci impiegati negli animali, siano essi d'affezione che da reddito. I motivi possono essere i più vari e fra questi ricordiamo che il farmaco veterinario è stato definito come tale nel 1992 con l'art. 1 del Decreto Legislativo (D. L.gs) n. 119; che la terapia farmacologica veterinaria è sempre di durata piuttosto breve e non comporta quasi mai lunghi trattamenti, soprattutto negli animali da reddito; che in passato, anche quando sono stati riscontrati casi di reazioni avverse da farmaci, si è data loro poca importanza, cercando sempre di ridimensionare la potenziale gravità del problema.

Il D. L.gs n. 47/97, Attuazione delle direttive n. 93/40/CEE e n. 93/41/CEE in materia di medicinali veterinari, impone la farmacovigilanza anche in Medicina Veterinaria: all'art. 12 dispone che dopo l'art. 26 del D. L.gs n. 119/92 sia aggiunto il Capo V-bis: Farmacovigilanza che con l'art. 26-bis predispone che sia "istituito un sistema di farmacovigilanza allo scopo di raccogliere informazioni utili sugli effetti collaterali negativi dei medicinali veterinari e per valutare scientificamente tali informazioni, da collegare ai dati concernenti il consumo dei medicinali. Il sistema serve anche a raccogliere informazioni sull'uso improprio frequentemente osservato dei medicinali veterinari e sul grave abuso dei medesimi. Il sistema fa capo al Ministero della sanità - Dipartimento per alimenti e nutrizione e sanità pubblica veterinaria". Si può affermare quindi che l'individuazione delle ADR evocate da farmaci registrati ed impiegati nella terapia degli animali (da reddito e d'affezione) è da considerare di primaria importanza non solo per la salute degli stessi animali ma anche per l'uomo consumatore di derrate alimentari di origine animale.

Risulta facilmente comprensibile l'importanza di una costante e corretta farmacovigilanza veterinaria che riconosce fra i suoi compiti essenziali quello di controllare ogni medicinale contenente principi attivi o sostanze ad azione farmacologica (specialità medicinali, prodotti biologici, mangimi medicati, integratori, additivi) ed in genere ogni preparazione destinata agli animali contenente sostanze in grado di determinare modificazioni metaboliche a carico degli stessi; di vigilare sul rispetto dei livelli massimi di residui (LMR) stabiliti dalla normativa CEE per i residui degli xenobiotici negli alimenti di origine animale (O.A.).

L'attività di Farmacovigilanza Veterinaria è stata regolamentata da specifiche normative emanate sia dall'Unione Europea sia in ambito nazionale. Per la loro attua-

zione è stato prima istituito il Comitato per i Medicinali Veterinari, sostituito poi dall'Agencia Comunitaria del Farmaco Veterinario (EMEA), con sede a Londra, che ha permesso di individuare meglio gli scopi della Farmacovigilanza Veterinaria; di valutare cosa siano le "Serious Adverse Reactions" (SAR) stabilendo le modalità di segnalazione; di stabilire rapporti periodici sulla sicurezza dei farmaci; di definire le responsabilità delle Autorità Sanitarie preposte al controllo dei farmaci. Secondo l'EMEA gli scopi della Farmacovigilanza Veterinaria sono il controllo della sicurezza clinica dei farmaci negli animali; il controllo delle possibili reazioni negative per l'uomo che manipola i farmaci; la verifica dei residui dei farmaci (rispetto dei c.d. MRL stabiliti a livello CEE) negli alimenti di O.A. (latte, uova, carni e derivati), il controllo dell'assenza di effetti negativi sull'ambiente; la sorveglianza epidemiologica sulla comparsa di fenomeni di farmacoresistenza, causa di mancata efficacia terapeutica durante la terapia delle malattie infettive.

La farmacovigilanza non ha limiti temporali, il periodo di osservazione di un farmaco è pari alla sua commercializzazione ed interessa tutti i soggetti coinvolti nel suo impiego: proprietari e/o allevatori, veterinari, medici (per le reazioni negative sull'uomo), farmacisti ed industrie farmaceutiche.

L'uso dei farmaci veterinari ha permesso un effettivo miglioramento delle condizioni di salute degli animali ed ha favorito le produzioni zootecniche sia dal punto di vista qualitativo sia quantitativo. Comunque, è necessario vigilare sulle eventuali conseguenze negative che possono derivare dal loro impiego pratico, verificare costantemente le modalità di distribuzione dei farmaci per evitare che vengano utilizzati in modo improprio (per finalità completamente diverse da quelle previste come ad es. per i beta-agonisti e gli anabolizzanti) con pericolose conseguenze per la salute degli animali e dell'uomo. Ne consegue che l'utilizzazione pratica del farmaco negli animali deve avvenire esclusivamente sotto controllo del medico veterinario, che ha precise responsabilità nella tutela della salute degli animali e nella prevenzione dei rischi per l'uomo e l'ambiente.

Per garantire tale controllo, il D.L.gs n. 336/99 ha reso obbligatori i registri dei trattamenti farmacologici e dei trattamenti ormonali (questi ultimi soltanto per le specie e gli indirizzi produttivi consentiti), dove il medico veterinario deve riportare, e firmare, i trattamenti prescritti od effettuati sugli animali.

Il monitoraggio delle segnalazioni spontanee di sospette reazioni avverse a farmaci è la componente fondamentale dei sistemi integrati di farmacovigilanza. La metodologia si fonda sulla possibilità che un evento avverso possa essere riconosciuto come tale, che la sua insorgenza venga ricondotta all'assunzione di uno o più farmaci e che di esso venga data notizia ad una autorità regolatoria, al produttore del farmaco. Un elevato numero di segnalazioni di un evento avverso connesso all'assunzione di un determinato farmaco (variabile in considerazione della natura dell'evento, del farmaco implicato e degli elementi a favore dell'esistenza di un nesso di causalità tra assunzione del farmaco e verificarsi dell'evento) potrà generare un segnale, ovvero l'ipotesi che quell'evento possa rappresentare una vera e propria ADR. In tal caso, successivi studi 'ad hoc' potranno verificare questa ipotesi ed eventualmente fornire informazioni aggiuntive, non ottenibili attraverso i sistemi di segnalazione spontanea, quali l'incidenza e il rischio relativo per l'ADR in questione.

Questa metodologia presenta notevoli vantaggi (limitate risorse economiche ed organizzative, comprende tutti i farmaci disponibili in commercio, comprende tutte le categorie di pazienti, inclusi particolari sottogruppi, permette di identificare fattori predisponenti al verificarsi di reazioni avverse, permette di identificare reazioni insolite o precedentemente non individuate) anche se molteplici possono essere i limiti (le informazioni raccolte sono spesso incomplete o comunque limitate, la sensibilità del sistema viene ridotta dalla sottosegnalazione e dalla segnalazione selettiva per oggetto e/o fonte della segnalazione, il tasso di segnalazione è soggetto a variazioni nel tempo, non è possibile trarre informazioni dirette sull'incidenza delle reazioni).

Definizioni

Riportiamo di seguito le definizioni che comunemente vengono utilizzate per uniformare il significato dei termini che vengono impiegati, definizioni che seppur l'OMS ha dato in ambito umano, possono essere usate anche per la Farmacovigilanza Veterinaria.

- 1 – Effetto collaterale: qualsiasi effetto non intenzionale di un farmaco che insorga alle dosi normalmente impiegate nell'animale e che sia connesso alle proprietà del farmaco. Sono reazioni di tipo A.
- 2 –Evento avverso: qualsiasi fenomeno clinico spiacevole che si presenta durante un trattamento con un farmaco, ma che non abbia necessariamente un rapporto di causalità (o di relazione) con il trattamento stesso.
- 3 – Reazione avversa o effetto collaterale negativo: risposta ad un farmaco che sia nociva e non intenzionale e che avvenga alle dosi normalmente usate nell'animale per la profilassi, la diagnosi o la terapia della malattia o a seguito di modificazioni della fisiologia. Nella definizione vengono comprese tutte le dosi di farmaco prescrivibili clinicamente, ma viene esclusa l'overdose accidentale o deliberata.
- 4 – Reazione avversa inaspettata o effetto collaterale inatteso: reazione avversa la cui natura e severità non è riportata nel foglietto illustrativo o nella autorizzazione alla commercializzazione del farmaco o che sia inattesa rispetto alle caratteristiche del farmaco stesso. Questa sottoclassificazione viene inclusa per facilitare la comprensione del tipo di reazione avversa. È questa la reazione più importante da comunicare ai centri di farmacovigilanza.
- 5 – Reazione avversa o evento avverso serio o grave effetto collaterale negativo: qualsiasi evento collaterale letale che, per qualsiasi dose, metta in pericolo la vita del paziente, crei lesioni o una persistente o significativa invalidità o incapacità, provochi nell'animale in cura sintomi permanenti o prolungati, provochi la morte.
- 6 - Reazione avversa grave e inattesa o effetto collaterale grave e inatteso: un effetto collaterale sia grave che inatteso la cui natura, gravità o conseguenza non è coerente con il Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto..

La relazione di causalità fra farmaco e reazione avversa è classificata in diversi modi; riteniamo che quella proposta dal WHO International Drug Monitoring Programme possa essere accettata anche in ambito veterinario.

- 1 – Relazione certa: quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che insorge con una plausibile sequenza temporale dall'assunzione

del farmaco e che non può essere spiegato dalla malattia per il quale il farmaco è impiegato, né dalla concomitante assunzione di altri farmaci o sostanze chimiche. La reazione deve essere già stata osservata per il farmaco sospettato. La reazione deve migliorare con il dechallenge e ricomparire con il rechallenge.

- 2 – Relazione probabile: quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che insorge con una plausibile sequenza temporale dall'assunzione del farmaco e che non può essere spiegato dalla malattia per il quale il farmaco è impiegato, né dalla concomitante assunzione di altri farmaci o sostanze chimiche. La reazione deve essere già stata osservata per il farmaco sospettato. La reazione deve migliorare con il dechallenge. Non è necessario il rechallenge perché la reazione avversa rientri in questa definizione.
- 3 – Relazione possibile: quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che insorge con una plausibile sequenza temporale dall'assunzione del farmaco e che non può essere spiegato dalla malattia per il quale il farmaco è impiegato, né dalla concomitante assunzione di altri farmaci o sostanze chimiche. La reazione deve essere già stata osservata per il farmaco sospettato. Non è necessario avere informazioni sull'effetto del dechallenge.
- 4 – Relazione improbabile: quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che insorge con una sequenza temporale dall'assunzione del farmaco che rende improbabile una connessione causale o in cui altri farmaci o sostanze chimiche o la malattia del paziente possono spiegare l'evento osservato.
- 5 – Relazione condizionata/inclassificata: quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che viene riportato come una reazione avversa, che necessita di più dati per una appropriata valutazione o per la quale si stanno valutando dati ulteriori.
- 6 – Relazione non valutabile/inclassificabile: una segnalazione che riporta una reazione avversa che non può essere giudicata a causa della mancanza o contraddittorietà delle informazioni e che non può essere verificata o supportata da altre informazioni.

Il Decreto Legislativo 9 aprile 2003, n. 71

Il 9 aprile 2003 è stato emanato, e pubblicato nel Supplemento Ordinario n. 61/L alla Gazzetta Ufficiale n. 87 del 14 aprile 2003, il D. L.gs n. 71, "Attuazione delle direttive 2000/37/CE e 2001/82/CE concernenti medicinali veterinari, Farmacovigilanza di farmaci veterinari", che inserisce dopo il capo IV del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 119, il Capo IV-bis, la Commissione consultiva del farmaco veterinario che opera, presso la Direzione generale della sanità pubblica veterinaria, degli alimenti e della nutrizione del Ministero della salute. I veterinari e i farmacisti riferiscono tempestivamente di eventuali effetti collaterali e di eventuali sospette diminuzioni di efficacia dei medicinali veterinari al Ministero della salute ed ai Centri regionali di farmacovigilanza. Le segnalazioni sono effettuate, conformemente ai modelli di scheda di segnalazione di norma entro sei giorni lavorativi; o entro tre giorni lavorativi, nei casi di gravi effetti collaterali negativi sull'animale e sull'uomo. Vengono ribadite le definizioni di effetto collaterale negativo, di grave effetto collaterale negativo, di effetto collaterale negativo inatteso, di uso improprio

del farmaco veterinario e vengono definiti l'effetto collaterale negativo su soggetto umano (la reazione nociva e non voluta che si verifica in un soggetto umano a seguito dell'esposizione ad un medicinale veterinario), i rapporti periodici di aggiornamento sulla sicurezza (le relazioni periodiche che contengono le informazioni previste nel decreto), gli studi sui controlli post-vendita (gli studi farmacoepidemiologici o la sperimentazione clinica effettuati conformemente alle condizioni che regolano l'autorizzazione all'immissione in commercio, allo scopo di identificare e valutare un rischio relativo alla sicurezza di un medicinale veterinario per il quale è stata rilasciata l'autorizzazione) e la diminuzione di efficacia (diminuzione dell'efficacia clinica del trattamento con il medicinale veterinario rispetto a quella attesa in base alle indicazioni per l'uso riportate nel sommario delle caratteristiche del prodotto e nel foglio illustrativo).

L'art. 3 sostituisce l'art. 26-bis del D. L.gs n. 119/92 e per mezzo di questo è istituito il sistema nazionale di farmacovigilanza, allo scopo di raccogliere e valutare scientificamente le informazioni utili per la vigilanza dei medicinali veterinari, in particolare per quanto riguarda gli effetti collaterali negativi dei medicinali veterinari sugli animali e su soggetti umani. Il sistema tiene conto anche di tutte le informazioni relative alla diminuzione di efficacia dei medicinali, all'uso improprio, agli studi circa la validità dei tempi di attesa e agli eventuali problemi relativi all'ambiente correlati all'uso dei medicinali. Le informazioni così raccolte sono correlate ai dati disponibili sulla vendita e la prescrizione dei medicinali veterinari e sono interpretate alla luce delle linee guida emanate dalla Commissione europea. Tale sistema fa capo al Ministero della salute, Direzione generale della sanità pubblica veterinaria, degli alimenti e della nutrizione, di seguito denominata: "Direzione", ed è costituito dalla stessa Direzione e dai Centri regionali di farmacovigilanza.

Al Decreto sono allegate una Scheda di segnalazione alla Autorità competenti di sospetta reazione avversa ed una Scheda di segnalazione alla Autorità competenti di sospetta diminuzione di efficacia, costituite da vari campi, alcuni dei quali devono essere compilati obbligatoriamente e che vengono riportate di seguito.

Conclusioni

Il D. L.gs 9 aprile 2003, n. 71, attuazione delle direttive 2000/37 e 2001/82 concernenti medicinali veterinari, entrato in vigore il 29 aprile 2003, ha apportato alcune essenziali novità modificando il D. L.gs n. 119/92. Innanzi tutto ha inserito la figura professionale del farmacista tra gli autori delle segnalazioni relative alla farmacovigilanza sui medicinali veterinari. Pertanto, oltre al veterinario anche il farmacista è tenuto a segnalare eventuali effetti collaterali ed eventuali sospette diminuzioni di efficacia, al Ministero della salute e ai Centri regionali di farmacovigilanza, utilizzando la scheda standard di segnalazione sopra riportata di norma, entro sei giorni lavorativi, oppure, nei casi di gravi effetti collaterali negativi sull'animale e sull'uomo, entro tre giorni lavorativi. Ha previsto l'istituzione di un sistema di farmacovigilanza, allo scopo di raccogliere e valutare scientificamente le informazioni utili per la vigilanza dei medicinali veterinari, in particolare per quanto riguarda gli effetti collaterali negativi dei medicinali veterinari sugli animali e sui soggetti umani che fa capo al Ministero della salute - Direzione generale della sanità pubblica veteri-

naria, degli alimenti e della nutrizione, denominata “Direzione”, ed è costituito dalla stessa Direzione e dai Centri Regionali di farmacovigilanza istituiti dalle Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano. Ha rivisto alla luce delle nuove definizioni comunitarie non solo le denominazioni delle varie tipologie di effetto collaterale, ma anche i compiti e le funzioni del responsabile addetto alla farmacovigilanza per conto del titolare dell’AIC, nonché le responsabilità e le attribuzioni del titolare dell’AIC. Ha fissato in maniera più puntuale rispetto al precedente decreto, i tempi, le modalità e i destinatari delle segnalazioni in materia di farmacovigilanza. Infine, in materia di sanzioni, ha inserito la figura professionale del farmacista tra i nuovi destinatari di sanzioni amministrative pecuniarie per la violazione degli obblighi in materia di farmacovigilanza sui medicinali veterinari, che vanno da euro 2.600,00 a 15.500,00.

La mancata segnalazione, o meglio sottosegnalazione, rappresenta il limite maggiore dei sistemi di segnalazione spontanea di ADR che presuppone che un evento avverso che si verifica in un paziente in trattamento con uno o più farmaci possa essere riconosciuto come tale; che possa essere sospettata l’esistenza di un rapporto causale tra insorgenza dell’evento e assunzione di un farmaco; che l’evento venga segnalato. Il sistema presuppone anche il veterinario nel corso della propria attività professionale abbia una probabilità molto elevata di osservare pazienti con ADR anche se è possibile che non riconosca un’ADR come tale; non ne sospetti la relazione con un farmaco; anche ove la sospetti, non ne segnali il verificarsi. Riteniamo infatti che sebbene l’entità della sottosegnalazione sia ampiamente variabile a seconda delle stime, è certo che il numero di ADR segnalate costituisce una percentuale minima del totale delle ADR che si verificano. I fattori implicati nella mancata segnalazione di ADR sono molteplici ed alquanto eterogenei e fra questi vale la pena di ricordare la mancanza del modulo di segnalazione, la mancanza di un centro di riferimento cui indirizzare le segnalazioni, la mancanza di informazioni su come segnalare, la mancanza di tempo per segnalare. D’altra parte non bisogna dimenticare che si riscontrano molteplici fattori connessi alle caratteristiche intrinseche dei sistemi di segnalazione spontanea che possono influenzare gli stessi tassi di segnalazione di ADR e fra questi ricordiamo che il numero di segnalazioni tende a riflettere la tossicità acuta di un farmaco, il numero di segnalazioni tende ad essere funzione dell’impiego di un farmaco, il numero di segnalazioni dipende dalla vita commerciale del farmaco, i tassi di segnalazione tendono a variare da un anno all’altro, il numero di segnalazioni tende ad aumentare quando l’attenzione dei medici viene richiamata su uno specifico problema, il numero di segnalazioni può essere influenzato dalle modalità di impiego del farmaco. Infine riteniamo che esiste una chiara (e comprensibile) tendenza a segnalare soprattutto le ADR gravi e quelle che si verificano a breve distanza di tempo dalla somministrazione di un farmaco.

I. SCHEDA DI SEGNALAZIONE ALLE AUTORITÀ COMPETENTI DI SOSPETTA REAZIONE AVVERSA

DATI IDENTIFICATIVI DELL'AUTORE DELLA SEGNALAZIONE (*)

- Nome e cognome
- Indirizzo
- Telefono
- Qualifica/occupazione (veterinario, farmacista, proprietario dell'animale)

DATI RELATIVI ALL'ANIMALE/I TRATTATO/I (*)

- Numero degli animali trattati
- Numero degli animali con segni clinici
- Dati identificativi degli animali con segni clinici:
 - specie
 - razza
 - sesso
 - età (in giorni, settimane, mesi anni)
 - peso (in kg)
 - stato fisiologico (gravidanza, allattamento, accrescimento)

DATI RELATIVI AL PRODOTTO MEDICINALE SOSPETTO(*)

- Nome del prodotto/nome commerciale
- Nome scientifico approvato/principio attivo
- ATCvetCodice (Gruppo Terapeutico)
- Forma farmaceutica
- Numero del lotto
- Data di scadenza del lotto (se rilevante)
- Dati riguardante la conservazione (se rilevante)

DATI RELATIVI AL TRATTAMENTO

Dati identificativi della persona che ha effettuato il trattamento :

- nome e cognome
- indirizzo
- telefono
- qualifica/occupazione (veterinario, proprietario dell'animale)
- Motivo del trattamento (diagnosi)
- Posologia e frequenza del trattamento
- Via di somministrazione del farmaco
- Data di inizio del trattamento
- Data di fine trattamento e/o durata del trattamento
- Tempo intercorso tra la somministrazione del prodotto e l'insorgenza della reazione
- Provvedimenti adottati in seguito alla reazione (es. sospensione del trattamento, riduzione della dose)

PRECEDENTI REAZIONI AL PRODOTTO

- Dati riguardanti gli animali trattati

- Descrizione della reazione
- Provvedimenti adottati in seguito alla reazione (es. sospensione del trattamento, riduzione della dose, eventuali trattamenti effettuati)

ALTRI PRODOTTI USATI CONTEMPORANEAMENTE

Per ogni prodotto impiegato indicare:

- Nome del prodotto/nome commerciale
- Nome scientifico approvato/principio attivo
- ATCvet Codice (Gruppo Terapeutico)
- Forma farmaceutica
- Numero del lotto
- Data di scadenza del lotto (se rilevante)
- Dati riguardanti la conservazione (se rilevante)

DATI RELATIVI AL TRATTAMENTO CON ALTRI PRODOTTI USATI CONTEMPORANEAMENTE

- Dati identificativi della persona che ha effettuato il trattamento (nome, cognome, qualifica/occupazione)
- Motivo del trattamento (diagnosi)
- Posologia e frequenza del trattamento
- Via di somministrazione del farmaco
- Data di inizio del trattamento
- Data di fine trattamento e/o durata del trattamento
- Altre informazioni rilevanti

DATI RELATIVI ALLA REAZIONE (*)

- Descrizione della reazione (descrizione della sequenza degli eventi, segni clinici e altre rilevanti osservazioni)
- Data di inizio della reazione
- Data di cessazione della reazione e/o durata
- Trattamento della reazione
- Numero degli animali che mostrano segni clinici
- Numero degli animali morti

Informazioni relative alla reazione in seguito alla sospensione del trattamento

- Informazioni, se disponibili, relative a:
 - numero degli animali trattati con sequele
 - numero di animali trattati ricoverati

INDAGINI PREDISPOSTE O EFFETTUATE ED EVENTUALI ESITI DI CUI SI E' GIÀ A DISPOSIZIONE

- Esami post-mortem
- Esami di laboratorio

- Esami a cui è stato sottoposto il prodotto medicinale
-
- Indagini effettuate dalla ditta titolare di Aic
-

ALTRE EVENTUALI INFORMAZIONI

.....

.....

VALUTAZIONE DELLA CASUALITÀ

(da compilare a cura del titolare dell'Aic o dei Centri regionali di farmacovigilanza)

Valutazione secondo il sistema ABON

1. Categoria A - probabile
2. Categoria B - possibile
3. Categoria O - non classificabile
4. Categoria N - improbabile

Commenti e conclusioni -

.....

.....

.....

DATI RELATIVI ALLE REAZIONI AVVERSE NELL'UOMO CAUSATE DAL MEDICINALE VETERINARIO

IDENTIFICAZIONE DEL PAZIENTE (in accordo con la legislazione nazionale)

- nome e cognome
- indirizzo
- telefono
- Sesso(*) età(*)
- Occupazione (se rilevante ai fini dell'esposizione al prodotto) (*)

-
- Dati del prodotto usato(*)
- Data della reazione (*)
- Descrizione della reazione (*)

-
- Tipo di esposizione (es inalazione, iniezione, ingestione etc.) (*)

-
- Provvedimenti a seguito della reazione (es. ricovero, durata del ricovero, specifici trattamenti richiesti etc.)

(*).....

.....

.....

.....

(*) N.B. I campi contrassegnati dagli asterischi devono essere compilati obbligatoriamente

II. SCHEDA DI SEGNALAZIONE ALLE AUTORITÀ COMPETENTI DI SOSPETTA DIMINUZIONE DI EFFICACIA

DATI IDENTIFICATIVI DELL'AUTORE DELLA SEGNALAZIONE (*)

- Nome e cognome
- Indirizzo
- Telefono
- Qualifica/occupazione (veterinario, farmacista, proprietario dell'animale)

DATI RELATIVI ALL'ANIMALE/I TRATTATO/I (*)

- Numero degli animali trattati

- Numero degli animali in cui si è rilevata la sospetta diminuzione di efficacia
- specie
- razza
- sesso
- età (in giorni, settimane, mesi anni)
- peso (in kg)
- stato fisiologico (gravidanza, allattamento, accrescimento)

DATI RELATIVI AL PRODOTTO MEDICINALE SOSPETTO(*)

- Nome del prodotto/nome commerciale
- Nome scientifico approvato/principio attivo
- ATCvetCodice (Gruppo Terapeutico)
- Forma farmaceutica
- Numero del lotto
- Data di scadenza del lotto (se rilevante)
- Dati riguardante la conservazione (se rilevante)

DATI RELATIVI AL TRATTAMENTO

Dati identificativi della persona che ha effettuato il trattamento :

- nome e cognome
- indirizzo
- telefono
- qualifica/occupazione (veterinario, proprietario dell'animale)

- Motivo del trattamento (diagnosi)
- Posologia e frequenza del trattamento
- Via di somministrazione del farmaco
- Data di inizio del trattamento
- Data di fine trattamento e/o durata del trattamento

PRECEDENTI EPISODI DI SOSPETTA DIMINUZIONE DI EFFICACIA DEL MEDICINALE VETERINARIO

Dati riguardanti gli animali trattati

- Descrizione della reazione
- Provvedimenti adottati in seguito alla reazione (es. sospensione del trattamento, varia-

zione della dose, eventuali trattamenti effettuati)
.....

ALTRI PRODOTTI USATI CONTEMPORANEAMENTE

Per ogni prodotto impiegato indicare:

- Nome del prodotto/nome commerciale
- Nome scientifico approvato/principio attivo
- ATCvet Codice (Gruppo Terapeutico)
- Forma farmaceutica
- Numero del lotto
- Data di scadenza del lotto (se rilevante)
- Dati riguardanti la conservazione (se rilevante)

DATI RELATIVI AL TRATTAMENTO CON ALTRI PRODOTTI USATI CONTEMPORANEAMENTE

- Dati identificativi della persona che ha effettuato il trattamento (nome, cognome, qualifica/occupazione)
-
- Motivo del trattamento (diagnosi)
- Posologia e frequenza del trattamento
- Via di somministrazione del farmaco
- Data di inizio del trattamento
- Data di fine trattamento e/o durata del trattamento
- Altre informazioni rilevanti
-

DATI RELATIVI ALLA SOSPETTA DIMINUZIONE DI EFFICACIA (*)

- Descrizione della sequenza degli eventi a seguito del trattamento e altre rilevanti osservazioni
-
- Numero degli animali morti a seguito della sospetta diminuzione di efficacia
-
- Numero degli animali trattati con sequele a causa della sospetta diminuzione di efficacia
- Numero di animali trattati ricoverati
- Provvedimenti adottati in seguito alla sospetta diminuzione di efficacia (es. sospensione del trattamento, variazione della dose, eventuali trattamenti effettuati)
-

INDAGINI PREDISPOSTE O EFFETTUATE ED EVENTUALI ESITI DI CUI SI E' GIÀ A DISPOSIZIONE

- Esami post-mortem
-
- Esami di laboratorio
-
- Esami a cui è stato sottoposto il prodotto medicinale
-
- Indagini effettuate dalla ditta titolare di Aic
-

ALTRE EVENTUALI INFORMAZIONI

.....
.....

(*) N.B. I campi contrassegnati dagli asterischi devono essere compilati obbligatoriamente.

DA COMPILARE A CURA DEL TITOLARE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO DEL
MEDICINALE VETERINARIO SOSPETTO
DATI GENERALI DEL TITOLARE DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN
COMMERCIO DEL MEDICINALE VETERINARIO
DATI IDENTIFICATIVI DELLA PERSONA QUALIFICATA PER LA
FARMACOVIGILANZA (*)

- Nome e cognome
- Indirizzo
- telefono, numero fax

DATI IDENTIFICATIVI DELLA SEGNALAZIONE (*)

- Numero di riferimento del titolare AIC identificativo del caso
.....
- Data di ricevimento della segnalazione da parte del titolare AIC (Paese in cui risiede
la persona qualificata per la farmacovigilanza)
.....
- Data di invio della segnalazione alle Autorità competenti
.....
- Paese in cui si è verificata la reazione
- Paese di fabbricazione del farmaco
- Fonte della segnalazione (spontanea durante prove cliniche, durante studi post-
autorizzazione)
-

DATA (*)

FIRMA DELL'AUTORE DELLA SEGNALAZIONE (*)

.....

(*) N.B. I campi contrassegnati dagli asterischi devono essere compilati obbligatoriamente

Parole chiave: Farmacovigilanza veterinaria, farmaci veterinari, Decreto Legislativo n. 71/2003.

Key words: Veterinary Pharmacovigilance System, veterinary medicinal products, Law n. 71/2003

RIASSUNTO - La farmacovigilanza intesa come il mezzo di controllo costante del farmaco, già registrato ed in commercio, durante il suo impiego nella pratica medica, sia in campo umano che veterinario, proprio in ambito veterinario è oggetto del Decreto Legislativo 9 aprile 2003, n. 71, entrato in vigore il 29 aprile 2003, che ha modificato il Decreto Legislativo n. 119/92. Le nuove disposizioni prevedono che oltre al veterinario anche il farmacista sia tenuto a segnalare eventuali effetti collaterali ed eventuali sospette diminuzioni di efficacia al Ministero della salute e ai Centri regionali di farmacovigilanza, utilizzando la scheda standard di segnalazione di norma entro sei giorni lavorativi, oppure, nei casi di gravi effetti collaterali negativi sull'animale e sull'uomo, entro tre giorni lavorativi; sia istituito un sistema di farmacovigilanza per raccogliere e valutare scientificamente le informazioni utili per la vigilanza dei medicinali veterinari; siano riviste le denominazioni delle varie tipologie di effetto collaterale, i compiti e le funzioni del responsabile addetto alla farmacovigilanza, le responsabilità e le attribuzioni del titolare dell'AIC; siano fissati i tempi, le modalità e i destinatari delle segnalazioni in materia di farmacovigilanza; in materia di sanzioni, sia inserita la figura professionale del farmacista tra i nuovi destinatari di sanzioni amministrative pecuniarie per la violazione degli obblighi in materia di farmacovigilanza sui medicinali veterinari, che vanno da euro 2.600,00 a 15.500,00.

SUMMARY - The Pharmacovigilance System, considered as the constant check-up of the medicinal products, registered and already on the market, during their employment in the medical practice, either in human or in veterinary field, is ruled by the Decreto Legislativo (D. L.gs) 09 April 2003, n. 71, come into force on April 29, 2003. The D. L.gs n.71 has modified the D. L.gs n. 119/92. The new dispositions foresee that besides the veterinarian also the chemist is held to indicate the possible side-effects and decreased-effect of the drugs. The observations must be given to the Ministry of the Health and to the of Regional Centres of Pharmacovigilance System, using the standard signal card normally, within six working days, or, in the case of heavy negative side-effects on animal and on man, within three working days. The D. L.gs n.71 foresee also that:

- a drug surveillance system; must be instituted to collect and value scientifically the useful information for the supervision of the veterinary medicines;
- the names and description of the different side-effects must be reviewed;
- the tasks and the functions of the person in charge to the drug surveillance must be re-defined;
- the chemist must be included within the people subjected to the new administrative sanctions for faults in the drug surveillance that vary from € 2,600.00 to 15,500.00.

Elenco dei lavori pubblicati nel 2003

- Biagi G., Signorini G., Grillone R. (2003). Ruolo e responsabilità professionali del Veterinario Ispettore. ODV, 24(1): 18/19.
- Biagi G., Luchetti E., Nannipieri S., Signorini G. (2003). Gli additivi nell'alimentazione degli animali. Atti FeMeSPRum, in stampa
- Luchetti E., Biagi G., Nannipieri S., Signorini G. (2003). Pubblicità del farmaco veterinario. Rassegna di Diritto, Legislazione e Medicina Legale Vet., 2(1): 55-62.
- Signorini G., Biagi G., Luchetti E., Cardini G., Bernocchi R. (2003). La cartella clinica veterinaria. Aspetti giuridici e medico legali. Atti SISVet., 57: 241-242.
- Biagi G., Luchetti E., Signorini G., Bernocchi R. (2003). La ricetta: aspetti medico-legali. Atti SISVet., 57: 243-244.
- Biagi G., Luchetti E., Signorini G. (2003). La prescrizione degli analgesici oppiacei. ODV, 24(11): 61-62.
- Biagi G., Luchetti E., Nannipieri S., Signorini G. (2003). Il comparaggio in ambito veterinario Rassegna di Diritto, Legislazione e Medicina Legale Vet., (2): 11-19.
- Biagi G., Luchetti E., Nannipieri S., Signorini G. (2003). Informazione scientifica in ambito veterinario Rassegna di Diritto, Legislazione e Medicina Legale Vet., 2(2): 21-28.

L'ALLEVAMENTO SUINO ANNESSO AL CASEIFICIO SOCIALE: RIFLESSI ECONOMICI SULLE AZIENDE LATTIFERE¹

A. Salghetti* - P. Mondin**

1. Premessa

La trasformazione lattiero-casearia è uscita da tempo dall'azienda agricola per essere trasferita ad un nuovo tipo d'impresa: il caseificio. Nei caseifici è prevalente la presenza della forma associata. Dalla lavorazione del latte residuano grandi quantitativi di siero che hanno ancora un certo valore alimentare ed il cui impiego è confacente all'alimentazione dei suini.

Da qui la diffusione degli allevamenti suini annessi ai caseifici, con lo sfruttamento di una importante risorsa alimentare di risulta, il cui smaltimento potrebbe creare oneri e problemi per l'azienda.

I soci ottengono la remunerazione del latte conferito in base ai risultati economici di bilancio del caseificio. Nel bilancio confluiscono anche gli utili dell'allevamento suino; pertanto il prezzo di trasformazione del latte pagato ai soci comprende anche tale quota di utili. Non è quindi indifferente l'esito di gestione dell'allevamento suino sul prezzo del latte e sui risultati del bilancio economico delle aziende lattifere conferenti.

In questi ultimi anni però abbiamo assistito all'abbandono dell'allevamento suino da parte di molti caseifici, con riflessi economici negativi sul prezzo del latte. Il processo continua tutt'ora in conseguenza di varie motivazioni, sia di ordine tecnico che di ordine economico. Le recenti normative sul trattamento dei reflui degli allevamenti suini pone degli obblighi vincolanti ai caseifici, che devono adeguare gli impianti di smaltimento.

Il costo degli impianti è alquanto elevato e gli oneri di ammortamento e di manutenzione incidono pesantemente sui conti economici degli allevamenti suini, specialmente in quelli di piccole dimensioni. La dimensione dell'allevamento suino è infatti strettamente correlata alla capacità di lavorazione del latte da parte del caseificio, e quindi alla quantità di siero prodotto.

Nel 2002, nel comprensorio di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano erano attivi 547 caseifici, che lavoravano mediamente 29 mila quintali di latte all'anno, quando invece nel comprensorio del formaggio Grana Padano operavano 198 caseifici con una capacità lavorativa di 114 mila quintali, quattro volte superiore.

¹ Lo studio è frutto di un lavoro comune dei due autori. Tuttavia in sede di stesura del testo Andrea Salghetti ha redatto i paragrafi 1, 2, 3.4, 4; mentre Paolo Mondin ha redatto i paragrafi 3, 3.1, 3.2, 3.3.

* Sezione di Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

** Medico Veterinario.

Pertanto nel primo comprensorio assistiamo al progressivo abbandono dell'allevamento suino annesso ai caseifici. Nel secondo comprensorio le condizioni strutturali sono favorevoli ad una ulteriore espansione dell'allevamento, perché in grado di far fronte agli elevati costi degli impianti per lo smaltimento dei reflui.

I risultati economici degli allevamenti bovini che conferiscono il latte al caseificio sociale sono strettamente legati al prezzo di trasformazione che viene loro liquidato. Infatti, il prezzo del latte è condizionato dalla presenza o meno dell'allevamento suino annesso al caseificio sociale.

Con la presente indagine si intendono fornire alcune indicazioni utili sull'apporto della gestione suini sul prezzo di trasformazione del latte pagato ai soci e valutare l'importanza di tale apporto nell'assicurare migliori prospettive economiche alle aziende lattifere associate.

2. Materiali e metodi

L'analisi si avvale delle rilevazioni economiche di un caseificio sociale, con annesso l'allevamento suino, in una serie storica di ben 31 anni (dal 1971 al 2001). Il periodo preso in esame e la continuità dei dati forniti dal medesimo caseificio ci consentono di ottenere delle indicazioni attendibili, annullando gli effetti congiunturali di mercato e delle fluttuazioni cicliche dei prezzi.

Il bilancio economico del caseificio è quello conforme alle normative civilistiche, alle quali i caseifici sono obbligati ad attenersi, nonché a quelle fiscali che nel corso degli anni si sono venute modificando.

I risultati economici di bilancio ci portano a quantificare in una prima fase il valore di trasformazione del latte che i soci hanno conferito al caseificio, in una seconda fase a determinare il prezzo di trasformazione del latte, ottenuto dividendo il valore di trasformazione per la quantità complessiva del latte conferito dai soci.

Il prezzo di trasformazione è il compenso che il caseificio riconosce al latte conferito dai soci e che gli stessi fatturano alla cooperativa. L'inserimento del costo del latte pagato ai soci nel bilancio della cooperativa porta al pareggio delle poste di bilancio e alla chiusura dell'esercizio senza profitto, come prevedono le norme civilistiche sulla cooperazione.

In realtà il prezzo di trasformazione del latte è formato da due componenti: dai risultati economici della trasformazione del latte, che rappresenta l'attività caratteristica del caseificio, e dai risultati economici dell'annesso allevamento suino, la cui gestione viene tenuta provvisoriamente separata con imputazione dei costi specifici e la ripartizione dei costi comuni.

L'analisi separata delle due gestioni ci consente di quantificare l'apporto economico della componente dell'allevamento suino sul prezzo complessivo di trasformazione del latte e la dinamica nel periodo esaminato. Tenuto conto dell'inflazione è possibile raffrontare i valori in termini omogenei per tutto il periodo esaminato e ottenere l'incidenza media annua.

La quota suini ha contribuito all'aumento del prezzo di trasformazione complessivo del latte che i soci conferenti hanno percepito dal caseificio sociale. Si tratta di una quota non indifferente che ha fatto crescere i ricavi dell'allevamento lattifero e si traduce in altrettanta crescita di reddito.

Mentre sulla produzione lorda vendibile dell'azienda zootecnica l'apporto dell'utile suini può avere una incidenza contenuta, tale apporto in termini di reddito netto può essere elevato e può rappresentare la chiave di lettura della resistenza della zootecnia da latte del territorio. L'ulteriore prezzo del latte, ottenuto grazie alla presenza dell'allevamento suino, non ha contropartite di costi per l'azienda lattifera, si tratta infatti di reddito aggiuntivo.

Con l'indagine sperimentale saremo in grado di quantificare gli apporti economici dell'allevamento suino annesso al caseificio sociale e di mettere in evidenza le ricadute sui risultati di bilancio degli allevamenti bovini da latte conferenti.

3. L'indagine aziendale

Le rilevazioni aziendali sono state effettuate nel corso del 2002, con riferimento al bilancio del 2001, in un caseificio sociale della provincia di Mantova, dedito alla trasformazione del latte in formaggio Grana Padano, con annesso l'allevamento dei suini. Per gli anni precedenti è stato rilevato solamente il risultato finale: il prezzo di trasformazione del latte.

Nell'agricoltura mantovana i caseifici rivestono una notevole importanza, sia per l'entità del latte trasformato, un quarto del latte lavorato nel comprensorio del Grana Padano, con una capacità media di lavorazione per caseificio di 173 mila quintali di latte, superiore del 53% rispetto ai caseifici dell'intero comprensorio, sia per la tipicità dei prodotti ottenuti in provincia (formaggio Grana Padano e Parmigiano-Reggiano).

All'interno dei caseifici sociali si è andato affermando l'allevamento del suino pesante, dal quale si ottiene la materia prima per diversi prodotti tipici (Prosciutto di Parma e di San Daniele, Culatello di Zibello, ecc.) e altre produzioni trasformate.

Numerosi caseifici del mantovano si sono organizzati tra di loro per realizzare una integrazione verticale di filiera *Latte-Suino* dando origine ad una cooperativa di secondo grado per la commercializzazione dei prodotti: il Consorzio Latterie Sociali Mantovane (CLSM).

Infatti, il CLSM integra l'attività di trasformazione del latte in formaggio Grana Padano e Parmigiano-Reggiano con la produzione di latte fresco e a lunga conservazione, burro, panna, mascarpone ecc. Il tutto commercializzato attraverso il marchio *Virgilio*.

Il CLSM, oltre ad integrare l'attività delle latterie sociali aderenti, ha sotto controllo le strutture di macellazione, di lavorazione e commercializzazione delle carni suine, ed in parte la stagionatura dei prosciutti e la commercializzazione degli stessi (Prosciutto di Parma e di San Daniele).

Pertanto il caseificio sociale si pone come anello di congiunzione tra gli allevatori e il mercato tramite il CLSM, dando più potere contrattuale al mondo produttivo.

Nell'organigramma che segue viene rappresentata la filiera del comparto che mette in collegamento la fase produttiva a quella di trasformazione e commercializzazione, sino ad arrivare al prodotto finito sul mercato. La filiera è strettamente controllata dai produttori associati, ai quali spettano anche gli utili di tutte le fasi del canale distributivo.

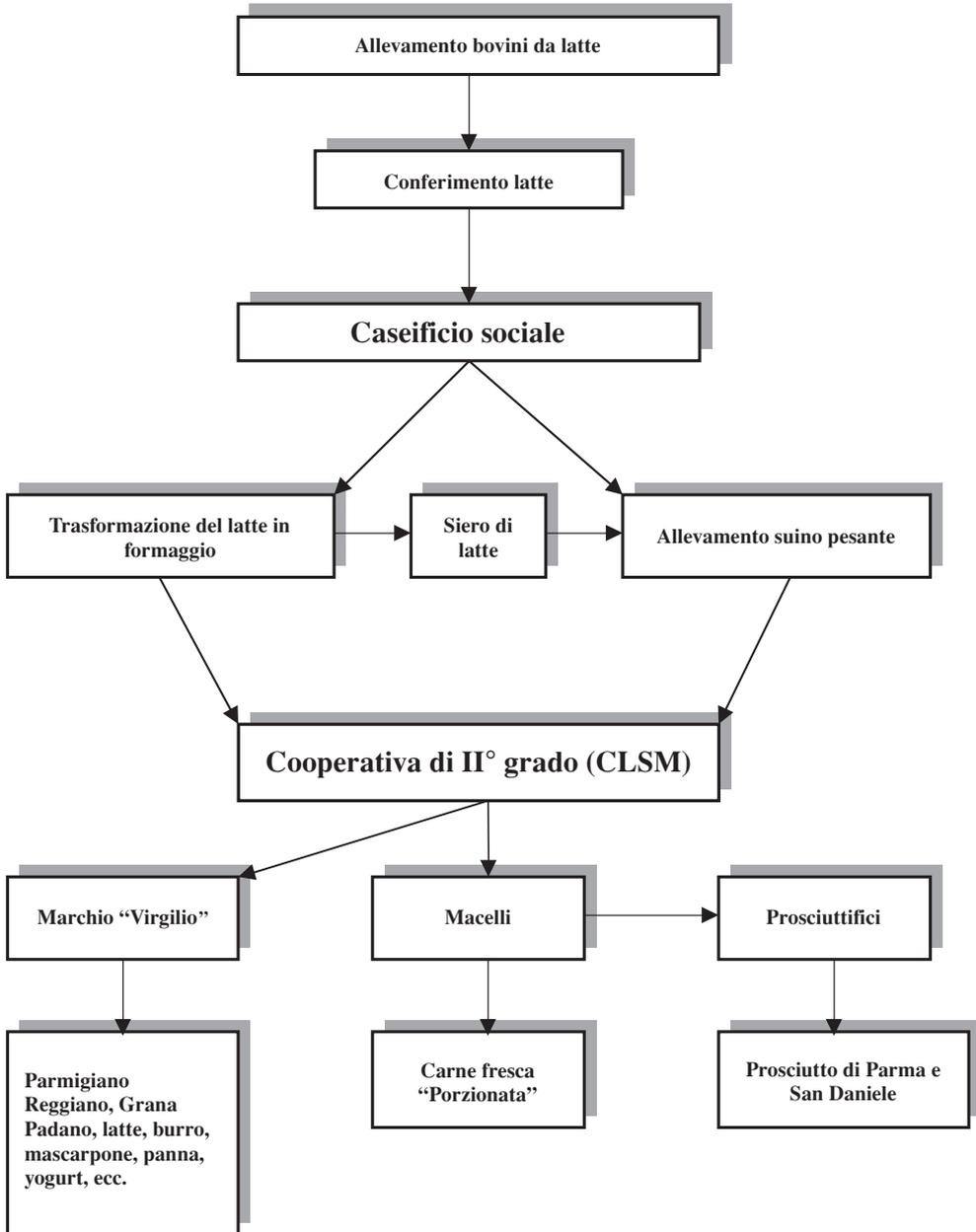


Fig. 1 – Filiera latte-suino

3.1 Il caseificio

Il caseificio in esame è nato negli anni Sessanta ed attualmente è formato da venti soci, che conferiscono interamente la loro produzione di latte. Nel 2002 sono stati conferiti al caseificio 142 mila quintali di latte, pari ad una media per socio di 7.100 quintali. Il formaggio ottenuto ammonta a 27.109 forme di Grana Padano, da cui si deduce una resa media di latte in formaggio del 6,9%. Il volume d'affari del caseificio è assai consistente e si è attestato sui 7,4 milioni di euro, superiore ai 14 miliardi delle vecchie lire.

Le strutture del caseificio sono state rinnovate di recente, con l'adozione delle più moderne tecnologie, sia per quanto riguarda la trasformazione del latte che per l'allevamento suino. La lavorazione del latte, a cui sono addette dieci unità lavoratrici a tempo pieno, viene effettuata una volta al giorno.

Nel 2001 è stato costruito un nuovo magazzino per la stagionatura del formaggio, con una capacità di 39.000 forme. La struttura risulta completamente automatizzata e dispone delle più moderne tecnologie per il controllo dei parametri di stagionatura (temperatura, umidità, ventilazione ecc.). Tutte le operazioni di magazzinaggio sono interamente meccanizzate, a partire dal posizionamento delle forme, alla loro pulizia, al prelievo e al caricamento per la vendita. Con questa nuova struttura il caseificio si è assicurato la piena autonomia della stagionatura del formaggio, senza dipendere da magazzini esterni di stagionatura come avveniva nel passato.

In pratica il caseificio si è posto all'avanguardia nel comparto, investendo notevoli capitali, nella prospettiva di garantire ai soci impegnati nella produzione del latte maggiori certezze per il futuro.

3.2 L'allevamento suino

L'allevamento suino ha accompagnato l'attività del caseificio sin dalla sua nascita, sfruttando per l'alimentazione dei suini il siero residuo della trasformazione del latte in formaggio.

L'evoluzione delle strutture e della gestione dell'allevamento suino ha portato all'attuale forma di allevamento a ciclo chiuso, che adotta le più moderne tecnologie produttive con un management aziendale di alto profilo.

La capacità produttiva annua dell'allevamento si avvicina ai 12.000 capi di suino pesante pronti alla macellazione, tenendo conto che in un anno si possono realizzare più di due cicli produttivi.

Infatti, con il ciclo chiuso si dispone dei riproduttori in grado di soddisfare al fabbisogno di animali necessari a coprire la capacità ricettiva delle strutture, sulla scorta delle disponibilità alimentari di siero di latte. L'allevamento è seguito da un veterinario d'azienda e da sei unità lavoratrici a tempo pieno.

La struttura e l'organizzazione di un allevamento suino a ciclo chiuso prevede la ripartizione in diverse aree:

- Reparto verri: sono disponibili venti box singoli dove sono alloggiati i maschi riproduttori di razza Landrace e Duroc. In un primo incrocio si utilizzano verri Landrace e scrofe Large White, successivamente le scrofette meticce vengono incrociate con

verri Duroc. Trattasi di un incrocio di sostituzione a due vie che sfrutta l'eterosi materna; è il sistema di gran lunga più usato negli allevamenti a ciclo chiuso orientati alla produzione del suino pesante ed è quello consentito dai consorzi del Prosciutto di Parma e di San Daniele.

- Gabbie di fecondazione: sono 450 gabbie singole dove le scrofette e le scrofe adulte vengono condotte per la fecondazione nella forma artificiale, nelle gabbie rimangono fino all'accertamento della gravidanza.

- Reparto di gestazione: è composto da due porcilaie suddivise in box per un totale di circa 550 posti, dove le gestanti rimangono sino all'epoca del parto.

- Sale parto: sono disponibili 182 gabbie parto. I locali sono dotati di sistemi automatici di gestione e di controllo della temperatura e della ventilazione. Tutti i dati produttivi e riproduttivi delle scrofe sono informatizzati per una migliore gestione della scrofaia.

- Reparto svezzamento: sono disponibili circa 2.220 posti suddivisi in numerose sale, tutte dotate di sistemi automatici di controllo della temperatura e della ventilazione. È questo il periodo in cui i suinetti vengono tatuati sull'orecchio e sulla coscia per rendere possibile la "tracciabilità" dei prodotti, come previsto nei protocolli DOP del Prosciutto di Parma e di San Daniele. In questa fase inizia la graduale somministrazione di alimento liquido, la borlanda.

- Porcilaie di magronaggio: sono formate da due capannoni con una capacità di circa 1.800 posti, suddivisi in 22 box dove vengono trasferiti i suinetti svezzati.

- Porcilaie di ingrasso: sono formate da due capannoni, ciascuno con trentadue box, per un totale di circa 5.500 posti di capienza. È in questa fase che si ha il massimo consumo di siero di latte che viene somministrato nella borlanda liquida, nella quale vengono impiegati prodotti acquistati (nucleo e cereali) e cereali forniti dai soci conferenti. La preparazione dell'alimento avviene nel mulino-mangimificio annesso all'allevamento che consente di contenere i costi dell'alimentazione.

- Gabbie di ingrasso: servono per il finissaggio del suino pesante prima della macellazione. Sono 180 gabbie singole e consentono di ottenere soggetti nelle migliori condizioni nutrizionali in funzione della destinazione delle carni per i prodotti tipici.

Particolare attenzione è riservata al controllo sanitario, per assicurare le migliori condizioni di benessere degli animali, per elevare i coefficienti di conversione degli alimenti ed ottenere una carne di qualità. A questo scopo si applica il criterio del tutto pieno e tutto vuoto, per consentire una accurata disinfezione degli ambienti e delle attrezzature. In ogni caso gli interventi sanitari sono ridotti al minimo, privilegiando le azioni preventive e di monitoraggio di tutte le fasi dell'allevamento, con il controllo scrupoloso degli ambienti, degli alimenti e dei materiali impiegati.

Lo standard sanitario e gestionale raggiunto è testimoniato dai buoni parametri riproduttivi della scrofaia sino ad arrivare ai risultati ottenuti nei capi all'ingrasso, in un processo continuo di miglioramento dei risultati e delle stabilità degli stessi.

Tab. 1 – Parametri riproduttivi dell'allevamento suino

Parametri riproduttivi	1999	2000	2001
Totale fecondazioni	2.228	2.073	2.358
Totale parti	1.671	1.468	1.564
Totale aborti	82	84	88
Totale ritorni	227	244	317
Ritorni fino a 23 giorni	101	115	131
Ritorni da 24 a 39 giorni	103	99	147
Ritorni da 40 a 44 giorni	23	28	44
Totale false gravidanze	21	35	47
Numero nati vivi	15.868	14.194	14.904
Numero medio nati vivi per scrofa	9,5	9,7	9,5
Numero nati morti	445	547	536
Numero medio di nati morti per scrofa	0,3	0,4	0,4
Morti sotto scrofa	923	652	571
Numero medio di morti sotto scrofa per scrofa	0,6	0,4	0,5
Totale svezzati	14.945	13.542	13.776
Numero medio di suini svezzati per scrofa	8,9	9,2	8,8
Numero totale di scrofe	711	646	769
Numero scrofe riformate	461	384	301
Percentuale di rimonta	64,8	59,4	39,1
Interparto medio (g)	160,8	160,3	162,0
Intervallo svezzamento concepimento (g)	20,0	19,2	19,9
Numero medio di parti anno per scrofa	2,3	2,3	2,3
Portata al parto (%)	75,0	70,8	66,3
Indice di prolificità	7,2	7,2	6,5

Nella gestione dell'allevamento suino riveste oggi notevole importanza la fase di smaltimento dei reflui zootecnici. Il caseificio ha affrontato in modo organico il problema con la predisposizione di strutture moderne in armonia con le vigenti normative.

Da circa dieci anni è attivo anche un sistema per la produzione e il recupero del biogas che viene utilizzato come combustibile per la produzione del vapore necessario al caseificio per il riscaldamento dei doppi fondi delle caldaie di caseificazione e per altri usi interni.

3.3 I risultati economici

L'analisi economica del caseificio sociale, con l'annesso allevamento suino, si estende ai bilanci che vanno dal 1971 al 2001. Il dato che interessa particolarmente è il prezzo di trasformazione del latte che viene pagato dal caseificio ai soci conferenti.

Tale prezzo è costituito da due parti: la *quota latte* e la *quota suini*, in quanto il bilancio della cooperativa è frutto di due attività strettamente collegate: la trasformazione del latte in formaggio e la trasformazione del siero in carne suina.

Le due attività sono tenute separate a livello contabile in modo da quantificare l'apporto di ciascuna sul prezzo finale di trasformazione del latte. Tutti i valori sono stati conteggiati al netto dell'IVA in maniera da escludere gli effetti prodotti dalle variazioni di aliquota IVA nel periodo e armonizzare i dati con gli anni in cui l'imposta non era ancora stata introdotta.

Il prezzo di trasformazione del latte si ottiene dal rapporto tra il valore di trasformazione e i quintali complessivi di latte conferito dai soci. Il valore di trasformazione a sua volta è stato ottenuto dalla differenza tra il valore dei prodotti trasformati e le spese sostenute per la trasformazione.

Sulla base del prezzo di trasformazione l'allevatore è in grado di emettere la fattura al caseificio, secondo la quantità di latte conferito, in modo da consentire la chiusura a pareggio del bilancio sociale.

Focalizziamo ora la nostra attenzione sul bilancio sintetico riguardante l'allevamento suino. I dati si riferiscono all'anno 2001, l'ultimo della serie storica dell'indagine aziendale. Per gli anni precedenti abbiamo disponibile il risultato finale del caseificio: il prezzo di trasformazione già suddiviso in *quota latte* e *quota suini*.

La produzione lorda vendibile dell'allevamento suino è rappresentata dall'utile lordo stalla, cioè dalla produzione di carne nel corso dell'annata, sia in termini di peso che di valore.

Tab. 2 – Calcolo della produzione di carne suina

Descrizione	Capi (n)	Peso (kg)		Valore (lire)	
		Per capo	Totale	Per kg	Totale
ATTIVO	21.843	117	2.557.148	2.735	6.993.062.501
- Vendita suini grassi	11.741	158	1.854.920	2.975	5.518.383.701
- Consistenza finale	9.210	76	702.228	2.100	1.474.678.800
- Morti	892	50	-	-	-
PASSIVO	21.843	36	792.122	2.150	1.703.172.200
- Acquisto verri	81	77	6.240	8.465	52.820.000
- Consistenza iniziale	10.322	76	785.882	2.100	1.650.352.200
- Nati	11.440	-	-	-	-
PRODUZIONE DI CARNE			1.765.026	2.997	5.289.890.301

La parte attiva dell'utile lordo stalla è rappresentata dalla vendita dei suini, alla quale viene aggiunta la consistenza dei capi presenti alla fine dell'annata agraria. La parte passiva è formata dall'acquisto di animali e dalla consistenza dei capi presenti all'inizio dell'annata. La differenza tra attivo e passivo rappresenta la produzione di carne suina nel corso del 2001. Complessivamente sono stati prodotti 1.765.026 chilogram-

mi di carne per un valore di quasi 5,3 miliardi di lire, pari ad oltre 2,7 milioni di euro.

Dalla produzione di carne vanno sottratte le spese specifiche dell'allevamento, relative all'alimentazione e al lavoro, e l'imputazione dei costi generali per ottenere l'utile dell'allevamento. Rapportando l'utile dell'allevamento ai quintali di latte conferito dai soci otteniamo la *quota suini* che andrà aggiunta alla *quota latte* per la determinazione finale del prezzo di trasformazione. Anche il valore del siero rappresenta un costo per la gestione suini, mentre nella gestione del latte figura come entrata.

A questo punto è possibile quindi risalire al costo di produzione di un chilogrammo di carne suina, essendo note tutte le spese e la quantità complessiva di carne prodotta. Un chilogrammo di carne suina è venuta a costare al caseificio 2.260 lire nel 2001. Essendo noto il prezzo medio della carne venduta, pari a 2.997 lire il chilogrammo, possiamo concludere che l'allevamento dei suini ha portato ad un profitto di 737 lire il chilogrammo. Ciò è quanto andrà effettivamente a costituire la *quota suini* nel prezzo di trasformazione del latte.

Dal bilancio dei suini è possibile determinare altri indici di produttività, come l'indice di conversione dei mangimi: per ottenere un chilogrammo di carne è stato necessario impiegare 3,5 chilogrammi di mangime. Inoltre l'incremento ponderale giornaliero dei suini all'ingrasso è risultato di 760 grammi, un risultato di tutto rilievo e che testimonia della buona gestione dell'allevamento suino.

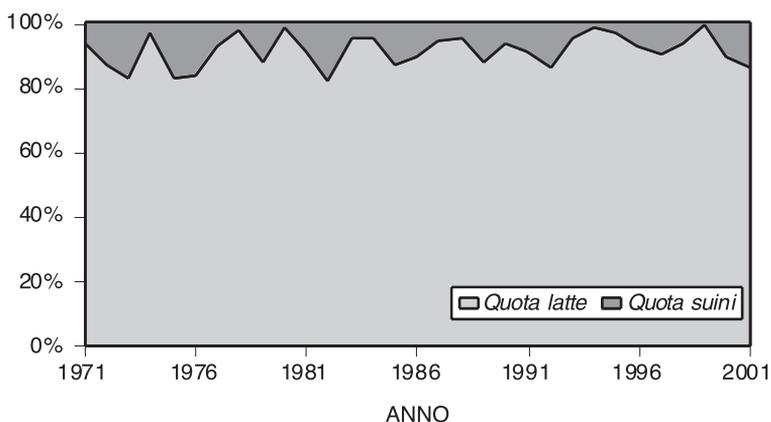
Tab. 3 – Analisi economica dell'allevamento suino

BILANCIO SINTETICO			
Descrizione	Importo (lire)		Totale
	Parziale		
RICAVI: carne			5.289.890.301
COSTI:			3.988.387.131
- Mangimi	2.022.049.170		
- Spese di lavorazione	1.259.197.561		
- Imputazione siero	129.140.400		
- Imputazione costi generali	578.000.000		
UTILE NETTO			1.301.503.170
CALCOLO DELLA QUOTA SUINI			
UTILE NETTO			1.301.503.170
LATTE CONFERITO (q)			134.520
QUOTA SUINI (lire/q)			9.675
CALCOLO DEL COSTO DI PRODUZIONE DELLA CARNE			
COSTO TOTALE			3.988.387.131
CARNE PRODOTTA (kg)			1.765.026
COSTO DI PRODUZIONE (lire/kg)			2.260
PREZZO DI VENDITA (lire/kg)			2.997
PROFITTO (lire/kg)			737

Il prezzo di trasformazione del latte è stato tradotto in lire costanti, posto il 2001 pari a 100, applicando i coefficienti ISTAT di rivalutazione della lira (prezzi al consumo). L'elaborazione ci consente di ottenere dei valori comparabili per tutto il periodo e di calcolare anche la media complessiva.

Nel 2001 i suini hanno contribuito ad elevare il prezzo di trasformazione del latte di quasi 10 mila lire il quintale, che rappresenta più del 13% del prezzo complessivo ricevuto dai soci conferenti. È uno dei risultati migliori del periodo 1971-2001, assieme ad altre cinque annate. È possibile quantificare anche la media annua del periodo della *quota suini* che rappresenta l'8,6% del prezzo di trasformazione del latte. I valori esaminati sono stati calcolati al netto dell'IVA, per rendere più omogenei i confronti, infatti l'aliquota IVA è variata negli anni sia per il latte che per i suini, senza considerare che nei primi anni Settanta tale imposta non era ancora entrata in vigore.

Graf. 1 - Dinamica del prezzo di trasformazione del latte



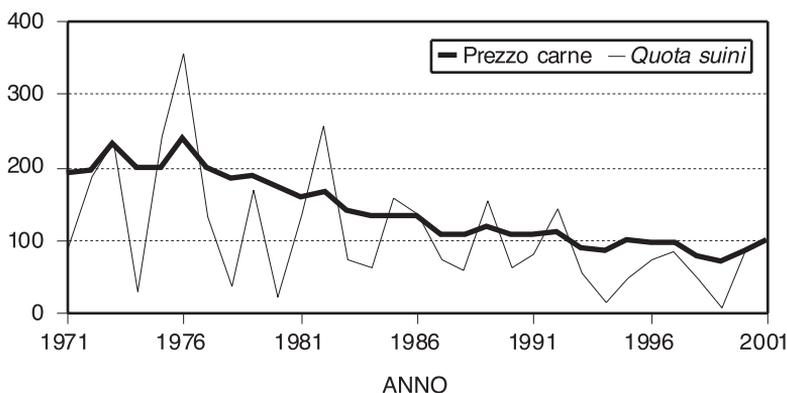
La rivalutazione dei prezzi ha messo in evidenza che il potere di acquisto della lira era 13 volte superiore nel 1971 rispetto a quello del 2001. Pertanto anche il prezzo di trasformazione del latte, che a lire correnti ammontava a 10.539 lire il quintale nel 1971, sarebbe pari a 138.088 lire con la rivalutazione, quasi il doppio di quanto hanno effettivamente percepito i soci conferenti nel 2001 (71.850 lire).

Analizzando l'ultimo trentennio osserviamo che gli allevatori sono stati penalizzati dal mercato e dall'inflazione in maniera consistente e progressiva, con particolare intensità negli ultimi anni. La media del periodo porta a quantificare in 142.275 lire il prezzo di trasformazione del latte, a lire costanti, che i soci hanno percepito dal caseificio, di questo importo l'8,6% è rappresentato dalla quota suini (pari ad una media di 12.235 lire il quintale). I prezzi più bassi sono stati quelli realizzati nell'ultimo lustro, in coincidenza con la congiuntura sfavorevole per tutti i formaggi grana, la peggiore e la più lunga nella storia del comparto.

In realtà l'apporto della *quota suini* ha subito forti oscillazioni nel periodo, rimanendo comunque positiva anche nelle annate peggiori, quando si è scesi sotto

l'1% (1999). Le fluttuazioni non sono da imputare a carenza nella gestione dell'allevamento, quanto alle oscillazioni dei prezzi di mercato dei suini pesanti, caratterizzati da fluttuazioni cicliche che si sono ripercosse sui ricavi della carne e quindi sull'utile dell'allevamento.

Graf. 2 - Dinamica del prezzo della carne suina e della *quota suini* (variazioni % posto il 2001 pari a 100)



L'andamento dei prezzi dei suini pesanti (160/180 Kg) rilevato dalla Borsa merci della CCIAA di Mantova, la più importante in Italia per il mercato dei suini, conferma l'analisi precedente. È stato possibile risalire alla serie storica dei prezzi ad iniziare dal 1966. Negli anni precedenti i dati non erano omogenei perché era diverso il peso medio di riferimento dei suini.

Nel corso degli ultimi 35 anni il prezzo di mercato dei suini ha subito notevoli oscillazioni, che noi abbiamo esaminato a lire costanti per consentire dei confronti omogenei. Il potere d'acquisto della lira era di 15 volte superiore nel 1966 rispetto al 2001. Ciò significa che il prezzo dei suini pesanti a lire costanti era di 6.902 lire nel 1966, a fronte delle 2.966 lire realizzate sul mercato di Mantova nel 2001, meno della metà, a conferma che anche per la carne suina il mercato e l'inflazione sono stati penalizzanti per gli allevatori. In ogni caso facendo la media del periodo 1971-2001 otteniamo un prezzo medio dei suini pesanti di 4.153 lire il chilogrammo.

I prezzi dei suini sono andati progressivamente diminuendo, sia pure con fasi alterne, a motivo della ciclicità di questo mercato, con un minimo nel 1999 con 2.145 lire il chilogrammo. Le migliori performance di mercato si trovano, come era prevedibile, all'inizio del periodo, con un massimo di 7.069 lire nel 1976 ed un altro picco nel 1966 con 6.903 lire il chilogrammo.

Le oscillazioni cicliche dei prezzi dei suini, circa triennali, si traducono in analoghe oscillazioni cicliche della *quota suini*. Il profitto della gestione suini, cioè la differenza tra il prezzo di mercato e il costo di produzione della carne, è infatti quello che porta alla determinazione della *quota suini*. Tenuto conto che il costo di produzione dei suini non subisce eccessive oscillazioni a fronte delle oscillazioni dei prezzi della carne, se ne deduce che le variazioni della *quota suini* è strettamente correlata

alle variazioni del prezzo di mercato della carne. Infatti le variazioni di prezzo della carne hanno un effetto moltiplicatore sulla *quota suini*. Se per ipotesi il prezzo della carne dei suini nel 2001 fosse stato superiore del 10% a quello realizzato, l'utile netto della gestione suini sarebbe aumentato del 41%.

In ogni caso, i risultati di bilancio hanno confermato che nel periodo esaminato l'allevamento suino è sempre stato in grado di assicurare dei profitti positivi al caseificio e quindi di consentire un incremento del prezzo di trasformazione del latte. In queste condizioni di forte concorrenza mercantile gli allevatori si sono dovuti attivare per non essere emarginati, adottando il meglio delle nuove tecnologie e migliorando l'efficienza di gestione aziendale con un management di elevata professionalità.

Nel caso del nostro allevamento i risultati economici confermano il grado di efficienza raggiunto, testimoniato da un profitto positivo che rappresenta il 25% del prezzo di mercato della carne nel 2001. Giocano a favore di questo risultato, oltre alla professionalità del management, anche l'aver puntato sulle economie di scala, che consentono un abbassamento dei costi di produzione, e le nuove tecnologie impiegate che consentono di ridurre il fabbisogno di lavoro e di migliorare l'indice di conversione degli alimenti. Il tutto in condizioni di massima igiene e salubrità degli animali, condizione indispensabile per consentire agli animali stessi di esprimere tutta la loro potenzialità produttiva.

Tali condizioni sono comuni ad altri allevamenti della provincia di Mantova, dove la suinicoltura ha avuto i maggiori sviluppi negli ultimi decenni. Basti ricordare che il numero dei suini è passato da 374 mila capi del 1970 ad oltre un milione nel 2000, con un incremento di tre volte. Nel contempo il numero degli allevamenti suini si è ridotto del 90%, passando da 6.420 aziende del 1970 a sole 701 nel 2000. Tale processo evolutivo ha portato ad una forte crescita della dimensione media degli allevamenti, che è passata da 58 capi a ben 1.494 capi in trent'anni, ventisei volte superiore.

Si ricorda che la provincia di Mantova è la seconda provincia per importanza nel patrimonio suinicolo in Lombardia e a livello nazionale, dopo la provincia di Brescia. La crescita del numero dei capi allevati, a fronte di una contrazione del numero degli allevamenti, ha ampliato notevolmente la dimensione media delle mandrie. Sono le strategie di sviluppo delle imprese volte alla riduzione dei costi di produzione, grazie ai benefici effetti delle economie di scala.

Solo in questo modo gli allevamenti hanno potuto far fronte ad una riduzione dei prezzi della carne. Grazie all'efficienza economica degli allevamenti è stato possibile assicurare margini di profitto agli allevatori, con un differenziale positivo sul punto di break even, punto nel quale il costo di produzione eguaglia il prezzo.

3.4 I riflessi economici sulla gestione delle aziende lattifere

Alcune attività di trasformazione delle produzioni agricole, si ripete, sono uscite da tempo dall'azienda agraria. Nel caso dei caseifici sociali si mantiene ancora forte la connessione tra le attività, perché i risultati economici del caseificio sociale si trasferiscono sul bilancio economico delle aziende aderenti, o viceversa, i risultati eco-

nomici delle aziende da latte sono strettamente correlati ai risultati economici del caseificio.

La presenza nel caseificio dell'allevamento suino contribuisce a valorizzare, oltre al latte, anche un prodotto di risulta, il siero di latte, accrescendo così il valore aggiunto complessivo della trasformazione.

Non tutti i caseifici dispongono però dell'allevamento suino. In questi ultimi anni abbiamo assistito al ritiro di questa attività da parte dei caseifici più piccoli, in cui la scarsa disponibilità di siero porta ad una riduzione della dimensione dell'allevamento suino. In tali condizioni l'allevamento non è in grado di far fronte all'onere dei costi fissi, in particolare di quelli relativi all'adeguamento delle strutture per lo smaltimento dei reflui, secondo le recenti e più severe normative ambientali.

Il panorama che si viene a delineare è quello della presenza sempre più diffusa di caseifici che si ritirano dalla suinicoltura, in particolare quelli di dimensioni più ridotte e nei territori nei quali le normative ambientali sono più restrittive, mentre altri caseifici cercano di ampliare la dimensione dell'allevamento suino per abbassare i costi fissi per l'adeguamento ambientale.

In particolare la prima condizione è tipica dell'area del Consorzio del formaggio Parmigiano-Reggiano, mentre la seconda è più diffusa in quella del Grana Padano, in relazione alle diverse tipologie dei caseifici presenti. Infatti, il latte lavorato dai caseifici ricadenti nella prima area è in media di 29 mila quintali, mentre in quelli della seconda area è di 114 mila quintali, quattro volte superiore.

Ne consegue che i benefici economici dell'allevamento suino interessano solamente una parte delle aziende lattifere, quelle aderenti ai caseifici sociali che hanno mantenuto ed ampliato l'allevamento suino.

Con riferimento alle aziende lattifere aderenti al caseificio in esame, abbiamo cercato di quantificare le variazioni del reddito aziendale in conseguenza dei risultati economici dell'allevamento suino. Le aziende associate al caseificio conferiscono mediamente 7.100 quintali di latte all'anno. Nel 2001 il prezzo di trasformazione del latte liquidato dal caseificio ai soci conferenti è stato di 71.850 lire il quintale, per un valore complessivo di 510 milioni di lire, dei quali il 13% legato ai suini per un importo di quasi 69 milioni di lire. In assenza dell'allevamento suino il valore della produzione di latte scenderebbe a 441 milioni di lire.

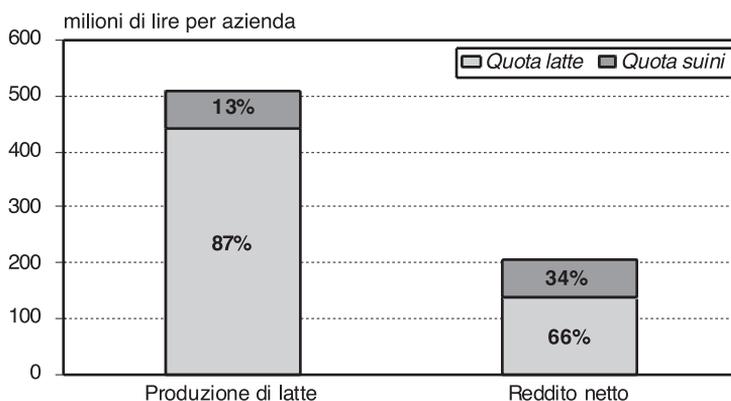
Sulla base dei risultati contabili di un gruppo di allevamenti da latte elaborati nel 2001 dal nostro Laboratorio di gestione e contabilità agraria, con caratteristiche analoghe agli allevamenti aderenti al caseificio, possiamo risalire alla struttura del bilancio economico sino ad arrivare al reddito netto.

Mediamente il reddito netto degli allevamenti del gruppo rappresenta il 40% del valore della produzione del latte. Applicando tale indice agli allevamenti aderenti al caseificio si otterrebbe un reddito netto aziendale di 204 milioni di lire. Pertanto la *quota suini*, calcolata in 69 milioni di lire, inciderebbe per il 34% sul reddito netto, un peso decisamente superiore a quello dell'incidenza sulla produzione di latte, che era del 13%. Senza la *quota suini* il reddito scenderebbe a 135 milioni di lire, un terzo in meno.

In effetti l'utile della *quota suini* si trasferisce tal quale dalla produzione al reddito, non avendo l'azienda lattifera alcun onere da sostenere per i suini, diversa-

mente da quanto avviene per la produzione del latte, i cui costi gravano interamente sull'azienda. Nel caso in cui la *quota suini* rappresenti una perdita, questa andrebbe ad abbassare il prezzo del latte corrisposto dal caseificio, con una riduzione dei ricavi aziendali e quindi del reddito netto.

Graf. 3 - Apporto della *quota suini* sulla produzione di latte e sul reddito netto



La presenza dell'allevamento suino annesso al caseificio sociale condiziona quindi pesantemente il reddito netto delle aziende aderenti e può rappresentare la chiave di lettura sulla resistenza degli allevatori alla continuazione dell'attività in periodi di congiuntura mercantile sfavorevole per i prodotti lattiero caseari.

Pertanto stiamo assistendo al formarsi di un dualismo aziendale nel comparto lattiero caseario. I piccoli allevamenti da latte sono generalmente associati a piccoli caseifici che non hanno l'allevamento suino. I grandi allevamenti da latte aderiscono a grossi caseifici con annesso l'allevamento suino.

I primi allevatori si trovano di fronte a tre condizioni decisamente sfavorevoli:

- la ridotta dimensione dell'allevamento bovino non consente di abbassare i costi di produzione del latte oltre certi limiti;
- la stessa condizione si ripete per i piccoli caseifici che non riescono a contrarre i costi di trasformazione del latte;
- la mancanza in questi caseifici dell'allevamento suino esclude la possibilità di godere della *quota suini* nel prezzo di trasformazione del latte.

Questa triplice penalizzazione per gli allevatori è motivo di disagio economico e di difficoltà nel competere sul mercato e può portare alla precarietà aziendale con il rischio della chiusura degli allevamenti da latte.

I secondi allevatori si trovano nella situazione opposta: il circolo virtuoso dei grossi allevamenti bovini, con caseifici più grandi e con annesso l'allevamento suino, consente loro di migliorare le performance economiche e alle aziende lattifere di ottenere redditi soddisfacenti e in grado di assicurare prospettive di sviluppo all'impresa.

4. Conclusioni

L'allevamento suino annesso ai caseifici sociali riveste un ruolo molto importante nel sostenere il reddito delle aziende lattifere. Lo testimoniano i risultati ottenuti dalla ricerca condotta in un caseificio sociale della provincia di Mantova, nella quale è stato quantificato nel 13% l'apporto della *quota suini* sul prezzo di trasformazione del latte nel 2001. L'analisi è stata estesa anche alla serie storica degli ultimi trent'anni ottenendo un'incidenza media della *quota suini* del 8,6% sul prezzo di trasformazione del latte che la cooperativa ha corrisposto ai soci nel periodo.

Dai risultati dell'indagine si è cercato di quantificare anche i riflessi economici dell'allevamento suino sulla gestione delle aziende lattifere. Se a livello di produzione aziendale l'apporto della quota suini è analoga a quella sul prezzo di trasformazione del latte (13%), non altrettanto si può dire della sua incidenza sul reddito netto aziendale. Infatti la *quota suini* sul reddito netto si porta al 34%, per un effetto moltiplicatore, condizionando fortemente i risultati economici del bilancio aziendale.

I caseifici con l'allevamento suino hanno il vantaggio di accrescere il prezzo del latte liquidato ai soci in relazione agli utili ottenuti nella gestione suini. Ciò rappresenta una quota significativa del prezzo di trasformazione del latte, che si traduce in una crescita più che proporzionale del reddito netto delle aziende zootecniche.

Nella provincia di Mantova, caratterizzata da una forte concentrazione di capi suini, la seconda in Lombardia e in Italia dopo la provincia di Brescia, è diffusa la presenza dell'allevamento suino annesso al caseificio, grazie alle capacità di trasformazione che si colloca su una media di 173 mila quintali di latte lavorato, il 52% superiore alla media dei caseifici dell'area del Grana Padano (113 mila quintali) e sei volte superiore a quelli del Parmigiano Reggiano (29 mila quintali). Ciò prefigura un diverso assetto futuro della zootecnia da latte in relazione a quella dei caseifici.

Negli ultimi trent'anni la dimensione media degli allevamenti suini in provincia di Mantova è passata da 58 capi del 1970 a ben 1.494 capi del 2000, superiore di ventisei volte la consistenza iniziale. I processi di sviluppo del comparto suino hanno portato alla nascita di strutture industrializzate in grado di affrontare il mercato e sufficientemente grandi e specializzate per contenere significativamente i costi di produzione. Le strategie d'impresa volte alla riduzione dei costi di produzione tramite le economie di scala sono quelle in grado di contrastare la riduzione dei prezzi di mercato.

La latteria presa in esame è una tipica cooperativa sociale presente sul territorio mantovano nella zona di produzione del Grana Padano, ha dimensioni medio-grandi ed è stata in grado di fornire buoni risultati per quanto riguarda sia il caseificio che l'allevamento suino. Lo confermano i cospicui investimenti di capitali per la ristrutturazione degli impianti, allo scopo di adeguarli alle più moderne e avanzate soluzioni tecnologiche.

Tali interventi hanno riguardato anche l'allevamento suino e rappresentano un chiaro segno di fiducia verso un settore in rapida evoluzione, considerando che in trent'anni, dal 1971 al 2001, la *quota suini* ha inciso mediamente per l'8,6% sul prezzo di trasformazione del latte pagato dal caseificio sociale agli allevatori conferenti: quota di tutto rilievo per l'entità dell'incidenza e la continuità del beneficio. Gli im-

prenditori sono disposti ad ingenti investimenti se ciò consente di migliorare l'incidenza della *quota suini* sul prezzo di trasformazione del latte.

L'allevamento suino in provincia di Mantova ha fornito negli ultimi anni buoni risultati, con uno sviluppo notevole in termini sia strutturali che economici, grazie ad un substrato socio-economico in grado di accettare e valorizzare tale attività, portandola da attività marginale ad una attività significativa per numerose aziende. La nascita in pochi decenni di allevamenti industrializzati con migliaia di capi dediti esclusivamente alla suinicoltura e di numerosi altri allevamenti presenti all'interno dei caseifici sociali, anch'essi specializzati, ha consolidato l'economia legata al settore suinicolo; per nulla trascurabile è, inoltre, l'indotto legato a detto comparto.

La moderna suinicoltura necessita di strutture adeguate e di una rete commerciale che sappia rispondere alle esigenze del mercato e delle imprese: per questo gli allevamenti si sono dotati di sistemi informatizzati per la gestione dei dati e delle varie fasi del ciclo produttivo e riproduttivo. Queste caratteristiche fanno sì che tale attività non sia statica ma dinamica e proiettata verso il futuro, in perenne ricerca di nuove e migliori soluzioni in grado di far aumentare, o quanto meno preservare, gli utili degli allevatori.

La suinicoltura del futuro è decisamente rivolta ad una sempre più spiccata specializzazione. Il mercato, dal canto suo, esaspera tale evoluzione con la concorrenza determinante della riduzione dei prezzi in Italia, ma anche negli altri paesi europei ed extraeuropei.

Gli allevatori rispondono agli stimoli del mercato con una riduzione dei costi di produzione, ottenuta seguendo una spiccata economia di scala e aumentando la dimensione delle proprie aziende, con conseguente scomparsa dei piccoli allevamenti, non più in grado di essere competitivi sul mercato italiano ed europeo.

Riveste inoltre crescente importanza la fase mercantile che i produttori cercano di tenere sotto controllo attraverso una integrazione di filiera *latte-suino* che si è concretizzata nella nascita del Consorzio Latterie Sociali Mantovane (CLSM), cooperativa di secondo grado per la commercializzazione dei prodotti, che si avvale del marchio *Virgilio*. Il controllo di filiera è la strategia vincente che consente di acquisire gli utili di tutte le fasi del canale distributivo a favore dei produttori agricoli.

Dalle rilevazioni aziendali abbiamo ottenuto una conferma delle tendenze in atto nella suinicoltura mantovana: infatti gli allevatori continuano ad investire in questo comparto in costante crescita ed evoluzione. La suinicoltura, inoltre, si presta particolarmente all'industrializzazione dei processi produttivi.

La tendenza diffusa alla modernizzazione degli allevamenti, riscontrata anche nel caseificio preso in esame, proietta l'allevamento suino del mantovano nel *Mercato Globale*, fornendo ampi margini di crescita economica che si tradurranno in maggiori utili anche per gli allevamenti bovini da latte.

Parole chiave: suino, caseificio, allevamento lattifero, economia.

Key words: pork, cheese factory, milk farming, economy.

Mots-clés : porcin, fromagerie, élevage laitier, économie.

RIASSUNTO – Dalla trasformazione lattiero-casearia residuano elevati quantitativi

di siero. I caseifici hanno risolto il problema dello smaltimento con l'introduzione dell'allevamento suino.

I risultati economici dell'allevamento suino si riflettono sul prezzo di trasformazione del latte che il caseificio sociale paga ai soci conferenti.

L'indagine ha quantificato l'entità della quota del prezzo di trasformazione del latte attribuibile all'allevamento suino.

I risultati della ricerca confermano l'importanza dell'allevamento suino annesso al caseificio sociale nel sostenere il prezzo di trasformazione del latte, con una quota del 13% nel 2001 ed una media dell'8,6% negli ultimi trent'anni, e nel migliorare i risultati economici delle aziende lattifere associate, dove un terzo del reddito è legato ai risultati economici dell'allevamento suino.

SUMMARY – *The pig farm annexed to the social cheese factory: economic repercussions for the milk industry.*

Whey is produced in high quantities as a waste product of cheese production. Cheese factories have solved the problem of disposing of the whey through the introduction of pig farming.

The economic results of the pig farms are reflected in the price of milk processing paid by the cheese factory cooperative to its associates.

This study has quantified the quota of the price of milk processing that can be attributed to the pig farm.

The results of the research confirm the importance of pig farms annexed to cheese factories in supporting the price of milk processing, with a quota of 13% in 2001 against an average of 8.6% over the past thirty years, and in improving the economic results of the associated milk processing companies, where one third of the income is linked to the economic results of the pig farm.

RÉSUMÉ – *L'élevage porcin jumelé à la fromagerie sociale : les retombées économiques sur les exploitations laitières.*

La transformation du lait et du fromage produit de grosses quantités de lactosérum (petit-lait) résiduel. Les fromageries ont résolu le problème de son élimination grâce à l'élevage porcin.

Les résultats économiques de l'élevage porcin se répercutent sur le prix de la transformation du lait que la fromagerie sociale paie à ses membres.

Cette enquête a permis de quantifier quelle part du prix de la transformation du lait revient à l'élevage porcin.

Les résultats de cette recherche confirment l'importance de l'élevage porcin jumelé à la fromagerie sociale dans le soutien du prix de la transformation du lait - avec une part de 13% en 2001 et une moyenne de 8,6% ces trente dernières années - et dans l'amélioration des résultats économiques des activités laitières associées - dont un tiers du revenu est lié aux résultats économiques de l'élevage porcin.

Bibliografia

1) A.A.V.V. (2002). I quaderni della "RICA Italia" Lombardia 1994-1997, strutture e redditi delle aziende agricole. INEA.

- 2) ARFINI F.; MORA C. (1992). La cooperazione nel settore lattiero caseario. Giuffré, Milano.
- 3) AMADEI G. (1982). Lo sviluppo delle cooperative lattiero-casearie. *I Quaderni dell'INECOOP*.
- 4) BENINCA' M., DILETTA G., FURLANI A., MARI F., RINALDI A. (2002). Osservatorio tematico sulla innovazione e sostenibilità in agricoltura, Mantova, report 2001-2002. Provincia di Mantova, Cciaa di Mantova, INEA, Banca Agricola Mantovana.
- 5) BERNABE' D., CARDINI C., IACOVELLI A., LUGARESI D. (1994). Il sistema Agroalimentare nella Padania: i servizi per lo sviluppo. F. Angeli, Milano.
- 6) CASTELLI M. (1996). Il sistema della trasformazione lattiero casearia in forma cooperativa nel mantovano (rapporto conclusivo al piano territoriale di coordinamento provinciale). Provincia di Mantova.
- 7) CATTAFESTA M. (2001). La storia di Mantova. La Gazzetta di Mantova.
- 8) COLLI A., STUPAZZONI G. (1980). Il caseificio cooperativo. Edagricole.
- 9) FANIN E., ROMANI M. A. (2001). "Nel solco della terra le radici dello sviluppo": il sistema agro-zootecnico-alimentare a Mantova 1860-2000. Marsilio.
- 10) FERRI G., IOTTI M. (2001). Pianificazione e controllo nelle aziende agro-alimentari: il caseificio cooperativo. In *Economia Agro-Alimentare*, SIEA, n. 3. Franco Angeli.
- 11) GIACOMINI C. (1997). Cooperative e associazione produttori, adattarsi per sopravvivere. In *Terra e Vita*, n. 2.
- 12) GORNI S. (1997). Il settore agroalimentare mantovano: struttura e dinamica aziendale. In "*Quaderni dell'economia provinciale. Gli anni novanta: dall'agricoltura all'agroalimentare nella provincia Mantovana*".
- 13) GUIZZARI F. (1995). Gli allevamenti e le produzioni zootecniche in provincia di Mantova nel primo secolo dell'Unità d'Italia. In *Mantova* (rivista della Cciaa di Mantova) n. 174-175.
- 14) LECHI F. (2001). L'agricoltura mantovana negli ultimi cinquant'anni. Marsilio.
- 15) SALGHETTIA. (2000). Evoluzione e prospettive delle aziende agricole parmensi tra secondo e terzo millennio. Istituto di Economia Rurale e Zooeconomia, Università degli Studi di Parma.
- 16) ASSOLATTE. Industria lattiero-casearia italiana: rapporto 2002. Editoriale Il Mondo del Latte.
- 17) AUTORITA' DI BACINO DEL FIUME PO (1996). Contenimento dell'inquinamento provocato dagli allevamenti zootecnici nel bacino del fiume Po, deliberazione n. 12/1996. Parma.
- 18) CCIAA DI MANTOVA. Relazioni annuali sull'andamento dell'economia provinciale.
- 19) CONSORZIO DEL FORMAGGIO PARMIGIANO-REGGIANO. Relazione del Presidente del Consorzio del Parmigiano-Reggiano all'Assemblea Generale dei delegati del 2002.
- 20) ISTAT (1999). Le statistiche agrarie verso il 2000. In *Argomenti*, n. 16. Roma.
- 21) ISTAT. Censimenti generali dell'agricoltura, 1961, 1970, 1982, 1990, 2000.

GLI SCAMBI COMMERCIALI TRA ITALIA ED ARGENTINA NEL SETTORE AGROALIMENTARE¹

G. Bonazzi- G. Ferri- M. Iotti- E. Manghi²

1. Introduzione

L'Argentina, con circa 36 milioni di abitanti, è, con riferimento alla popolazione e alla superficie il secondo paese dell'America del Sud dopo il Brasile; la gran parte della popolazione vanta origini europee, in particolare spagnole e italiane.

L'Argentina è compresa tra la Cordigliera delle Ande e l'Oceano Atlantico, e tra il 22° e 55° parallelo; la superficie è 3,76 milioni di Km², compresi i territori rivendicati dell'Antartide, con una densità di popolazione di circa 9,6 abitanti per Km². La popolazione rurale rappresenta circa il 10% del totale, gran parte del territorio è situato nella zona temperata particolarmente vocata allo sviluppo dell'attività agricola. L'Argentina può essere suddivisa in quattro grandi aree geofisiche: le Ande a ovest (aridi bacini, colline coltivate a vigne, montagne glaciali e regione dei laghi), le fertili pianure del nord, le Pampas al centro (una distesa piatta caratterizzata da aree umide e secche) e la Patagonia a sud (steppe a pascolo e aree glaciali). Ventidue parchi nazionali sono stati istituiti per proteggere questo ambiente così vasto e diversificato che ospita specie uniche al mondo di flora e fauna. Il maggior fiume è il Paraná che con il suo principale affluente, il Paraguay, forma una grande arteria per la navigazione fluviale. Importanti pure il Pilcomayo e l'Uruguay che forma con il Paraná il grande estuario del Río de la Plata. Il clima argentino varia molto a seconda della latitudine, passa da climi sub tropicali nel nord del paese, a climi antartici nel sud patagonico.

L'Argentina si caratterizza per la ricchezza di risorse naturali, petrolio, metalli e gas naturale, che ne fanno un grande produttore ed esportatore di materie prime, ma sono soprattutto i grandi spazi agricoli, con le produzioni vegetali e zootecniche, a caratterizzare l'economia argentina, dando un particolare rilievo al settore primario e alle produzioni agroalimentari del sistema economico nazionale. Infatti, soia, frumento e mais, tra le produzioni vegetali, e carne bovina, tra le produzioni zootecniche, rappresentano voci importanti tra le esportazioni, caratterizzando l'Argentina come esportatore di prodotti agricoli e loro derivati. L'interscambio commerciale argentino è molto intenso con i paesi del Sud America, in particolare con Brasile e Cile e anche con gli Stati Uniti e con i paesi dell'Unione Europea.

L'Argentina dal 1991 fa parte del Mercato comune del Cono Sud (Mercosur), unitamente a Brasile, Uruguay e Paraguay, la nascita del Mercosur, sancisce la libera

¹ Lo studio è frutto di un lavoro comune dei quattro autori. Tuttavia in sede di stesura del testo Giuseppe Bonazzi ha redatto i paragrafi 1, 4, 5, Giovanni Ferri ha redatto il paragrafo 2, Mattia Iotti il paragrafo 3 e Elisa Manghi il paragrafo 2.1.

² Sezione Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

circolazione di beni, servizi e fattori produttivi fra i paesi del Sud America aderenti all'unione commerciale.

Tra i paesi europei, un ruolo di partner commerciale privilegiato spetta all'Italia che, sulla base delle statistiche del commercio estero, insieme a Spagna e Germania, mostra i più elevati livelli di interscambio commerciale con l'Argentina, tanto nei flussi di importazioni, quanto nei flussi di esportazioni.

Le motivazioni dei rapporti commerciali tra Italia e Argentina sono da ricercare anche nella storia dei due paesi. A tal riguardo si può notare come la presenza italiana in Argentina risale al XVIII secolo, grazie ad un importante flusso migratorio verso il paese sudamericano, che si è intensificato nel corso dell'ottocento e del novecento, negli ultimi 150 anni circa tre milioni e mezzo di italiani hanno attraversato l'Oceano Atlantico in cerca di migliori condizioni di vita e, oggi, circa la metà della popolazione argentina vanta ascendenti italiani.

Nel contesto delle opportunità di sviluppo delle relazioni commerciali tra i due paesi, bisogna tuttavia considerare le dinamiche congiunturali che hanno interessato l'economia argentina negli ultimi anni. Il 2002 ha segnato il culmine della crisi economica più grave della storia contemporanea della Repubblica Argentina, nel periodo 1998/2002 il prodotto interno lordo ha fatto segnare una contrazione del 18,4% in termini reali, una lieve ripresa dell'economia si è avuta nel corso del 2003. In tale contesto, le note che seguono si pongono l'obiettivo di analizzare le dinamiche di interscambio commerciale tra Italia ed Argentina, con particolare riferimento ai prodotti agroalimentari e alle ipotesi di sviluppo dell'interscambio commerciale tra i due paesi.

2. L'agroalimentare argentino

Agricoltura e allevamento, grazie alle abbondanti risorse naturali, rappresentano una grande ricchezza dell'economia argentina. L'Argentina è una delle prime nazioni al mondo per la produzione di soia, cereali e bestiame bovino, a cui sono legate le conseguenti attività di trasformazione.

Di seguito si indicano alcuni dati delle produzioni argentine riferiti al 2000. La soia è coltivata su una superficie di 11.405.200 ettari, il frumento su 6.840.700 ettari, il mais su 2.434.000 ettari e il girasole su 2.014.900 ettari, con rispettivamente produzioni di 30.000.000 tonnellate per la soia, 15.291.700 tonnellate per il frumento, 14.710.000 tonnellate per il mais e 3.843.600 tonnellate per il girasole. Il settore delle oleaginose è molto importante in Argentina; oltre alla coltivazione di soia, girasole, lino, cotone e in minore quantità di colza, è fiorente l'attività di trasformazione per l'ottenimento di oli. L'Argentina è il principale esportatore mondiale di olio di soia e di girasole ed anche di farina di soia e girasole. Le filiere di soia e girasole costituiscono da sole il 95% dell'intera produzione di oleaginose, soprattutto la soia che ha una superficie investita cinque volte superiore a quella destinata a girasole. Diffusa ed in espansione è anche la coltivazione dell'ulivo che punta anch'essa ad una sempre maggiore differenziazione della produzione.

Grande importanza hanno anche alcune colture industriali come la canna da zucchero e il tabacco. La produzione di zucchero è assicurata dalle colture di barba-

bietole del Rio Negro e dalla canna da zucchero della provincia di Tucuman. Nei pressi della capitale si è inoltre sviluppata una fascia di colture ortofrutticole; frutteti sono sorti sulle terre irrigate intorno a Córdoba e nelle oasi situate ai piedi delle Ande. Si hanno produzioni di 1.033.500 tonnellate di mele, 1.020.900 tonnellate di limoni, 983.800 tonnellate di arance, 537.500 tonnellate di pere e 257.500 tonnellate di pesche.

La coltura della vite si estende su una superficie di 205 mila ettari (10° paese per superficie vitata al mondo) e si concentra soprattutto a Mendoza. La produzione di uva è di 24.599.000 quintali, pari al 4% della produzione mondiale, mentre per quanto riguarda la trasformazione in vino, se ne ottengono 15.800.000 ettolitri (5° Paese per produzione di vino al mondo), preceduto solo da Francia, Italia, Spagna e Stati Uniti. Negli ultimi anni, i vini argentini stanno guadagnando sempre più il mercato estero. Tra il 1995 e il 2000 gli investimenti nazionali ed esteri hanno superato gli 800 milioni di dollari e nel solo anno 2000 si sono registrati investimenti per oltre 300 milioni di dollari. Il settore vitivinicolo è, dopo quello minerario, il settore che ha ricevuto i più massicci investimenti esteri, ottenendo nel giro di un decennio un cambiamento radicale della propria immagine e riuscendo ad imporre il proprio prodotto a livello internazionale. Indubbiamente è uno dei settori che ha risentito di meno della crisi argentina e che anzi ha beneficiato dalla nuova relazione di cambio, migliorando la propria competitività.

Le attività zootecniche sono incentrate sull'allevamento bovino (48.851.400 capi), seguono l'allevamento ovino (13.561.600 capi), l'allevamento caprino (3.386.600 capi) e l'allevamento suino (2.271.700 capi). L'allevamento ovino è prevalente in Patagonia, con una produzione di lana di 65.000 tonnellate, mentre nel resto del Paese predomina l'allevamento bovino.

L'allevamento bovino è per l'85% concentrato nella parte nord di Santa Fe che appartiene al Nord Est Argentino e nella parte Sud della regione Pampeana. La Pampa, una sterminata pianura fertile piatta, spezzata occasionalmente da verdeggianti colline ricoperte da foreste, immense praterie e laghi salati, rappresenta una delle più grandi pianure fertili del mondo; oltre ad essere la sede ideale dell'allevamento bovino, grazie a tre fattori che si coniugano in modo straordinario: temperatura, umidità e ricchezza del suolo, è anche la sede dell'enorme produzione agricola di soia, frumento, mais, girasole, orzo, avena e segale.

Della totalità dei bovini allevati in Argentina circa il 70% è rappresentato da razze che producono carne; in particolare Aberdeen Angus, Hereford e Shorthorn; la principale razza che produce latte è invece la Jersey.

In Argentina si ha una produzione di 9.500.000 tonnellate di latte (11° paese produttore di latte nel mondo). La produzione casearia è sviluppata soprattutto a Santa Fe, a Córdoba e a Buenos Aires. Córdoba e Santa Fe producono prevalentemente latte per l'industria (formaggio, burro e latte in polvere), mentre Buenos Aires produce principalmente latte fresco. L'Argentina esporta 191.300 tonnellate di prodotti lattiero-caseari all'anno per un valore totale di 288 milioni di dollari, i principali paesi destinatari sono Brasile, Stati Uniti e Messico. Nel settore lattiero-caseario quattro sono le grandi aziende industriali, a queste si affiancano produttori di più piccole dimensioni indirizzati verso produzioni differenziate.

La pesca, che offre grandi potenzialità, non è ancora pienamente sfruttata, nonostante la crescita costante che ha avuto negli anni Settanta e Ottanta. Tra le specie più pescate ci sono le acciughe e il nasello.

L'industria argentina, estremamente diversificata, si è sviluppata in maniera significativa nell'area intorno a Buenos Aires e lungo il corso del fiume Paraná. Il 20% della forza lavoro nazionale è occupato nell'industria manifatturiera, concentrata soprattutto attorno alla capitale, ove risiede circa il 40% della popolazione argentina. La principale e più antica industria del paese è quella agroalimentare. Seconda per importanza è l'industria tessile. Altri settori trainanti sono quelli della gomma, del cemento, dei prodotti chimici, della carta, della plastica e dei prodotti petroliferi. L'industria siderurgica è in espansione.

2.1. Il comparto carne bovina

Nel 2002 la produzione mondiale di carne è stata di quasi 245 milioni di tonnellate di cui il 25% è rappresentato da carne bovina, pari a 57.771.000 tonnellate. L'Argentina è il 5° produttore mondiale di carne bovina, con 2.740.000 tonnellate, preceduta da USA (12.424.000 tonnellate), UE (7.538.000 tonnellate, di cui 1.640.500 tonnellate italiane), Brasile (7.050.000 tonnellate) e Cina (5.230.000 tonnellate). Il maggior esportatore di carne sul mercato mondiale è l'Australia che detiene una quota del 32%, seguono USA con il 25%, l'Ue con il 16%, la Nuova Zelanda con il 14% e l'Argentina con il 13%.

In Argentina attualmente, la domanda del mercato interno di carne bovina copre l'80-85%, con un consumo pro capite annuo di 62 Kg per abitante e un mercato di esportazione di 470.000 tonnellate all'anno. Nel mercato interno la carne si commercializza fundamentalmente senza alcun processo di elaborazione, l'83% degli animali arrivano infatti alla macelleria o ai supermercati come mezzene, solo dopo vengono fatti i tagli. Il prezzo al Kg dell'animale vivo dal 1996 al 2002 è oscillato tra 0,812 e 1,350 Pesos, mentre il prezzo al Kg della carne al consumatore tra 3,823 e 4,900 Pesos.

Tab. n. 1- Prezzo al Kg dell'animale vivo e della carne dal 1996 al 2002 in Pesos

<i>Anno</i>	<i>Prezzo al Kg animale vivo</i>	<i>Prezzo al Kg carne al consumatore</i>
1996	0,812	3,823
1998	1,056	4,647
2000	0,7	4,35
2001	1,35	4,3
2002	1,35	4,9

Fonte: E. Gay, Carne Argentina

Nel territorio argentino sono presenti 390 stabilimenti di macellazione, 37 dei quali commerciano con l'estero, di questi 37 cinque sono situati a Santa Fe e commerciano il 52% dell'intera quota esportata.

Il settore esportazione carne argentina negli ultimi anni ha avuto una con-

giuntura sfavorevole legata alla situazione economica e alle politiche interne, ed anche al protezionismo commerciale europeo e ai problemi sanitari (afta epizootica).

L'epidemia di afta che ha interessato l'Argentina, attualmente superata, ha portato, in passato, alla sospensione delle importazioni di carne da parte dell'Unione Europea. La BSE che ha interessato l'Ue a partire dalla seconda metà degli anni novanta non ha invece riguardato l'Argentina.

Attualmente l'Ue ha istituito numerosi interventi mirati al controllo e al miglioramento delle condizioni di salute degli animali negli allevamenti, alla rintracciabilità dei capi e all'etichettatura dei prodotti a base di carne bovina. Nel 1997 è stato introdotto un sistema di identificazione e di etichettatura dei capi (Reg. 820/97), che ha come obiettivo la riconoscibilità degli animali allevati e macellati e la tracciabilità del prodotto finale. Inoltre, a partire dal 1998, tutti gli animali devono essere identificati mediante apposita targhetta applicata all'orecchio dell'animale. Questo è ciò che è stato fatto in Europa, ma è necessario che venga attuato anche dai produttori di carne argentina e da tutti coloro che partecipano alla filiera della carne se si vuole potenziare l'esportazione in Europa.

Per il consumatore europeo la carne argentina rappresenta, infatti, un prodotto di alta qualità. Ampi spazi verdi, un vasto territorio, un terreno di una ricchezza straordinaria e un clima mite rappresentano l'habitat ideale per l'allevamento del bestiame bovino, che è alimentato al pascolo durante tutto l'anno. Tutto ciò ha reso la carne argentina un prodotto apprezzato in tutto il mondo.

L'Argentina deve lavorare quindi sulla sicurezza e sulla tracciabilità della filiera produttiva, secondo i criteri della normativa europea. Quello che gli europei chiedono è sapere cosa l'animale ha mangiato, i farmaci usati, quali controlli sanitari e chimici sono stati fatti sulla carne o sugli animali; la certificazione di qualità è una condizione essenziale per accedere in Europa. Qualcosa si sta muovendo anche grazie ad Associazioni per la tutela delle razze. L'Associazione Argentina Angus esporta carne con i marchi "Carne Angus Certificada" e "Argentine Angus Beef Controlled by Argentine Angus Association", l'Associazione argentina di Hereford ha realizzato il programma "Carnes Hereford". Anche il governo di Santa Fe, nel programma sulla qualità per la filiera agroalimentare della carne nella provincia di Santa Fe, ha realizzato il marchio "Carne Argentina de Santa Fe".

Per quanto riguarda le concessioni alle esportazioni dell'Ue relative alla carne bovina, frutto dell'Accordo Gatt, è fissata una quota pari a 58.100 tonnellate il limite massimo di carne di alta qualità che si può importare da Usa e Canada, Argentina, Australia, Brasile, Uruguay e Nuova Zelanda, tutte soggette ad un dazio del 20%. In particolare l'Argentina deve sottostare ad una quota Hilton di esportazione per carne disossata di qualità superiore (tagli di filetto, scamone e roastbeef) di 28.000 tonnellate verso Ue e di 20.000 tonnellate verso Usa, il che rappresenta, senza dubbio, una limitazione per le potenzialità delle esportazioni di carne argentina di elevata qualità. La quota di esportazione della carne tipo Hilton è la maggiore attività dell'industria di macellazione, pari ad un valore di 1.200 milioni di dollari. Per le caratteristiche di particolare pregio dei tagli le quotazioni di una tonnellata Hilton superano di oltre il 50% le quotazioni della carne comune. Attualmente la quota Hilton di esporta-

zione viene ripartita tra le imprese di macellazione con una forte concentrazione; le prime 10 imprese detengono infatti 26.900 tonnellate di quota. In futuro si cercherà di inserire nella ripartizione di tale quota dei criteri di territorialità per garantire una maggiore partecipazione dei produttori alle esportazioni.

Tab. n. 2- Prime 10 imprese di macellazione argentine che detengono la Quota Hilton (Anno 2002)

<i>Imprese</i>	<i>Tonnellate di Quota Hilton</i>
Swift	4.496
Finexcor	4.161
Qiuckfood	3.801
Cepa	2.866
Friar	2.710
Arre Beef	2.298
Gorina	2.125
Estancias del Sur	2.041
Sadowa	1.370
AB&P	1.074
TOTALE	26.942

Fonte: F.Varise, La Nacion

3. Gli scambi commerciali dell'Argentina

La voce di interscambio commerciale ha rappresentato per lungo tempo una voce di rilievo dell'economia argentina. L'Argentina infatti si caratterizza come grande produttore ed esportatore sui mercati internazionali di materie prime e produzioni agricole. Inoltre, l'Argentina è grande importatore di prodotti finiti, di consumo e di investimento, pur con una contrazione delle importazioni negli ultimi anni in considerazione della fase recessiva che ha investito il paese sudamericano.

Analizzando la serie storica 1993/2001 del commercio estero dell'Argentina emerge una dinamica costantemente espansiva delle esportazioni, cui segue una dinamica di segno alterno per le importazioni, a motivo anche delle già citate ragioni congiunturali che hanno interessato l'Argentina negli ultimi anni.

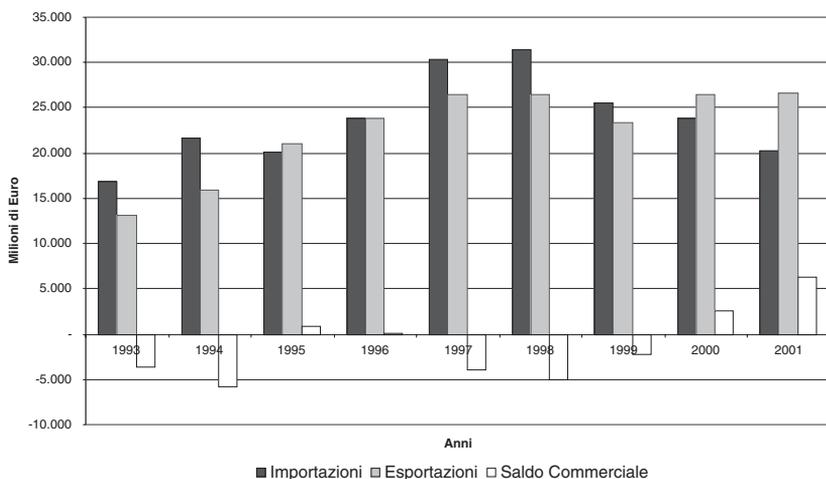
I flussi di export dall'Argentina hanno fatto segnare un notevole incremento negli ultimi dieci anni, passando dai circa 13.118 milioni di Euro del 1993 ai 26.610 milioni di Euro del 2001, con una crescita del 103% circa nell'ultimo decennio (Tabella 3). Dall'analisi della serie storica delle esportazioni in valore, emerge un'espansione dei flussi di export particolarmente accentuata alla metà degli anni novanta, nel periodo 1994/1997, cui segue un periodo di stabilizzazione dei flussi di export, anche in anni recenti e pur in presenza della svalutazione del Peso argentino che avrebbe potuto favorire un incremento dei flussi di export.

Tab. n. 3- Esportazioni dall'Argentina (valori assoluti in mln di euro)

Paesi	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Brasile	2.814	3.655	5.484	6.615	8.133	7.949	5.690	6.991	6.206
Stati Uniti	1.279	1.737	1.803	1.974	2.204	2.212	2.653	3.156	2.900
Cile	592	999	1.475	1.766	1.932	1.857	1.869	2.671	2.852
Cina	163	225	286	607	871	682	508	796	1.123
Spagna	504	592	714	737	623	842	962	915	1.100
Italia	505	654	736	722	730	757	689	732	1.009
Paesi Bassi	1.270	1.180	1.191	1.225	880	1.110	1.022	746	799
Uruguay	512	650	663	725	844	851	819	819	744
Paraguay	358	498	631	584	624	622	563	592	499
Messico	219	274	144	248	216	261	282	326	484
Germania	625	605	650	565	503	564	629	608	464
India	38	52	153	183	209	355	437	442	440
Iran	248	229	510	637	659	476	155	349	418
Corea del Sud	49	49	133	204	201	132	181	165	396
Peru'	222	289	276	254	307	326	213	293	394
MONDO	13.118	15.839	20.963	23.810	26.431	26.434	23.335	26.410	26.610

Fonte: ICE

Graf. n.1- Analisi della dinamica commerciale dell'Argentina 1993/2001



Analizzando la composizione dei flussi commerciali tra Argentina e altri paesi, emerge una notevole concentrazione degli scambi verso alcuni paesi che si qualificano come partner commerciali privilegiati dell'Argentina. Sulla base dei dati di esportazioni argentine in valore percentuale per il periodo 1993/2001 (Tabella 4), suddivise per paese di destinazione dei flussi di merci, emerge che, in tutto il periodo considera-

to, ai primi cinque paesi partner sono stati destinati circa il 50% delle esportazioni totali argentine, dato che sale al 53,3% nel corso del 2001. Nello stesso periodo, i primi 10 paesi partner per flussi di export, hanno concentrato una quota del 65% circa del totale delle esportazioni. Tra i paesi partner, il Brasile si conferma il principale mercato di sbocco per le esportazioni argentine, con una quota di export argentino che oscilla tra il 20% ed il 30% nel periodo considerato, dato che si assesta al 23% circa nel corso del 2001. Importanti mercati di sbocco sono anche gli Stati Uniti, secondo partner dell'Argentina per l'export, con una quota del 10,9% nel corso del 2001, segue il Cile, con una quota del 10,7% circa, sempre nel corso del 2001. Seguono poi Spagna e Cina con quote di circa il 4%. Nel complesso, sulla base delle statistiche del commercio estero emerge che, nel corso del 2001, nell'anno precedente al culmine della recessione argentina, le esportazioni argentine sono state pari a 26.610 milioni di Euro, di cui 1.009 milioni di Euro verso l'Italia, pari al 3,8% circa del totale delle esportazioni. L'Italia rappresenta quindi il sesto mercato di sbocco per le esportazioni argentine, confermando, anche in anni recenti, l'importanza dell'Italia tra i partner commerciali dell'Argentina.

Tab. n. 4 - Esportazioni dall'Argentina (Valori percentuali)

<i>Paesi</i>	<i>1993</i>	<i>1994</i>	<i>1995</i>	<i>1996</i>	<i>1997</i>	<i>1998</i>	<i>1999</i>	<i>2000</i>	<i>2001</i>
Brasile	21,45	23,08	26,16	27,78	30,77	30,07	24,38	26,47	23,32
Stati Uniti	9,75	10,97	8,60	8,29	8,34	8,37	11,37	11,95	10,90
Cile	4,51	6,31	7,04	7,42	7,31	7,03	8,01	10,11	10,72
Cina	1,24	1,42	1,36	2,55	3,30	2,58	2,18	3,01	4,22
Spagna	3,84	3,74	3,41	3,10	2,36	3,19	4,12	3,46	4,13
Italia	3,85	4,13	3,51	3,03	2,76	2,86	2,95	2,77	3,79
Paesi Bassi	9,68	7,45	5,68	5,14	3,33	4,20	4,38	2,82	3,00
Uruguay	3,90	4,10	3,16	3,04	3,19	3,22	3,51	3,10	2,80
Paraguay	2,73	3,14	3,01	2,45	2,36	2,35	2,41	2,24	1,88
Messico	1,67	1,73	0,69	1,04	0,82	0,99	1,21	1,23	1,82
Germania	4,76	3,82	3,10	2,37	1,90	2,13	2,70	2,30	1,74
India	0,29	0,33	0,73	0,77	0,79	1,34	1,87	1,67	1,65
Iran	1,89	1,45	2,43	2,68	2,49	1,80	0,66	1,32	1,57
Corea del Sud	0,37	0,31	0,63	0,86	0,76	0,50	0,78	0,62	1,49
Peru'	1,69	1,82	1,32	1,07	1,16	1,23	0,91	1,11	1,48
MONDO	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Fonte: ICE

Per quanto riguarda la dinamica delle importazioni, i flussi hanno fatto registrare un andamento polinomiale nel periodo 1993/2001, con incremento delle importazioni dai 16.773 milioni di Euro del 1993 agli oltre 31.400 milioni di Euro del 1998 (Tabella 5). L'incremento delle importazioni nel periodo considerato è stato favorito, oltre che dal buon livello di crescita economica che ha interessato l'Argentina nel corso degli anni novanta, anche dalla parità 1 ad 1 tra il Peso argentino ed il Dollaro Usa. La parità Peso/Dollaro, aumentando il potere d'acquisto della moneta argentina

sui mercati internazionali, ha di fatto favorito le importazioni argentine, in considerazione della maggior capacità di acquisto del consumatore argentino di merci di importazione. Alla fine degli anni novanta, in considerazione anche dell'avvio della fase recessiva che ha interessato l'Argentina a partire dal 1998, si registra una contrazione delle importazioni per circa 11.000 milioni di Euro nel triennio 1999/2001, arrivando ad un valore di 20.321 milioni di Euro nel 2001.

Tab. n. 5 - Importazioni dell'Argentina (Valori assoluti in mln di euro)

<i>Paesi</i>	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Brasile	3.569	4.286	4.175	5.327	6.895	7.074	5.599	6.180	5.277
Stati Uniti	3.858	4.929	4.208	4.750	6.085	6.241	4.997	4.546	3.782
Cina	215	218	608	699	1.005	1.170	992	1.061	1.067
Germania	1.023	1.383	1.252	1.428	1.654	1.880	1.411	1.204	1.053
Italia	981	1.431	1.260	1.504	1.736	1.610	1.354	964	910
Giappone	669	619	710	725	1.126	1.456	1.069	954	768
Francia	738	1.073	1.040	1.181	1.372	1.858	1.775	925	738
Spagna	510	865	930	1.065	1.253	1.289	1.000	847	713
Cile	703	829	513	558	683	711	638	570	506
Messico	235	261	376	542	610	604	490	549	437
Corea del Sud	525	503	362	428	640	651	564	494	410
Regno Unito	258	352	413	563	801	799	543	427	406
Uruguay	570	790	288	299	373	531	395	413	329
Paraguay	72	71	139	183	319	349	304	286	303
Canada	87	132	274	276	443	387	291	289	201
MONDO	16.773	21.581	20.122	23.762	30.349	31.441	25.508	23.851	20.321

Fonte: ICE

Dall'analisi delle importazioni argentine in valore percentuale per il periodo 1993/2001, suddivise per paese di origine delle merci (Tabella 6), emerge una notevole concentrazione delle aree di origine dei flussi di importazioni. In tutto il periodo considerato, i primi cinque paesi d'origine delle merci concentrano una quota che oscilla tra il 56% ed il 59% circa del totale delle importazioni, quota che si assesta al 75% circa considerando i primi dieci paesi d'origine dei flussi di importazioni. Anche con riferimento alle importazioni, il Brasile, con una quota tra il 20% ed il 25%, si conferma il principale partner commerciale dell'Argentina. Tra i maggiori partner commerciali si confermano gli Stati Uniti, con una quota sul totale delle importazioni assestata tra il 18% ed il 23%. Seguono poi Cina e Germania con quote di import intorno al 5%, cui segue l'Italia, quinto mercato di origine delle importazioni argentine, con una quota del 4,48%, pari a circa 910 milioni di Euro.

Per quanto riguarda l'analisi della bilancia commerciale argentina, si rileva che questa permane tuttavia negativa per la quasi totalità degli anni novanta, a sottolineare il ruolo della parità Peso/Dollaro quale fattore agevolativo delle importazioni e, di contro, quale fattore penalizzante per i flussi di export. Alla fine degli anni novanta, tuttavia, si registra una progressiva inversione di tendenza nel saldo della bilancia commerciale, con inversione del segno della medesima a partire dal 2000, con

progressiva prevalenza delle esportazioni sulle importazioni (Tabella 7). A tal proposito è da considerare come il cambio di segno della bilancia commerciale sia da ascrivere, in larga misura, ad una contrazione delle importazioni, scese dai circa 30.000 milioni di Euro di fine anni novanta ai circa 20.000 milioni di Euro registrati nel corso del 2001. Alla marcata contrazione delle importazioni si accompagna una sostanziale stabilità dei flussi di export, stabili intorno ai 26.000 milioni di Euro tra fine anni novanta e primi anni del nuovo millennio, con conseguente inversione del segno della bilancia commerciale argentina, che diventa positiva nel corso del 2000, a conferma in ogni caso della vocazione dell'Argentina quale paese esportatore sui mercati internazionali.

Tab. n. 6 - Importazioni dell'Argentina (Valori percentuali)

<i>Paesi/Aree</i>	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Brasile	21,28	19,86	20,75	22,42	22,72	22,50	21,95	25,91	25,97
Stati Uniti	23,00	22,84	20,91	19,99	20,05	19,85	19,59	19,06	18,61
Cina	1,28	1,01	3,02	2,94	3,31	3,72	3,89	4,45	5,25
Germania	6,10	6,41	6,22	6,01	5,45	5,98	5,53	5,05	5,18
Italia	5,85	6,63	6,26	6,33	5,72	5,12	5,31	4,04	4,48
Giappone	3,99	2,87	3,53	3,05	3,71	4,63	4,19	4,00	3,78
Francia	4,40	4,97	5,17	4,97	4,52	5,91	6,96	3,88	3,63
Spagna	3,04	4,01	4,62	4,48	4,13	4,10	3,92	3,55	3,51
Cile	4,19	3,84	2,55	2,35	2,25	2,26	2,50	2,39	2,49
Messico	1,40	1,21	1,87	2,28	2,01	1,92	1,92	2,30	2,15
Corea del Sud	3,13	2,33	1,80	1,80	2,11	2,07	2,21	2,07	2,02
Regno Unito	1,54	1,63	2,05	2,37	2,64	2,54	2,13	1,79	2,00
Uruguay	3,40	3,66	1,43	1,26	1,23	1,69	1,55	1,73	1,62
Paraguay	0,43	0,33	0,69	0,77	1,05	1,11	1,19	1,20	1,49
Canada	0,52	0,61	1,36	1,16	1,46	1,23	1,14	1,21	0,99
MONDO	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Fonte: ICE

Tab. n. 7- Saldo commerciale Argentina (Valori assoluti in mln di euro)

<i>Flusso</i>	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Importazioni	16.773	21.581	20.122	23.762	30.349	31.441	25.508	23.851	20.321
Esportazioni	13.118	15.839	20.963	23.810	26.431	26.434	23.335	26.410	26.610
Saldo Comm.	-3.655	-5.742	841	48	-3.918	-5.007	-2.173	2.559	6.289

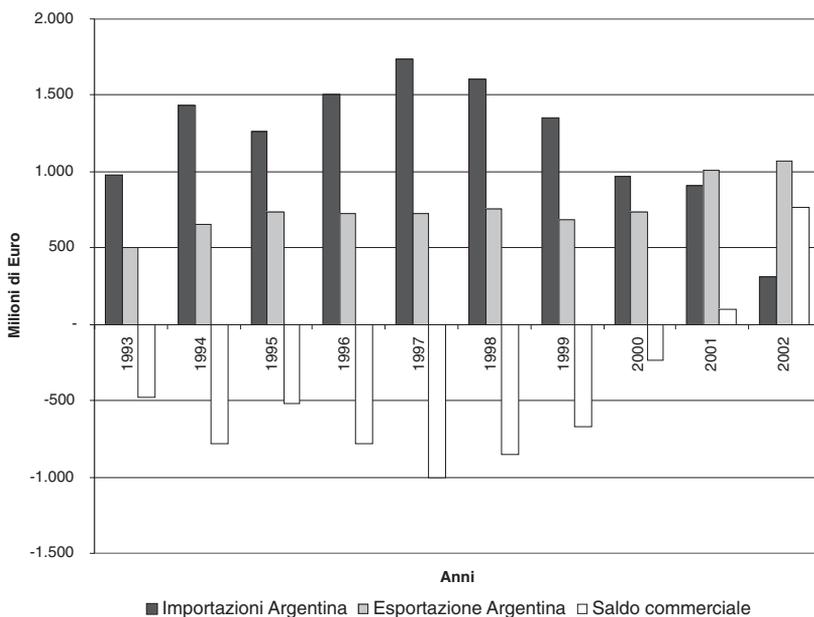
Fonte: ICE

Passiamo ora ad analizzare più in dettaglio le relazioni commerciali tra Italia ed Argentina. Per quanto riguarda le esportazioni argentine verso l'Italia, l'analisi della serie storica 1993/2001 presenta un trend espansivo nel periodo considerato. A tal proposito, si rileva che le esportazioni salgono da 505 milioni di Euro del 1993 sino ai 757 milioni di Euro del 1998 (Tabella 7). Dopo questa fase espansiva delle

esportazioni argentine verso l'Italia, i flussi di export si assestano nel periodo 1998/2000, con una nuova fase di crescita nel biennio 2001/2002, con un'esportazione di 1.009 milioni di Euro nel 2001.

Dall'analisi della composizione merceologica dei flussi di export argentine in Italia emerge che questi si articolano prevalentemente in materie prime e produzioni non trasformate di tipo commodities. Le esportazioni si concentrano in particolare sulle produzioni agricole, in particolare soia, mais, e frumento, oltre a carne e derivati tra le produzioni zootecniche. Un certo rilievo assumono anche le esportazioni nei comparti delle lavorazioni del cuoio, di cui l'Argentina è grande produttore a fronte della ricchezza del patrimonio zootecnico, oltre ad esportazioni di minerali e semilavorati, in particolare ferrosi, a motivo della ricchezza del sottosuolo dell'Argentina per quanto riguarda le risorse minerali (Tabella 8).

Graf. n. 2- Analisi della dinamica commerciale tra Argentina ed Italia (1993/2002)



Dall'analisi della serie storica del periodo 1993/2001 relativa alle importazioni argentine dall'Italia, emerge una contrazione decisa di detto flusso: parte da un valore di 981 milioni di Euro nel 1993 e dopo una fase espansiva nella prima metà degli anni 90 che arriva fino ad un valore di 1.736 milioni di Euro nel 1997, si contrae fino ad un valore di 910 milioni di Euro nel 2001 (Tabella 5). Nell'analisi delle dinamiche della bilancia commerciale argentina è tuttavia da notare come la forte svalutazione del Peso argentino, a seguito della sospensione del regime di parità Peso/Dollaro nel corso del 2002, abbia fortemente penalizzato la moneta argentina sui mercati internazionali, diminuendone il potere d'acquisto e sfavorendo quindi le importazioni. Al fine della valutazione degli effetti delle dinamiche monetarie sui flussi di im-

Tab. n. 8 - Scambi commerciali Italia-Argentina (Valori in migliaia di euro)

CATEGORIE MERCEOLOGICHE	Importazioni dell'Argentina			Esportazioni dell'Argentina			Saldi	
	Variazione		2002	Variazione		2002	2001	2002
	%	2001		%	2001			
Prod. dell'agric., della silvicult. e della pesca	5.805	2.380	-59,00	134.051	160.746	19,91	128.246	158.366
Prodotti delle miniere e delle cave	840	256	-69,52	4.582	3.428	-25,19	3.742	3.172
Prodotti alimentari, bevande e tabacco	28.099	6.646	-76,35	608.523	644.219	5,87	580.424	637.573
Prodotti tessili	14.818	4.859	-67,21	28.828	37.016	28,40	14.010	32.157
Articoli di abbigliamento e pellicce	8.802	2.775	-68,47	3.110	4.064	30,68	-5.692	1.289
Cuio e prodotti in cuoio	6.371	6.060	-4,88	101.011	62.380	-38,24	94.640	56.320
Legno e prodotti in legno	4.479	2.452	-45,26	2.412	2.559	6,09	-2.067	107
Carta e prodotti di carta, stampa ed editoria	26.248	13.357	-49,11	392	2.757	603,32	-25.856	-10.600
Prodotti petroliferi raffinati	11.333	2.077	-81,67	-	67		-11.333	-2.010
Prodotti chimici e fibre sintetiche artificiali	89.211	52.519	-41,13	34.040	39.007	14,59	-55.171	-13.512
Articoli in gomma e in materiale plastico	37.501	17.437	-53,50	1.747	3.760	115,23	-35.754	-13.677
Prod. della lavor. di minerali non metalliferi	20.703	7.235	-65,05	4.378	4.765	8,84	-16.325	-2.470
Metalli e prodotti in metallo	64.874	27.028	-58,34	60.132	80.035	33,10	-4.742	53.007
Macchine ed apparecchi meccanici	345.027	87.005	-74,78	8.184	12.195	49,01	-336.843	-74.810
Apparecchi elettrici di precisione	115.677	25.205	-78,21	4.757	3.933	-17,32	-110.920	-21.272
Autoveicoli	79.967	33.180	-58,51	8.841	8.014	-9,35	-71.126	-25.166
Altri mezzi di trasporto	5.735	1.134	-80,23	397	391	-1,51	-5.338	-743
Mobili	9.388	1.527	-83,73	790	1.228	55,44	-8.598	-299
Altri prodotti dell'industria (escluso mobili)	34.212	14.418	-57,86	481	987	105,20	-33.731	-13.431
Energia elettrica, gas e acqua e altri prodotti	663	304	-54,15	2.441	1.395	-42,85	1.778	1.091
Totale	909.753	307.854	-66,16	1.009.097	1.072.946	6,33	101.345	767.094
CATEGORIE MERCEOLOGICHE	Importazioni dell'Argentina			Esportazioni dell'Argentina			Saldi	
Prodotti Agroalimentari (Prodotti dell'agricoltura, della silvicultura e della pesca e Prodotti alimentari, bevande e tabacco)	2001	2002	Variazione %	2001	2002	Variazione %	2001	2002
	33.904	9.026	-73,38	742.574	804.965	8,40	708.670	795.939

Fonte: ICE

portazioni, si può notare come le importazioni argentine dall'Italia, pari a circa 910 milioni di Euro nel 2001, si siano ridotti a circa 308 milioni di Euro nel 2002 (Tabella 9). È tuttavia da considerare, altresì, come la svalutazione del Peso abbia portato ad un incremento delle esportazioni, piuttosto modesto. La svalutazione del Peso argentino rispetto alle monete estere avrebbe infatti potuto favorire le esportazioni, a fronte del miglioramento delle ragioni di scambio, giacché le merci provenienti dall'Argentina diventano, relativamente, più convenienti sui mercati internazionali. Tuttavia, anche a causa delle difficoltà di articolazione di strategie di export da parte delle aziende argentine, i flussi di export verso l'Italia si sono mantenuti pressoché costanti nel periodo ante e post svalutazione del Peso rispetto al Dollaro.

Per quanto riguarda la composizione merceologica delle importazioni argentine dall'Italia, si rileva un'articolazione concentrata in particolare nei prodotti industriali (Tabella 8). Le importazioni si concentrano infatti nelle merceologie delle macchine e degli apparecchi meccanici, per 345 milioni di Euro nel 2001, scesi a 87 milioni di Euro nel 2002, degli apparecchi elettrici di precisione, per 115 milioni di Euro nel 2001, scesi a 25 nel 2002. Di rilievo anche le importazioni di prodotti chimici e fibre sintetiche artificiali, per 89 milioni di Euro nel 2001 e 52 milioni di Euro nel 2002, e le importazioni di autoveicoli, per 79 milioni di Euro nel 2001, scesi a 33 nel corso del 2002.

Per quanto riguarda l'analisi sintetica della dinamica della bilancia commerciale tra Italia ed Argentina, si può rilevare che questa assume un andamento simile all'andamento generale della bilancia commerciale argentina nel corso dell'ultimo decennio. In generale, le relazioni commerciali tra Italia ed Argentina si sono intensificate, con un crescente flusso di importazioni dall'Italia cui è seguito un incremento delle esportazioni argentine, a motivo anche delle notevoli risorse naturali e del potenziale produttivo del settore agricolo. Sulla base dei dati 1993/2002, si rileva che la bilancia commerciale argentina verso l'Italia ha fatto segnare saldi di segno alterno nell'ultimo decennio, ma con una prevalenza di saldi commerciali negativi, in particolare ad inizio degli anni novanta (Tabella 9). L'Argentina, infatti, durante l'ultimo decennio, ha importato quantità crescenti di merci dall'Italia. Questa tendenza è stata favorita anche della parità Peso/Dollaro che, rafforzando il potere d'acquisto della moneta argentina nei confronti della Lira italiana, ha incentivato gli acquisti di beni esteri da parte dei consumatori argentini. Peraltro, la forza della moneta argentina, pur favorendo le importazioni, ha indirettamente sfavorito la creazione di attività di trasformazione sul territorio nazionale argentino, a motivo della maggior convenienza relativa nell'acquisto di produzioni dall'estero in confronto con l'acquisto di produzioni locali. Le dinamiche monetarie hanno sfavorito la creazione di un tessuto imprenditoriale locale, in particolare nelle attività di trasformazione, frenando, altresì, indirettamente, la propensione all'export delle aziende argentine. Inoltre, la parità Peso/Dollaro ha sfavorito le esportazioni argentine, in considerazione di ragioni di scambio sfavorevoli ai consumatori di paesi terzi nell'acquisto di merci argentine. È tuttavia da segnalare come il trend della bilancia commerciale italo argentina abbia fatto segnare un'inversione di tendenza alla fine degli anni novanta, con progressiva contrazione delle importazioni argentine, a motivo della crisi economica interna, e successivamente a motivo anche dalle svalutazione del Peso argentino rispetto al

Dollaro. In tale contesto, la bilancia commerciale argentina verso l'Italia, negativa per tutto il periodo 1993/2000, inverte il proprio segno nel corso del 2001, con un saldo attivo che, pur limitato a 99 milioni di Euro, sale a ben 765 milioni di Euro nel corso del 2002, a conferma della crescente vocazione di paese esportatore dell'Argentina, come rilevato anche dall'analisi dei dati relativi alla bilancia commerciale tra Argentina ed estero in generale.

Tab. n. 9- Saldi commerciali Argentina – Italia (Valori in mln di euro)

<i>Flussi commerciali</i>	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Importazioni Argentina	981	1.431	1.260	1.504	1.736	1.610	1.354	964	910	308
Esportazione Argentina	505	654	736	722	730	757	689	732	1.009	1.073
Saldo commerciale	-476	-777	-524	-782	-1.006	-853	-665	-232	99	765

Fonte: ICE

4. Gli scambi commerciali agroalimentari tra Italia ed Argentina

Nel complesso delle dinamiche commerciali tra Italia ed Argentina, assumono particolare rilievo gli scambi afferenti al sistema agroalimentare e, a tal proposito, sono state considerate le categorie merceologiche 1 (prodotti dell'agricoltura, della silvicoltura e della pesca) e 3 (prodotti alimentari, bevande e tabacco) della classificazione per merceologia delle statistiche ufficiali del commercio con l'estero di fonte ICE (Istituto Commercio Estero). Le esportazioni argentine verso l'Italia relative alle produzioni agroalimentari sono circa 800 milioni di Euro, pari ad 80% circa delle esportazioni verso l'Italia (Tabella 8). La composizione merceologica delle esportazioni agroalimentari argentine verso l'Italia si articola per circa il 20%, pari a circa 160 milioni di Euro su dati 2002, nella categoria merceologica dei prodotti dell'agricoltura, della silvicoltura e della pesca, espressiva delle produzioni agricole di base non trasformate di tipo commodities. Si tratta di produzioni agricole di base di cui l'Argentina è grande produttore ed esportatore sui mercati mondiali. Maggior rilievo in valore assume la categoria merceologica delle produzioni alimentari, delle bevande e del tabacco, che con circa 640 milioni di Euro nel 2002 rappresenta la maggior voce di export agroalimentare dell'Argentina verso l'Italia. Sulla base dei dati ICE disaggregati, è possibile dettagliare la composizione merceologica della suddetta categoria, in ulteriori 10 sotto categorie, sulla base della classificazione prevista nelle statistiche per il commercio estero (Tabella 10). Da detta suddivisione, emerge il peso centrale della categoria degli oli e grassi vegetali ed animali, voce che, con oltre 480 milioni di Euro per il 2002, rappresenta il 60% circa delle esportazioni argentine verso l'Italia. A questa voce seguono, per valore, la categoria dei prodotti ittici, con circa 110 milioni di Euro, e la categoria delle carni, terza quota di export in valore per circa 40 milioni di Euro, sempre su dati 2002. È interessante notare come, per entrambi gli aggregati merceologici, e quindi per le esportazioni agroalimentari nel complesso, si sia registrato un incremento nel periodo 2001/2002, nell'ordine del 20% circa nelle produzioni agricole della categoria merceologica 1, e nell'ordine del 6% circa nelle produzioni alimentari, per un dato medio di incremento delle esportazioni

agroalimentari verso l'Italia del 8,4%, leggermente superiore al dato medio di incremento delle esportazioni verso l'Italia nel complesso, assestato al 6,3% per lo stesso periodo. In prospettiva, è da considerare la fase di rapido sviluppo che stanno vivendo alcuni comparti produttivi, tra cui i comparti del vino e dell'olio d'oliva, che potranno rappresentare, in prospettiva, una interessante voce di export nell'agroalimentare argentino. Emerge quindi un'articolazione delle esportazioni argentine verso l'Italia su categorie merceologiche legate alle tipicità produttive del sistema agroalimentare argentino, caratterizzato dalla ricchezza delle produzioni zootecniche, in particolare nelle produzioni di carne, e dalla presenza di produzioni vegetali di rilievo, quali soia e frumento in particolare. Per quanto riguarda le possibilità delle esportazioni argentine, possiamo notare come l'agricoltura dell'Argentina possa offrire produzioni di qualità e produzioni biologiche apprezzate dal consumatore europeo ed italiano, particolarmente attento ai temi della qualità e della salubrità degli alimenti, da rilevare inoltre la rilevanza per le produzioni ortofrutticole della controstagionalità delle produzioni argentine.

Tab. n. 10- Scambi commerciali Italia-Argentina (dettaglio prodotti alimentari, bevande e tabacco –settore 3– anni 2001 e 2002)

Valori in Migliaia di Euro

CATEGORIE MERCEOLOGICHE	Imp. dell'Argentina		Esp. dell'Argentina		Saldi	
	2001	2002	2001	2002	2001	2002
Carne e prodotti a base di carne	12.110	2.809	23.907	40.507	11.797	37.698
Pesci cons. e trasf. e prod. a base di pesce	4	-	118.497	113.451	118.493	113.451
Preparati e conserve a base di frut.e ortag.	3.335	141	2.724	3.758	-611	3.617
Oli e grassi vegetali e animali	346	9	460.895	483.371	460.549	483.362
Prodotti lattiero caseari e gelati	367	-	-	1	-367	1
Prodotti della macinazione, amidi e fecole	147	63	486	1.300	339	1.237
Alimenti per animali	238	13	136	185	-102	172
Altri prodotti alimentari	10.176	3.473	935	1.140	-9.241	-2.333
Bevande	1.377	137	943	505	-434	368
Tabacco e prodotti a base di tabacco	-	-	-	-	-	-
Totale	28.100	6.645	608.523	644.218	582.424	639.575

Fonte: ICE

Procedendo nell'analisi delle dinamiche relative agli scambi commerciali agroalimentari tra i due paesi, si rileva che le importazioni argentine dall'Italia assumono un peso modesto, pari a circa 34 milioni di Euro per il 2001, scese poi a 9 milioni di Euro nel 2002, a seguito anche della svalutazione del Peso e della crisi interna argentina. La contrazione delle importazioni agroalimentari, pari al 73% circa, risulta particolarmente accentuata nel periodo 2001/2002, ad un livello peraltro superiore rispetto alla contrazione del complesso delle importazioni dall'Italia, che hanno fatto segnare una riduzione del 66% circa. È altresì da considerare che le importazioni argentine dall'Italia relative alle produzioni agroalimentari hanno un peso modesto sul totale delle importazioni dall'Italia, pari al 3% circa delle importazioni, che sono articolate in prevalenza nei settori della meccanica e delle apparecchiature elettriche di precisione.

In dettaglio, la composizione merceologica delle importazioni argentine dall'Italia si articola in prevalenza, per 2.380.000 Euro su dati 2002, nella categoria merceologica dei prodotti dell'agricoltura, della silvicoltura e della pesca (Tabella 8). Prevale la categoria merceologica delle produzioni alimentari, delle bevande e del tabacco, per 6.646.000 Euro. Articolando detta categoria merceologica in ulteriori 10 sotto categorie, sulla base della classificazione prevista nelle statistiche per il commercio estero, emerge la prevalenza delle importazioni di prodotti a base di carne, per 12.110.000 Euro nel corso del 2001, scesi a 2.809.000 Euro nel 2002 (Tabella 10).

Dopo aver analizzato le dinamiche commerciali tra Italia ed Argentina, può essere di interesse procedere ad un breve approfondimento sulle dinamiche commerciali relative ai prodotti agroalimentari che hanno interessato la provincia di Parma e l'Argentina, con un riferimento anche alla meccanica per l'agroalimentare. L'analisi assume interesse per il ruolo della provincia di Parma nell'agroalimentare nazionale e per i legami culturali, commerciali ed economici in generale tra la provincia di Parma e l'Argentina.

Analizzando il complesso delle dinamiche commerciali tra la provincia di Parma e l'Argentina, su dati 2001 e 2002, emerge un buon livello di interscambio tra i due territori, nel corso del 2001, cui segue una decisa contrazione nel corso del 2002, per le già citate ragioni congiunturali dell'economia argentina. Emerge infatti un interscambio nel corso del 2001, assestato su importazioni argentine per circa 9,5 milioni di Euro, ed esportazioni per 8,8 milioni di Euro, scese a 2,5 milioni di Euro di importazioni e 1 milioni di Euro di esportazioni nel corso del 2002 (Tabella 11).

Tra le voci di scambio commerciale prevalgono le categorie dei macchinari, per quanto riguarda le importazioni argentine, per circa 4,8 milioni di Euro, nel corso del 2001, scese poi 1,6 milioni di Euro circa nel corso del 2002. Tra le esportazioni argentine verso la provincia di Parma, prevale la categoria merceologica dei metalli e delle lavorazioni in metallo, per circa 6,6 milioni di Euro nel corso del 2001, scesi poi a soli 0,14 milioni di Euro circa nel 2002.

Anche dall'analisi dell'interscambio commerciale tra la provincia di Parma e l'Argentina, assume particolare rilievo l'interscambio agroalimentare (Tabella 12). Dalle analisi condotte emerge che le importazioni argentine dalla provincia di Parma sono pari a circa 1,3 milioni di Euro, per il 2001 con composizione merceologica articolata quasi totalmente sulla categoria merceologica dei prodotti alimentari, delle bevande e del tabacco. In particolare sono esportati in Argentina soprattutto carne e prodotti a base di carne, in prevalenza salumi, oltre a beni afferenti alla categoria merceologica degli "altri prodotti alimentari".

Per quanto riguarda più in generale le esportazioni di prodotti tipici del territorio parmense, in base ai dati forniti dai Consorzi di tutela del Prosciutto di Parma e del Formaggio Parmigiano Reggiano e riferiti alle rispettive aree di produzione si rileva che il Prosciutto di Parma ha esportato circa 18 mila pezzi nel 2001. Le esportazioni (Tabella 13) si sono oggi ridimensionate a seguito della crisi economica argentina e nel 2003 si stima che ne siano stati esportati solo 700 prosciutti. Molto esigua invece l'esportazione di formaggio Parmigiano-Reggiano: il codice doganale che registra l'esportazione oltre che del Parmigiano-Reggiano anche del Grana Padano registra per il 2001 la vendita verso l'Argentina di soli 164 quintali di prodotto.

Tab. n. 11- Scambi commerciali Parma - Argentina (Valori in migliaia di euro)

CATEGORIE MERCEOLOGICHE	Importazioni dell'Argentina		Esportazioni dell'Argentina		Saldi	
	2001	2002	2001	2002	2001	2002
Prod. dell'agricol., della silvicoltura e della pesca	6	8	33,33	690	63	684
Prodotti delle miniere e delle cave	-	-	-	-	-	-
Prodotti alimentari, bevande e tabacco	1.315	112	-90,00	1.190	542	-125
Prodotti tessili	20	2	-91,67	-	-	-20
Articoli di abbigliamento e pellicce	12	1	-91,67	-	-	-12
Cuoio e prodotti in cuoio	-	-	-	-	-	-
Legno e prodotti in legno	1	-	-	-	-	-1
Carta e prodotti di carta, stampa ed editoria	6	-	-	5	-	-1
Prodotti petroliferi raffinati	-	-	-	-	-	-
Prodotti chimici e fibre sintetiche artificiali	739	114	-84,57	-	28	-739
Articoli in gomma e in materiale plastico	237	60	-74,68	-	1	-237
Prod. della lavorazione di minerali non metalliferi	963	59	-93,87	23	14	-940
Metalli e prodotti in metallo	408	105	-74,26	6.613	144	6.205
Macchine ed apparecchi meccanici	4.863	1.640	-66,28	292	205	-4.571
Apparecchi elettrici di precisione	260	366	40,77	10	35	250,00
Autoveicoli	401	13	-96,76	1	-	-400
Altri mezzi di trasporto	-	6	-	-	-	-6
Mobili	240	1	-99,58	-	-	-240
Altri prodotti dell'industria (escluso mobili)	17	-	-100,00	1	-	-16
Energia elettrica, gas e acqua e altri prodotti	3	-	-100,00	6	24	300,00
Totale	9.491	2.487	-73,80	8.831	1.056	-88,04
1.341	571					
CATEGORIE MERCEOLOGICHE	Importazioni dell'Argentina		Esportazioni dell'Argentina		Saldi	
	2001	2002	2001	2002	2001	2002
Prod. agroalimentari (cat. merceologiche 1 - 3)	1.321	120	-90,92	1.880	605	-67,82
Fonte: ICE					559	485

Tab. n. 12- Scambi commerciali Parma-Argentina (dettaglio prodotti alimentari, bevande e tabacco - settore 3)

Valori in migliaia di euro

CATEGORIE MERCEOLOGICHE	Imp. dell' Argentina		Esp. dell' Argentina		Saldi	
	2001	2002	2001	2002	2001	2002
Carne e prodotti a base di carne	1.064	87	58	43	-1.006	-44
Pesci cons. e trasf. e prodotti a base di pesce	-	-	874	499	874	499
Preparati e conserve a base di frutta e ortaggi	5	-	-	-	-5	-
Oli e grassi vegetali e animali	-	-	252	-	252	-
Prodotti lattiero caseari e gelati	-	-	-	-	-	-
Prodotti della macinazione, amidi e fecole	13	1	-	-	-13	-1
Alimenti per animali	-	-	-	-	-	-
Altri prodotti alimentari	233	24	-	-	-233	-24
Bevande	-	-	-	-	-	-
Tabacco e prodotti a base di tabacco	-	-	7	-	7	-
Totale	1.315	112	1.191	542	1.877	2.432

Fonte: ICE

Tab. n. 13- Esportazioni di Prosciutto di Parma e formaggi tipo grana (Parmigiano Reggiano e Grana Padano) in Argentina dal 1997 al 2003

Anni	1997	1998	1999	2000	2001	2003
Prosciutto di Parma (numero di Pezzi)	24.885	27.174	23.083	28.647	18.809	700 (stima)
Formaggi Parmigiano Reggiano e Grana Padano (quintali)	149	60	277	242	164	n.d.

Fonti: Consorzio Prosciutto di Parma e Consorzio Formaggio Parmigiano Reggiano

Le esportazioni argentine verso la provincia di Parma, nell'ambito delle produzioni agroalimentari, sono articolate in 0,7 milioni di Euro circa in produzioni agricole di base, e 1,2 milioni di Euro di prodotti alimentari, bevande e tabacco, per un totale di circa 1,9 milioni di Euro, sempre nel corso del 2001 (Tabella 11). Tra le categorie merceologiche di articolazione delle esportazioni agroalimentari argentine verso la provincia di Parma prevalgono le conserve ittiche, per 0,87 milioni di euro circa, e gli oli e grassi animali e vegetali, per 0,25 milioni di Euro circa, sempre nel corso del 2001 (Tabella 12).

Sulla base dei dati disponibili ed oggetto d'analisi, emerge che l'interscambio commerciale tra la provincia di Parma e l'Argentina assume rilievo, per quanto riguarda i flussi di merci verso Parma, in particolare per le produzioni agricole di base e per i prodotti alimentari conservati a base di pesce, cui segue un flusso di esportazioni verso l'Argentina che si sostanzia di prodotti a base di carne, per quanto riguarda le

produzioni agroalimentari, con un'importante presenza di flussi di export anche nel comparto dei macchinari per l'industria.

5. Conclusioni

Dal complesso delle analisi condotte nel presente lavoro, emerge che l'Argentina si caratterizza quale grande produttore ed esportatore di produzioni agroalimentari, in particolare soia, mais e frumento, tra le produzioni vegetali, carne bovina, tra le produzioni zootecniche, e relativi prodotti trasformati. In tale ambito si rileva inoltre l'importanza dell'interscambio commerciale tra Italia ed Argentina.

Le importazioni argentine, nel 2001, sono state di 20.312 milioni di Euro, di cui 910 dall'Italia, pari al 4% circa del totale delle importazioni. Le esportazioni sono state pari a 26.610 milioni di Euro, di cui 1.009 verso l'Italia, pari al 3% circa del totale delle esportazioni.

In tale contesto, le esportazioni agroalimentari argentine verso l'Italia sono state pari a circa 742 milioni di Euro, contro importazioni argentine dall'Italia per soli 33 milioni di Euro circa, ed un saldo della bilancia agroalimentare argentina positivo per circa 709 milioni di Euro nel corso del 2001, a conferma della vocazione dell'Argentina quale grande esportatore di prodotti agroalimentari verso l'Italia. L'articolazione delle esportazioni agroalimentari argentine verso l'Italia si sostanzia in prevalenza in carne bovina, oltre a conserve ittiche ed oli e grassi animali e vegetali. Nonostante i buoni esiti congiunturali, le esportazioni argentine si rapportano con i mercati internazionali con alcune criticità, a causa del permanere di misure di protezionismo internazionale e per le difficoltà di concentrazione e trasporto delle produzioni agricole. Tuttavia, dall'analisi degli scambi dei prodotti agroalimentari emerge che l'Argentina, con produzioni agroalimentari caratterizzate da qualità e controstagionalità, può offrire produzioni apprezzate dal consumatore europeo ed italiano, particolarmente attento ai temi della qualità e della salubrità degli alimenti. A tale proposito, al fine di un consolidamento ed ampliamento delle esportazioni, possono essere importanti azioni di differenziazione e di certificazione delle produzioni. Inoltre, potrà essere opportuna un'azione di organizzazione della produzione ed ampliamento delle attività di trasformazione, al fine di acquisire quote di valore aggiunto per le esportazioni argentine ed ampliare le possibilità di integrazione commerciale tra Italia ed Argentina, anche con riferimento ai sotto sistemi economici locali, come quello della provincia di Parma.

Parole chiave: Scambi agroalimentari italo-argentini, scambi commerciali Parma-Argentina, carne bovina argentina.

Key words: Italo-Argentinean trade of food products, Parma – Argentina commercial exchange, Argentinean beef.

Mots-clés: échanges agro-alimentaires italo-argentins, échanges commerciaux Parme-Argentine, viande de bœuf argentine

RIASSUNTO - L'Argentina è paese di grandi spazi, caratterizzato dall'importanza

dei comparti della produzione e della trasformazione agroalimentare nel complesso del sistema economico. L'Argentina è infatti grande produttore ed esportatore di prodotti agroalimentari, in particolare produzioni vegetali, quali soia, mais e frumento, e produzioni zootecniche, in particolare carne bovina. Le importazioni agroalimentari dall'Italia assumono un peso modesto, mentre rilevante è l'interscambio nel settore della meccanica e delle apparecchiature elettriche e di precisione.

In tale contesto il lavoro, dopo una descrizione del sistema agroalimentare argentino, e del comparto dell'allevamento bovino, analizza gli scambi commerciali relativi al settore agroalimentare tra Italia ed Argentina, con particolare attenzione alla composizione merceologica dei flussi commerciali e alla possibilità di crescita degli scambi tra i due paesi, oltre ad un'analisi degli scambi commerciali tra Parma e l'Argentina.

Le relazioni commerciali tra Italia ed Argentina assumono già oggi un peso rilevante, per motivazioni di affinità culturale e per legami storici tra i due paesi. Le esportazioni agroalimentari argentine verso l'Italia rappresentano circa l'80% delle esportazioni verso l'Italia, con prevalenza merceologica nei comparti della carne, delle conserve ittiche e degli oli e grassi animali e vegetali. Le esportazioni agroalimentari argentine, tuttavia, trovano un limite dalla presenza di misure di protezionismo internazionale.

L'Argentina offre sempre più produzioni agroalimentari con caratteristiche qualitative apprezzate dal consumatore europeo ed italiano, particolarmente attento ai temi della qualità e della sicurezza degli alimenti. Al fine di incentivare le esportazioni argentine verso l'Italia, sono importanti le azioni di organizzazione e differenziazione della produzione, in particolare attraverso azioni di certificazione delle produzioni, ed azioni di ampliamento delle attività di trasformazione, al fine di acquisire maggiori quote di valore aggiunto.

SUMMARY -*Commercial exchanges between Italy and Argentina in the food processing sector*

Argentina is a country of vast, open spaces, characterised by the importance of the food production and processing in the economic system as a whole. Argentina is a large producer and exporter of food products, in particular vegetable products, including soya, corn and wheat, and zoo-technical production, particularly beef. The import of food products from Italy is quite modest, although trade in the mechanical, electrical appliances and precision instruments sectors is more important.

In this context, following the description of the Argentinean food processing system, and the beef farming sector, this study analyses the commercial exchanges between Italy and Argentina in the food sector, with particular attention to the sectoral composition of the commercial flows and the possibility of growth in trade between the two countries, as well as an analysis of the trade between Parma and Argentina.

The commercial relations between Italy and Argentina are very important today, due to cultural affinities and historical connections between the two countries. The food exports from Argentina represent around 80% of the total exports from the country to Italy, mainly in the sectors of meat, fish preserves, animal and vegetable oils and fats. The Argentinean food exports are however limited by the presence of

international protectionism measures.

In Argentina the production of food with the quality requested by the European and Italian consumers is on the increase, and the country pays particular attention to the issues of food safety and quality. In order to promote Argentinean exports to Italy, the organisation and differentiation of the production is important, particularly concerning activities for the certification of production, and the expansion of processing activities, in order to obtain greater quotas of added value.

RÉSUMÉ – *Les échanges commerciaux entre l'Italie et l'Argentine dans le secteur agro-alimentaire*

L'Argentine est un pays de grands espaces qui se caractérise par l'importance des domaines de la production et de la transformation agro-alimentaire dans l'ensemble du système économique. L'Argentine est en effet une grande productrice et exportatrice de produits agro-alimentaires, notamment de productions végétales, comme le soja, le maïs et le froment, mais aussi de productions zootechniques et notamment de viande de bœuf. Ses importations agro-alimentaires depuis l'Italie restent modestes tandis que les échanges dans le secteur de la mécanique et des appareils électriques et de précision sont importants.

Dans ce contexte, cette étude - après la description du système agro-alimentaire argentin et du domaine de l'élevage bovin - analyse les échanges commerciaux du secteur agro-alimentaire entre Italie et Argentine, en accordant une attention particulière à la nature des marchandises des flux commerciaux et à la marge de croissance des échanges entre les deux pays ainsi qu'à une analyse des échanges commerciaux entre Parme et l'Argentine.

Les relations commerciales entre l'Italie et l'Argentine jouent d'ores et déjà un rôle important en raison des affinités culturelles et des liens historiques entre ces deux pays. Les exportations agro-alimentaires argentines à destination de l'Italie représentent environ 80% des exportations totales vers l'Italie avec une dominante dans les secteurs de la viande, des conserves de poissons et des huiles et graisses animales et végétales. Ces exportations sont toutefois limitées par l'existence de mesures de protectionnisme international.

L'Argentine propose toujours davantage de productions agro-alimentaires dont les caractéristiques qualitatives sont appréciées par les consommateurs européens et italiens, particulièrement attentifs à la qualité et à la sécurité des aliments. Il existe, afin d'encourager les exportations argentines vers l'Italie, d'importantes mesures d'organisation et de différenciation de la production, notamment à travers des actions de certification des produits et des actions d'élargissement des activités de transformation destinées à accroître la valeur ajoutée.

Bibliografia

- 1) AA.VV. (2003). Carne argentina. Desde la demanda externa hacia una propuesta de trabajo. Series MaGEA. Ediciones ACEDI. Argentina.
- 2) AA.VV. (2003). Il mercato della carne bovina. Rapporto 2003. Franco Angeli

Editore. Milano.

- 3) ICE (2002). Guida Paese: Argentina. Roma
- 4) MARIANI A., VIGANO' E. (2002). Il sistema agroalimentare dell'Unione Europea, economie e politiche. Carocci Editore. Roma
- 5) PICCININI A. (2000). Politica e agricoltura, la svolta europea del secolo ventunesimo. Franco Angeli Editore. Milano.
- 6) STURZENEGGER F. (2003). La economía de los argentinos. Grupo Editorial Planeta. Argentina.
- 7) ZANLARI A. (2000). Il settore alimentare in Argentina. Interscambio commerciale e investimenti. Istituto Guglielmo Tagliacarte e Camera di Commercio di Parma. Parma

IL RUOLO DELL'AUTORITA' EUROPEA PER LA SICUREZZA ALIMENTARE NEL SISTEMA AGROALIMENTARE EUROPEO

Giuseppe Bonazzi¹

1. Introduzione

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare nasce da una proposta della Commissione Europea, avanzata nel 2000 con il "Libro bianco sulla sicurezza alimentare", per rivedere le politiche a favore dei consumatori dopo gli scandali della mucca pazza e dei polli alla diossina e per affrontare la questione dei cibi transgenici. L'obiettivo era quello di creare un organismo indipendente, capace di fornire al legislatore comunitario pareri scientifici, frutto delle informazioni più attuali raccolte nel continuo confronto con centri scientifici europei e internazionali e in grado di mediare in caso di dissensi tra Stati o istituzioni, di allertare e informare tempestivamente i cittadini e soprattutto di prevenire crisi alimentari.

Il settore agroalimentare è di grande importanza per l'economia europea nel suo complesso. L'industria degli alimenti e delle bevande è uno dei principali settori industriali nella Ue con una produzione nel 2001 pari a 621 miliardi di euro e, a livello internazionale, è il maggior produttore al mondo di prodotti alimentari e bevande. L'industria agroalimentare è il terzo datore di lavoro industriale della Ue con 2.372.000 lavoratori, il 30% dei quali operano in piccole e medie imprese. Il primo comparto europeo, secondo le valutazioni CIAA (Confederazione dell'Industria alimentare europea) relative al 2001, è la lavorazione della carne con un fatturato di 126 miliardi di euro, un valore aggiunto pari a 21 miliardi e 610 mila addetti (22,3% degli addetti totali). Segue il comparto dell'industria lattiero-casearia, con 97 miliardi di fatturato, un valore aggiunto di 14 miliardi e 271 mila addetti (9,9% degli addetti totali). Al terzo posto troviamo il comparto delle bevande, con 95 miliardi di fatturato, un valore aggiunto di 27 miliardi e 317 mila addetti (11,6% degli addetti totali); seguono poi altri comparti quali i prodotti per l'alimentazione animale, la lavorazione e conservazione di frutta e ortaggi ecc.

Le esportazioni dell'industria agroalimentare europea sono elevate, oltre il 18% del valore del fatturato viene esportato. Il principale contributo alle esportazioni dell'industria alimentare europea viene dall'industria delle bevande che copre il 29,4% dell'intero export del "food and drink" del continente. Il principale destinatario delle esportazioni alimentari comunitarie è il mercato statunitense, con 9,1 miliardi di euro, seguito a distanza dal Giappone (3,7 miliardi), Svizzera (2,6 miliardi), Russia (2,6 miliardi), Canada (1,4 miliardi). Sul fronte delle importazioni primeggia, fra i paesi di

¹ Sezione Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

provenienza il Brasile (4,0 miliardi), seguito da USA (3,4 miliardi), Argentina (2,9 miliardi), Cina e Nuova Zelanda (entrambe con 1,5 miliardi).

L'importanza economica, sociale e culturale delle produzioni alimentari è evidenziata anche dall'interesse per la sicurezza alimentare nella società e in particolare tra autorità pubbliche e produttori. La catena della produzione alimentare sta diventando oggi sempre più complessa, ogni singolo anello deve quindi essere controllabile e sicuro se si vuole che la salute dei consumatori sia adeguatamente protetta. Tale principio deve valere indipendentemente dal fatto che gli alimenti vengano prodotti nell'Unione europea o importati da paesi terzi. Ai consumatori si devono offrire prodotti sicuri e di qualità.

Tab. n.1 - Produzioni e occupati nell'industria alimentare della Ue, per comparto (2001)

COMPARTI	Produzione		Valore aggiunto		Occupati	
	mld euro		mld euro		migliaia	%
Prod., lav. e conservazione di carne	126	21	610	22,3		
Industria lattiero-casearia	97	14	271	9,9		
Industria delle bevande	95	27	317	11,6		
Prodotti per alimentazione animale	40	6	90	3,3		
Lav. e conservaz. di frutta e ortaggi	37	9	178	6,5		
Produzione di oli e grassi	25	2	43	1,6		
Lav. granaglie e prod. amidacei	25	4	62	2,3		
Lav. e conservazione di pesce	16	2	94	3,4		
Fabbricazione altri alimenti	160	47	1072	39,2		
Tot. Industria alimentare e bevande	621	132	2737	100		

Fonte: ISMEA-FEDERALIMENTARE

Una politica efficace di sicurezza alimentare deve riconoscere la natura correlata della produzione alimentare. Essa richiede la valutazione e il monitoraggio dei rischi che possono derivare alla salute dei consumatori dalle materie prime, dalle tecniche agricole e dalla lavorazione degli alimenti; essa richiede inoltre un'efficace azione normativa per gestire tali rischi nonché la messa in atto e la gestione di sistemi di controllo per sorvegliare e assicurare l'attuazione di tali norme. Ciascun elemento è parte di un ciclo: in tal modo, gli sviluppi della lavorazione degli alimenti possono richiedere cambiamenti delle normative vigenti, mentre il feed back fornito dai sistemi di controllo può contribuire ad identificare e a gestire i rischi esistenti e quelli emergenti. Ciascuna parte del ciclo deve funzionare adeguatamente se si vogliono realizzare gli standard più elevati possibili di sicurezza alimentare.

In questo scenario, la Commissione europea ha promosso l'istituzione dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare al fine di creare un elevato livello di protezione della salute dei consumatori e di ripristinare la fiducia degli stessi; una maggiore trasparenza a tutti i livelli della politica di sicurezza alimentare contribuirà ad accrescere la fiducia dei consumatori dell'Ue. Ciò non significa che la Ue debba essere l'unica responsabile di tutti gli aspetti della sicurezza alimentare, tuttavia tutti gli aspetti della sicurezza alimentare devono essere affrontati a livello di Ue. La normativa della Ue deve poter essere fatta efficacemente rispettare negli Stati membri in linea con il principio di sussidiarietà. La responsabilità di fare applicare la legislazio-

ne deve rimanere in via prioritaria di competenza nazionale, regionale e locale. Tuttavia, il mercato interno implica che le responsabilità non siano esclusivamente le responsabilità nazionali; ciascuno Stato membro è responsabile non solo nei confronti dei propri cittadini, ma di tutti i cittadini della Ue e dei paesi terzi per quanto concerne gli alimenti prodotti sul suo territorio.

I sistemi di sicurezza alimentare della Comunità e degli Stati membri in occasione delle recenti emergenze che hanno interessato gli alimenti e i mangimi hanno mostrato i propri limiti. Tali emergenze hanno messo in luce i punti deboli che richiedono un'azione da parte delle autorità responsabili (Commissione, Stati membri e Parlamento) per rafforzare, migliorare e sviluppare ulteriormente i sistemi esistenti. La sicurezza alimentare deve essere organizzata in modo più coordinato e integrato. Ciò consentirà di creare un quadro per la sicurezza alimentare migliore, in grado di garantire un elevato livello di sanità pubblica e di protezione dei consumatori conformemente a quanto prescritto dal Trattato Ce.

A dicembre 2003 è stata fissata come sede definitiva dell'Autorità per la sicurezza alimentare la città di Parma, dopo laboriose trattative e accordi che hanno impegnato le principali capitali europee e le istituzioni dell'Ue. Gli accordi raggiunti a Bruxelles il 13 dicembre 2003 hanno riguardato oltre all'Autorità per la sicurezza alimentare a Parma, l'assegnazione dell'Autorità sul controllo delle sostanze chimiche a Helsinki (Finlandia), dell'Autorità per la sicurezza marittima a Lisbona (Portogallo), dell'Autorità per la pesca a Barcellona (Spagna), dell'Accademia di polizia europea a Londra (Inghilterra), dell'Unità di Cooperazione Giudiziaria europea contro la criminalità (Eurojust) all'Aja (Olanda), dell'Autorità per la sicurezza ferroviaria a Lille (Francia), dell'Autorità per il controllo del traffico aereo a Colonia (Germania), dell'Autorità per il controllo e la prevenzione delle malattie trasmissibili alla Svezia e dell'Autorità per le reti informatiche alla Grecia.

Il Governo italiano, in accordo con la Regione Emilia Romagna, la Provincia e la città di Parma, aveva presentato ufficialmente la candidatura di Parma a sede dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare il 19 maggio 2000. La decisione del Governo italiano di candidare Parma è nata dalla convinzione che la sicurezza alimentare non sia da intendersi solo come un'operazione di laboratorio - la semplice assenza di elementi patogeni - ma piuttosto come sintesi tra la qualità degli alimenti e la loro tutela sanitaria durante l'intero processo produttivo. Proprio per questo motivo, un territorio nel quale il controllo della sicurezza e della qualità dei prodotti alimentari venga costantemente garantito costituisce la collocazione naturale dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare. E Parma ha tutte le caratteristiche necessarie: la singolare concentrazione di prodotti tipici infatti non solo l'ha resa famosa nel mondo, ma le ha anche dato una "mentalità internazionale" che le ha permesso di divulgare e al contempo recepire le esigenze di tutela e garanzia delle produzioni alimentari. Parma si presenta come sintesi di esperienze internazionali e come espressione della cultura della tutela e della qualità dei cibi: tecniche di controllo e qualità dei processi, sedi universitarie e scientifiche di alto livello, tipicità dei prodotti, industria meccanica alimentare, hanno già reso il territorio un punto di riferimento internazionale.

2. Aspetti normativi

L'Unione europea dispone di un ampio corpus legislativo che copre la produzione dei prodotti agricoli e la produzione industriale degli alimenti. La legislazione si è evoluta nell'ultimo trentennio in modo da rispecchiare un mix di elementi scientifici, politici ed economici, in particolare nel quadro della creazione del mercato interno, ma tale sviluppo non è stato guidato da un'azione coerente complessiva.

La produzione degli alimenti è estremamente complessa: i prodotti di origine animale e vegetale presentano rischi intrinseci dovuti alla contaminazione microbiologica e chimica. L'attuale quadro giuridico e il sistema operativo hanno in generale conferito ai consumatori della Ue un elevato livello di protezione della salute; il problema non è dato dalla mancanza di strumenti giuridici, bensì dalla grande disparità degli strumenti per rispondere a particolari situazioni in settori specifici o dalla molteplicità delle azioni da intraprendere là dove un problema coinvolga diversi settori. Uno degli anelli più deboli del sistema è dato dalla mancanza di un chiaro impegno da parte di tutti gli interessati a dare un allarme preventivo in caso di un rischio potenziale e consentire di intraprendere tempestivamente la necessaria valutazione scientifica e adottare le misure protettive a livello europeo a monte piuttosto che a valle.

La legislazione alimentare persegue un livello elevato di tutela della vita e della salute umana, degli interessi dei consumatori, comprese le pratiche leali nel commercio alimentare, mira al conseguimento della libertà di circolazione all'interno della Comunità degli alimenti e dei mangimi prodotti o immessi sul mercato nel rispetto dei principi e dei requisiti vigenti. La Comunità è il più grosso importatore/esportatore di prodotti alimentari al mondo e commercia con paesi di tutto il mondo una gamma sempre più ampia di prodotti alimentari. Con questi ampi scambi di prodotti alimentari la sicurezza alimentare non può essere considerata esclusivamente una questione di politica interna.

Il quadro internazionale per quanto concerne la sicurezza degli alimenti si è sviluppato in modo significativo a seguito del ruolo assunto dalle organizzazioni internazionali quali il Codex Alimentarius e l'Ufficio internazionale dell'epizootia (UIE) nell'ambito dell'accordo dell'Organizzazione mondiale del commercio sull'applicazione di misure sanitarie e fitosanitarie (SPS), l'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS) e l'Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO).

Il 28 gennaio 2002 è stato emanato il Regolamento (CE) n. 178/2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. Esso costituisce la base per garantire un livello elevato di tutela della salute umana e degli interessi dei consumatori in relazione agli alimenti, stabilisce principi comuni e competenze, i mezzi per assicurare un solido fondamento scientifico, procedure e meccanismi organizzativi efficienti a sostegno dell'attività decisionale nel campo della sicurezza degli alimenti e dei mangimi. Tale regolamento disciplina tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti e dei mangimi.

Nel suddetto Regolamento vengono fissati gli obblighi generali del commer-

cio alimentare per alimenti e mangimi importati o esportati, in particolare è stato emanato che gli alimenti e i mangimi importati nella Comunità per essere immessi sul mercato devono rispettare le pertinenti disposizioni della legislazione alimentare o le condizioni riconosciute almeno equivalenti dalla Comunità o, quando tra la Comunità e il paese esportatore esiste un accordo specifico, le disposizioni previste, allo stesso modo gli alimenti e i mangimi esportati dalla Comunità per essere immessi sul mercato di un paese terzo devono rispettare le pertinenti disposizioni della legislazione alimentare, salvo diversa indicazione delle autorità del paese importatore o diversa disposizione di leggi, regolamenti, norme e altre procedure giuridiche e amministrative eventualmente in vigore in detto paese.

La Comunità e gli Stati membri contribuiscono all'elaborazione di norme tecniche internazionali, norme sanitarie e fitosanitarie sugli alimenti e sui mangimi, promuovono il coordinamento dei lavori sulle norme relative ad alimenti e mangimi intrapresi da organizzazioni internazionali governative e non governative, contribuiscono all'elaborazione di accordi sul riconoscimento dell'equivalenza di misure specifiche, prestano particolare attenzione alle peculiari esigenze finanziarie, commerciali e di sviluppo dei paesi in via di sviluppo per evitare che le norme internazionali creino inutili ostacoli alle esportazioni di tali paesi e promuovono la coerenza tra gli standard tecnici internazionali e la legislazione in materia alimentare, assicurando al contempo che l'elevato livello di protezione adottato nella Comunità non venga ridotto.

Gli alimenti e i mangimi a rischio non possono essere immessi sul mercato né essere somministrati ad un animale destinato alla produzione alimentare. Un alimento è considerato a rischio se è dannoso per la salute o se è inadatto al consumo umano; un mangime è considerato a rischio se ha un effetto nocivo per la salute umana o animale o se rende a rischio, per il consumo umano, l'alimento ottenuto dall'animale destinato alla produzione alimentare.

La legislazione alimentare impone anche norme relative alla presentazione degli alimenti per cui l'etichettatura, la pubblicità e la presentazione degli alimenti o mangimi, compresi la loro forma, il loro aspetto o confezionamento, i materiali di confezionamento usati, il modo in cui gli alimenti o mangimi sono disposti, il contesto in cui sono esposti e le informazioni rese disponibili su di essi attraverso qualsiasi mezzo, non devono trarre in inganno i consumatori. Norme vincolanti in materia di etichettatura dovranno assicurare che i consumatori dispongano di tutte quelle informazioni sulle caratteristiche del prodotto (composizione, conservazione e suo uso) che gli consentano di effettuare una scelta consapevole.

L'obbligo di garantire che nelle imprese gli alimenti o i mangimi soddisfino le disposizioni della legislazione alimentare in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione e verificare che tali disposizioni siano soddisfatte spetta agli operatori del settore alimentare e dei mangimi. Gli Stati membri sono tenuti all'applicazione della legislazione alimentare, alla verifica del rispetto delle pertinenti disposizioni e alla determinazione delle misure e delle sanzioni da applicare in caso di violazione.

Una politica alimentare efficace richiede anche la rintracciabilità dei percorsi dei mangimi e degli alimenti nonché dei loro ingredienti. Ciò significa che si deve

considerare l'intera catena alimentare, tutti i settori dell'alimentare, tutti gli Stati membri, la frontiera esterna dell'Ue come anche il suo interno, le tribune decisionali a livello internazionale e di Ue nonché tutte le fasi del ciclo decisionale a livello politico.

I ruoli di tutti i partecipanti alla catena alimentare (produttori di mangimi, agricoltori e produttori/operatori del settore alimentare, le autorità competenti negli Stati membri e nei paesi terzi, la Commissione, i consumatori) devono essere chiaramente definiti: i produttori di mangimi, gli agricoltori e gli operatori dell'alimentare hanno la responsabilità primaria per quanto concerne la sicurezza degli alimenti, le autorità competenti hanno compiti di monitoraggio e devono far rispettare tali responsabilità ponendo in atto sistemi nazionali di controllo e di sorveglianza, la Commissione si concentra sulla valutazione della capacità che hanno le autorità competenti di porre in atto tali sistemi per il tramite di audit e ispezioni a livello nazionale. Anche i consumatori devono rendersi conto che sono responsabili dell'adeguata conservazione, manipolazione e cottura degli alimenti. In tal modo la politica "dai campi alla tavola" che copre tutti i settori della catena alimentare, compresa la produzione dei mangimi, la produzione primaria, la lavorazione degli alimenti, l'immagazzinamento, il trasporto e la vendita al dettaglio verrà attuata sistematicamente e in modo coerente.

Viene quindi disposta in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione la rintracciabilità degli alimenti, dei mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime. Gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono essere in grado di individuare chi abbia fornito loro un alimento, un mangime, un animale destinato alla produzione alimentare o qualsiasi sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime. A tal fine detti operatori devono disporre di sistemi e di procedure che consentano di mettere a disposizione delle autorità competenti, che le richiedano, le informazioni al riguardo. Gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono disporre di sistemi e procedure per individuare le imprese alle quali hanno fornito i propri prodotti. Le informazioni al riguardo sono messe a disposizione delle autorità competenti che le richiedano.

Gli alimenti o i mangimi che sono immessi sul mercato della Comunità o che probabilmente lo saranno devono essere adeguatamente etichettati o identificati per agevolarne la rintracciabilità, mediante documentazione o informazioni pertinenti, secondo i requisiti previsti in materia da disposizioni più specifiche.

3. L'Autorità europea per la sicurezza alimentare

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare ha i seguenti organi:

- un consiglio di amministrazione, composto da 14 membri nominati dal Consiglio in consultazione con il Parlamento europeo;
- un direttore esecutivo, nominato dal consiglio di amministrazione, che è il rappresentante legale dell'Autorità;
- un foro consultivo, composto da rappresentanti degli organi competenti che svolgono negli Stati membri funzioni analoghe a quelle dell'Autorità, esso rappresenta un meccanismo di scambio di informazioni sui rischi potenziali e di concentrazione

delle conoscenze;

- un comitato scientifico e gruppi permanenti di esperti scientifici che formulano i pareri scientifici dell'Autorità, ciascuno entro la sfera delle rispettive competenze, compresa la possibilità di disporre, ove necessario, audizioni pubbliche.

Obiettivo principale dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare è quello di contribuire ad un elevato livello di protezione della salute dei consumatori nel campo della sicurezza alimentare e quindi di ripristinare e mantenere la fiducia dei consumatori. L'Autorità deve soddisfare i principi fondamentali dell'indipendenza, agire in modo indipendente da pressioni esterne, dell'eccellenza, assicurare l'eccellenza degli scienziati indipendenti, e della trasparenza, operare con procedure chiare e aperte al pubblico. Contestualmente a tali principi l'Autorità deve dimostrare nelle sue azioni un elevato livello di responsabilità nei confronti delle istituzioni europee e dei cittadini, per tale motivo deve attingere alle migliori conoscenze scientifiche, essere indipendente dagli interessi industriali e politici, essere aperta ad un esame rigoroso da parte del pubblico, essere scientificamente autorevole e operare a stretto contatto con gli organismi scientifici nazionali.

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare offre consulenza scientifica, assistenza scientifica e tecnica per la normativa e le politiche della Comunità in tutti i campi che hanno un'incidenza diretta o indiretta sulla sicurezza degli alimenti e dei mangimi, fornisce informazioni indipendenti su tutte le materie che rientrano in detti campi, comunica i rischi, raccoglie e analizza i dati che consentono la caratterizzazione e la sorveglianza dei rischi, offre consulenza scientifica e assistenza tecnica sulla nutrizione umana.

L'Autorità ha infatti la funzione di offrire consulenza scientifica e assistenza scientifica e tecnica sulla nutrizione umana in relazione alla normativa comunitaria e, su richiesta della Commissione, assistenza per la comunicazione relativa a questioni nutrizionali nel quadro del programma comunitario nel settore della sanità, formulare pareri scientifici su altre questioni inerenti alla salute e al benessere degli animali e alla salute dei vegetali, formulare pareri scientifici su prodotti diversi dagli alimenti e dai mangimi riconducibili a organismi geneticamente modificati.

I compiti dell'Autorità sono quelli di fornire pareri scientifici e informazioni alla Commissione su tutte le questioni che hanno un impatto diretto o indiretto sulla salute e sicurezza dei consumatori in relazione al consumo di alimenti. Per tale motivo essa deve anche commissionare studi scientifici necessari all'espletamento dei suoi compiti e ricercare, raccogliere, confrontare, analizzare e sintetizzare i dati scientifici e tecnici della produzione alimentare primaria (aspetti agricoli e veterinari), dei processi industriali, dell'immagazzinamento, della distribuzione e della vendita al dettaglio. L'Autorità deve quindi porre in atto strumenti per l'identificazione rapida di esperti scientifici nell'Unione europea e altrove e rispondere rapidamente a situazioni mutevoli; deve essere in grado di tenersi aggiornata sui più recenti sviluppi scientifici e identificare le lacune all'interno di ricerche in corso o di determinati soggetti per i quali essa ritiene che si debba avviare rapidamente un lavoro mirato. Deve inoltre essere in grado di garantire una valutazione e una risposta in tempo reale su programmi di monitoraggio e sorveglianza della sicurezza alimentare, assicurando una rapida identificazione dei rischi reali o potenziali. La comunicazione del rischio è un ele-

mento chiave per assicurare che i consumatori siano tenuti informati e per ridurre il rischio che insorgano preoccupazioni infondate inerenti la sicurezza degli alimenti. La comunicazione del rischio non dovrebbe essere una trasmissione passiva di informazioni, ma dovrebbe avere una dimensione interattiva caratterizzata da un dialogo e da un feed back con tutti gli interessati. Essa consiste nello scambio di informazioni tra le parti interessate sulla natura del rischio e sulle misure per controllarlo, deve essere facilmente comprensibile e accessibile relativamente anche a tematiche concernenti la protezione della salute.

L'Autorità si occupa inoltre della salute e del benessere animale e tiene conto delle valutazioni del rischio in altri ambiti, in particolare il settore ambientale e quello chimico quando hanno attinenza con la valutazione del rischio legata agli alimenti.

L'Autorità, su richiesta della Commissione o di propria iniziativa, formula pareri scientifici in relazione a qualsiasi questione di sua competenza e in tutti i casi in cui la legislazione comunitaria richieda la sua consultazione. Laddove individui una sostanziale fonte di discordanza tra i propri pareri scientifici e quelli formulati da altri organi che svolgano compiti analoghi, l'Autorità e l'organo interessato sono tenuti a collaborare allo scopo di rettificare la discordanza o di presentare alla Commissione un documento congiunto che chiarisca la questione scientifica oggetto di controversia e individui nei dati le fonti d'incertezza.

L'Autorità ricerca, raccoglie, confronta, analizza e sintetizza dati scientifici e tecnici significativi nei settori di sua competenza. Ciò comporta in particolare la raccolta di dati riguardanti il consumo degli alimenti e i rischi cui gli individui si espongono consumando gli alimenti, l'incidenza e la diffusione dei rischi biologici, i contaminanti e i residui negli alimenti e nei mangimi.

4. Sistema di allarme rapido, gestione delle crisi e situazioni di emergenza

L'Unione europea necessita di un sistema efficace di monitoraggio e sorveglianza della sicurezza alimentare per una gestione continuativa e giornaliera delle informazioni che diano una risposta in tempo reale ai rischi potenziali. Il sistema di allarme deve comprendere sia gli alimenti che i mangimi.

Gli Stati membri, la Commissione e l'Autorità hanno istituito, sotto forma di rete, un sistema di allarme rapido per la notificazione di un rischio diretto o indiretto per la salute umana dovuto ad alimenti o mangimi. La Commissione è responsabile della gestione della rete. Qualora un membro della rete disponga di informazioni relative all'esistenza di un grave rischio deve trasmettere immediatamente tali informazioni alla Commissione nell'ambito del sistema di allarme rapido e la Commissione dovrà poi trasmettere tempestivamente le informazioni ai membri della rete.

Nell'ambito del sistema di allarme rapido, gli Stati membri notificano immediatamente alla Commissione qualsiasi misura da essi adottata, che esiga un intervento rapido, intesa a limitare l'immissione sul mercato di alimenti o mangimi, o a imporre il ritiro dal commercio o dalla circolazione per proteggere la salute umana.

La partecipazione al sistema di allarme rapido può essere aperta ai paesi candidati, a paesi terzi o a organizzazioni internazionali sulla base di accordi stipulati tra la Comunità e detti paesi o organizzazioni internazionali, secondo le modalità

definite da tali accordi.

Quando sia manifesto che alimenti o mangimi di origine comunitaria o importati da un paese terzo possono comportare un grave rischio per la salute umana, per la salute degli animali o per l'ambiente che non possa essere adeguatamente affrontato mediante misure adottate dallo Stato membro o dagli Stati membri interessati, la Commissione adotta immediatamente, in funzione della gravità della situazione, una o alcune delle seguenti misure: nel caso di alimenti o mangimi di origine comunitaria ci sarà la sospensione dell'immissione sul mercato o dell'utilizzazione dell'alimento o del mangime in questione o una qualsiasi altra misura provvisoria adeguata; nel caso di alimenti o mangimi importati da un paese terzo ci sarà la sospensione delle importazioni dell'alimento o del mangime in questione da tutto il paese terzo interessato o da parte del suo territorio ed eventualmente dal paese terzo di transito o una qualsiasi altra misura provvisoria adeguata.

La Commissione dovrà poi elaborare, in stretta collaborazione con l'Autorità e gli Stati membri, un piano generale per la gestione delle crisi riguardanti la sicurezza degli alimenti e dei mangimi. Il piano generale indicherà i tipi di situazione che comportano, per la salute umana, rischi diretti o indiretti derivanti da alimenti e mangimi, che verosimilmente le disposizioni in vigore non sono in grado di prevenire, eliminare o ridurre a un livello accettabile o che non possono essere gestiti in maniera adeguata.

5. Conclusioni

Negli ultimi anni la fiducia dei consumatori europei è stata profondamente scossa da una serie di crisi ed emergenze che hanno riguardato il campo alimentare, per queste ragioni la Commissione europea ha fatto della sicurezza alimentare una priorità assoluta ed ha emanato il Regolamento (CE) n. 178/2002 che consente di organizzare la sicurezza alimentare in modo più coordinato ed integrato per raggiungere il livello più alto possibile di protezione della salute. È nata così l'Autorità europea per la sicurezza alimentare che si presenta non come una struttura di mero controllo ex-post che opera in isolamento, ma come un veicolo di innovazione tecnologica e di valorizzazione della qualità che lavora in stretta cooperazione con gli organismi scientifici nazionali.

L'Autorità, grazie alla sua indipendenza e all'eccellenza scientifica, diventa il punto di riferimento per i consumatori, l'industria, le autorità nazionali e le istituzioni europee; permette di creare un network di centri di eccellenza, che assicurano l'uso più efficace delle risorse in campo scientifico in tutte le discipline legate alla sicurezza alimentare. In questo modo si può accedere alla più elevata conoscenza scientifica.

Gli organismi e le agenzie alimentari che operano a livello nazionale hanno accesso al lavoro scientifico dell'Autorità e, attraverso questo scambio reciproco, il ruolo di questa struttura potrà diventare progressivamente più importante e centrale. Questo fa dell'Autorità la fonte più autorevole di conoscenza scientifica sulle questioni alimentari in Europa, in grado di garantire un sempre più alto livello di protezione della salute dei consumatori e di ripristinare la fiducia degli stessi nella politica di

sicurezza alimentare dell'Ue.

Con l'assegnazione definitiva a sede dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare Parma si appresta a recuperare un respiro internazionale, che già ebbe nel suo passato quale capitale ducale e centro culturale europeo, ed ora ritrova, per altre vie, divenendo centro per tutti coloro che producono e commercializzano alimenti e che trovano nell'Autorità il massimo interlocutore.

Parole chiave: Autorità alimentare, sicurezza alimentare, Parma.

Key words: Food authority, food safety, Parma.

Mots-clés : Autorité alimentaire, sécurité alimentaire, Parme.

RIASSUNTO - Negli ultimi anni la fiducia dei consumatori europei è stata profondamente scossa da una serie di crisi ed emergenze che hanno riguardato il campo alimentare, per queste ragioni la Commissione europea ha fatto della sicurezza alimentare una priorità assoluta ed ha emanato il Regolamento (CE) n. 178/2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. Il Regolamento disciplina tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti e dei mangimi.

L'analisi mette in evidenza il ruolo che l'Autorità europea per la sicurezza alimentare attualmente occupa nel sistema agroalimentare europeo. Obiettivo principale dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare è quello di contribuire ad un elevato livello di protezione della salute dei consumatori nel campo della sicurezza alimentare, l'Autorità deve soddisfare i principi fondamentali dell'indipendenza, agire in modo indipendente da pressioni esterne, dell'eccellenza, assicurare l'eccellenza di scienziati indipendenti, e della trasparenza, operare con procedure chiare e aperte al pubblico.

La città di Parma, a cui è stata assegnata la sede dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare, si appresta ad accogliere questa importantissima responsabilità e ad acquisire un respiro internazionale; tutti coloro che producono e commercializzano alimenti o mangimi troveranno nell'Autorità, nella città di Parma e nelle sue istituzioni un punto di riferimento obbligato.

SUMMARY - *The role of the European Food Safety Authority in the european agro-food system*

Over the past few years the trust of European consumers has been deeply shaken by a series of crises and emergencies in the food sector, and for this reason the European Commission has made food safety an absolute priority, issuing EC Regulation no. 178/2002 that establishes the general principles and requirements of food legislation, creating the European Food Safety Authority and establishing procedures in the field of food safety. The Regulation governs all phases of production, processing and distribution of food and animal feed.

This analysis highlights the role that the European Food Safety Authority currently plays in the European food processing system. The main objective of the

Authority is to contribute to a high level of consumer health protection in terms of food safety, and the Authority must satisfy some fundamental principles, of independence, acting independently from external pressures, of excellence, assuring the excellence of the independent scientists, and transparency, through publicly accessible, clear procedures.

The city of Parma, which was appointed to host the Authority headquarters, is preparing itself to take on this most important responsibility, and to acquire an international atmosphere; all the producers and traders of food and animal feed will refer to Parma and its institutions as an obligatory point of reference.

RÉSUMÉ – *Le rôle de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments dans le système agro-alimentaire européen*

Ces dernières années, la confiance des consommateurs européens a été profondément ébranlée par une série de crises et de situations d'urgence dans le domaine de l'alimentation. Aussi la Commission européenne a-t-elle fait de la sécurité alimentaire une priorité absolue et édicté le Règlement (CE) n° 178/2002 qui fixe les exigences et les principes généraux de la législation alimentaire, institué l'Autorité européenne pour la sécurité alimentaire et fixé les procédures à respecter en la matière. Le Règlement régit toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution des aliments et de la nourriture pour animaux.

Cette analyse met en exergue le rôle que l'Autorité européenne pour la sécurité alimentaire occupe actuellement dans le système agro-alimentaire européen. Son objectif principal consiste à contribuer à élever le niveau de protection de la santé des consommateurs en matière de sécurité alimentaire. Pour ce faire, elle doit répondre aux principes fondamentaux de l'indépendance, en agissant indépendamment de toute pression extérieure, de l'excellence, en garantissant la qualité de scientifiques indépendants, et de la transparence, en opérant selon des procédures claires et ouvertes au public.

La commune de Parme, qui s'est vu confier le siège de l'Autorité, s'apprête à relever ce défi capital et à acquérir une envergure internationale. Tous ceux qui produisent et commercialisent des aliments et de la nourriture pour animaux trouveront dans l'Autorité, la commune de Parme et ses institutions, une référence absolue.

BIBLIOGRAFIA

- 1) CAIATI G. (1999). Economia e politica della sicurezza alimentare. Rivista di Economia Agraria n. 4.
- 2) COMMISSIONE CE (2000). Libro bianco sulla sicurezza alimentare, Bruxelles.
- 3) G.U. L 31 del 01.12.2002 . Regolamento (CE) N. 178/2002
- 4) ISMEA, FEDERALIMENTARE (2003). Il sistema agroalimentare italiano, profili di uno scenario globale. Ismea-Federalimentare. Roma
- 5) MARIANA., VIGANO' E. (2002). Il sistema agroalimentare dell'Unione Europea, economie e politiche. Carocci Editore. Roma
- 6) PICCININI A. (2000). Politica e agricoltura, la svolta europea del secolo ventunesimo. Franco Angeli Editore. Milano.