



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXVI CICLO)
(Coordinatore: Prof. Sergio Ledda)

**VALIDAZIONE DI UN TEST RAPIDO
PER LA RILEVAZIONE DI ANTIBIOTICI
NEL LATTE OVINO**

Docente Guida

PROF. GIUSEPPE MASSIMO VACCA

Direttore

PROF. SERGIO LEDDA

Tesi di dottorato della

DOTT.SSA GIANPIERA PIRAS

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXVI CICLO)
(Coordinatore: prof. Sergio Ledda)

**VALIDAZIONE DI UN TEST RAPIDO
PER LA RILEVAZIONE DI ANTIBIOTICI
NEL LATTE OVINO**

Docente Guida

PROF. GIUSEPPE MASSIMO VACCA

Direttore

PROF. SERGIO LEDDA

Tesi di dottorato della

DOTT.SSA GIANPIERA PIRAS

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale dell'Università degli Studi di Sassari – XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

Indice

1	Introduzione	Pag.	1
1.1	L'allevamento ovino	”	2
1.2	Il latte ovino	”	11
1.3	Le patologie nell'allevamento ovino	”	19
1.4	Le terapie antimicrobiche nell'allevamento ovino	”	37
1.5	I residui antibiotici nel latte	”	51
1.6	I test per la rilevazione di residui antibiotici nel latte	”	59
2	Scopo della ricerca	”	67
3	Materiali e metodi	”	73
4	Risultati e discussione	”	96
5	Conclusioni	”	119
6	Bibliografia	”	124

Ringraziamenti

1. Introduzione

1.1 L'ALLEVAMENTO OVINO.

La pecora domestica (*Ovis aries*) è un ruminante appartenente all'ordine degli Artiodattili diffuso in tutto il mondo. Il suo allevamento ricopre, sin dall'antichità, un ruolo cardine per lo sviluppo e per la sopravvivenza dell'economia nelle regioni in cui viene praticato (Carta et al., 2009).

Le prime testimonianze risalgono al 6000 a.C., quando, più o meno contemporaneamente in diverse parti del bacino del Mediterraneo e in Asia, inizia ad essere sfruttata con lo scopo di ottenere lana e carne. Per avere una prova concreta di un suo utilizzo ai fini della produzione di latte e formaggi, si deve attendere il 4000 a.C., periodo a cui risalgono i numerosi resti rinvenuti nel sud dell'Asia e in Europa (Chessa et al., 2009). La sua domesticazione, avvenuta nella Mezzaluna Fertile nel corso del Neolitico, ha segnato il passaggio dalla tendenza primitiva della caccia all'animale a nuove pratiche di allevamento. In seguito, le pecore addomesticate iniziarono a diffondersi esternamente al centro d'origine, in tutto il mondo antico, seguendo l'espansione dell'agricoltura e generando, nel tempo, una moltitudine di razze specializzate per lana, carne e latte (Rocha et al., 2011).

Il sistema di allevamento, conservato in alcune parti del mondo anche in epoca recente, era di tipo transumante, con l'utilizzazione del pascolo brado nei terreni in cui, di volta in volta, le popolazioni nomadi si trovavano. Solo con l'insediamento di queste ultime e con lo sviluppo dei primi nuclei abitativi, tale tipologia subisce alcune modifiche, passando ad un'azienda con organizzazione stanziale o semistanziale; rimane costante, tuttavia, lo sfruttamento estensivo dei pascoli, con il pastore che seguiva e spostava le greggi, ritornando solo saltuariamente al villaggio, per la vendita o lo scambio dei prodotti caseari e della carne (Carta et al., 2009).

Nell'Europa romanizzata, specialmente in età imperiale, si è assistito ad un sensibile incremento dell'allevamento ovino. Per le necessità di approvvigionamento dell'esercito, infatti, si affinò una metodica di preparazione del formaggio che è rimasta pressoché immutata nei secoli ed è ancora oggi alla base della preparazione del Pecorino Romano, il quale, intorno alla metà del Novecento, ha ottenuto la qualifica di prodotto a Denominazione di Origine Protetta (DOP). (Regolamento CE 1030, 2009).

L'interesse per gli ovini si intensificò durante tutto il Medioevo, periodo in cui l'allevamento assunse quell'impostazione di tipo semi-estensivo prevalente ancora oggi. La pecora è stata, nel corso dei secoli e in molte parti del mondo, un animale di notevole valore socio economico, fondamentale per lo sfruttamento estensivo dei pascoli meno ricchi, indispensabile per l'utilizzo di terre nuove non pianeggianti e per lo sviluppo di moderne colture atte a soddisfare le proprie esigenze alimentari. Inoltre ha principalmente fornito all'uomo, fin dall'antichità, essenziali fonti di sostentamento come la lana, soprattutto nelle aree caratterizzate da climi freddi, oltre alla carne e al latte (Asso.Na.Pa., 2013).

Quella dell'ovino è una presenza consolidata in tutti i continenti abitati, in costante crescita nelle aree in via di sviluppo e in leggero calo nei Paesi industrializzati. In questi ultimi, infatti, la selezione su base genetica che mira ad incrementare le produzioni dei singoli animali, determina una contrazione delle consistenze, la quale fa sì che sia sufficiente un numero di capi inferiore per soddisfare il fabbisogno richiesto.

L'allevamento ovino può essere suddiviso in tre grandi categorie, in considerazione di quelle che sono le tipologie relative alle razze allevate: da lana, da carne e da latte.

Le razze da lana, tra le prime ad essere selezionate, presentano una diffusione maggioritaria nei paesi del Medio Oriente asiatico, in Oceania e, per quel che riguarda l'Europa, in Spagna, dove si alleva una delle più celebri razze da lana conosciute, la Merino, apprezzata per il suo vello, da cui si ottiene un prodotto molto fine e pregiato. Negli ultimi decenni il consumo della lana ha subito un forte calo a causa del crescente utilizzo delle fibre sintetiche, più economiche sia nella fase produttiva che per il consumatore finale. Questa flessione ha portato ad una diminuzione degli animali allevati, con in testa i Paesi produttori storici, Nuova Zelanda, Australia e Regno Unito (Idda et al., 2010).

Le pecore da carne sono diffuse uniformemente in tutti i continenti ed hanno subito nel corso dei secoli alcune caratterizzazioni locali che hanno portato a differenziare centinaia di razze specializzate. Tra tutte assume un ruolo predominante, almeno per quel che riguarda i Paesi europei e il nord America, la Suffolk, razza anglosassone definita nella metà dell'Ottocento, la quale ha avuto, e ha ancora, un forte ruolo nell'insanguamento delle razze locali.

L'ovino da latte è allevato prevalentemente nei Paesi dell'Unione Europea, in particolar modo in quelli del bacino del Mediterraneo. Esistono differenti razze con questa attitudine, spesso autoctone e caratteristiche di particolari regioni, dalle quali derivano una miriade di prodotti lattiero caseari.

Come si evince dai dati FAO relativi al 2011 (FAOSTAT, 2011; Tabella 1), l'Asia, in cui si allevano circa 466 milioni di capi, è lo stato con la maggiore presenza numerica, seguita dall'Africa, con 305 milioni, e dall'Oceania, dove si segnalano poco più di 104 milioni di ovini. L'Europa e le Americhe si trovano rispettivamente in quarta e quinta posizione, con 97 e 91 milioni circa di capi. Per quel che riguarda l'Asia, l'Africa e l'Oceania, l'allevamento ovino è specializzato principalmente in razze da carne e da lana.

Tabella 1. Patrimonio ovino e produzioni di latte e carne (FAOSTAT, 2011).

Continente	Capi allevati	Tonnellate Latte	Tonnellate Carne
Asia	466.058.951	4.543.499	4.106.984
Africa	304.670.813	2.147.318	1.524.955
Oceania	104.247.230	-	977.623
Europa	97.061.529	3.038.316	1.164.310
America	91.057.519	40.607	403.489
Totale	1.063.096.042	9.769.740	8.177.361

La Cina, forte del numero dei capi allevati, detiene il record per produzione di carni ovine, con 2.050.000 tonnellate, seguita dall'Australia con circa 512.000 tonnellate, e dalla Nuova Zelanda con poco più di 465.000 tonnellate (Tabella 2).

Tabella 2. Primi dieci Paesi produttori di carni ovine (FAOSTAT, 2011).

Paese	Capi allevati	Tonnellate carne
Cina	138.840.000	2.050.000
Australia	73.098.761	512.235
Nuova Zelanda	31.132.329	465.318
India	74.500.000	293.400
Regno Unito	31.634.000	289.000
Algeria	23.989.330	253.204
Turchia	23.089.691	253.000
Sudan	39.296.000	183.000
Siria	18.071.000	172.429
Nigeria	38.000.000	171.600

Tra questi Paesi, soltanto la Cina associa alla produzione di carne una consistente produzione di latte, ma, nonostante il suo quantitativo risulti essere il più alto al mondo (1.529.000 tonnellate), data l'incredibile mole di animali allevati, essa risulta proporzionalmente inferiore al volume di latte prodotto dai Paesi europei.

L'Europa si può a buon diritto considerare la culla dell'ovino da latte. Qui si sono affinate le tecniche di allevamento e qui soprattutto si sono raggiunti i massimi

livelli produttivi in questo settore, grazie a strategie di selezione genetica volte all'innalzamento del quantitativo e al miglioramento qualitativo del latte, prodotto da ogni singolo capo.

Tra i Paesi europei, la Grecia, che vanta una lunga tradizione pastorale, è il più grande produttore di latte ovino, con 773.000 tonnellate ogni anno. Seguono la Romania (632.913), la Spagna (519.600) e l'Italia, con 417.839 (Tabella 3).

Tabella 3. Primi dieci Paesi produttori di latte ovino (FAOSTAT, 2011)

Paese	Capi allevati	Tonnellate Latte
Cina	138.840.000	1.529.000
Turchia	23.089.691	892.822
Grecia	8.956.000	773.000
Siria	18.071.000	705.554
Romania	8.417.437	632.913
Somalia	12.250.000	590.400
Spagna	17.002.700	519.600
Iran	49.000.000	449.000
Italia	7.900.016	417.839
Sudan	39.296.000	390.000

Un'importante valutazione va fatta a proposito degli Stati di recente ingresso nella UE (quali ad esempio la stessa Romania) che vanno in controtendenza rispetto agli altri Paesi dell'Unione per quel che riguarda il numero di animali allevati. In queste Nazioni l'industrializzazione del comparto caseario ed i nuovi macchinari utilizzati per agevolare il lavoro dell'allevatore (dalle mungitrici meccaniche alle semplici tosatrici elettriche) non si sono ancora pienamente affermati, e per far fronte alla richiesta del consumatore si è dovuta incrementare la quantità degli animali (FAOSTAT, 2011).

Per quel che riguarda l'Italia, invece, occorre sottolineare che, fino agli inizi di questo secolo, la nostra penisola ha occupato una posizione di dominanza sul

mercato, sino a quando, con il taglio del numero dei capi allevati e la contemporanea crescita di altri Paesi quali la Francia e la Spagna, e il già citato ingresso in UE di Paesi dell'est europeo, si è verificata una diminuzione della quota di mercato, che è passata da circa il 26% a circa il 19% attuale (Idda et al., 2010).

All'Italia spetta circa il 6% della produzione mondiale di latte ovino, nonostante una consistenza di animali, concentrata principalmente nelle aree mediterranee, di non oltre l'1% del patrimonio mondiale. Le Regioni italiane migliori produttrici di latte ovino sono quelle del centro-sud, capeggiate dalla Sardegna che da sola detiene circa un terzo del patrimonio ovino nazionale e fornisce il 40% della produzione di latte nazionale, seguita da Lazio, Toscana, Sicilia e Puglia (IZS, 2013).

L'allevamento ovino in Sardegna e la pecora Sarda.

Gli ovini rappresentano per la Sardegna una delle principali risorse economiche e la loro presenza è talmente radicata nella cultura popolare da rappresentare, agli occhi di chi visita la nostra isola, una parte indissolubile della terra che li nutre, un elemento quasi sacro del paesaggio, da ritrarre in foto e in dipinti o da raccontare in opere letterarie e in resoconti di viaggio come nel caso di D.H. Lawrence, ad esempio, che nel suo "Mare e Sardegna" descrive le pecore sarde come "*molto bianche e brillanti*", tanto da far venire in mente il "*bianco come la lana*" delle sacre scritture.

L'allevamento ovino è diffuso praticamente in tutto il territorio sardo, dalle zone collinari alle aree interne di montagna, fino ai comprensori irrigui di pianura, e comprende poco meno di 13.000 imprese zootecniche (ISTAT, 2009; ISTAT, 2010) concentrate soprattutto nella provincia di Sassari, dove vengono allevati circa un terzo degli animali dell'isola (IZS, 2013).

Il sistema tradizionale di allevamento, basato sullo sfruttamento dei pascoli naturali, può definirsi estensivo o semi-estensivo; in Sardegna, infatti, sono disponibili per il pascolo circa 1.900.000 ettari. Nel corso dell'anno il ciclo produttivo della pecora è collegato al ciclo produttivo dei pascoli, il quale a sua volta è condizionato dall'andamento climatico tipicamente Mediterraneo. Perciò, il piano alimentare è integrato solitamente dal supplemento di mangimi concentrati e foraggi, prodotti o meno in azienda, soprattutto nei periodi estivi, nel tardo autunno e in inverno, in cui le disponibilità di erba fresca scarseggiano a causa delle precipitazioni irregolari e insufficienti (Casu, 1971).

Per quel che riguarda la struttura e il livello di diffusione degli allevamenti, occorre sottolineare la persistenza di accentuate condizioni di frammentazione che mostrano differenti dimensioni aziendali, variabili da zona a zona, con consistenze medie del gregge pari a circa 220 capi ed un'elevata incidenza di imprese con meno di 100 capi ciascuna (25% sul totale) (ISTAT, 2009).

L'allevamento ovino in Sardegna ha un indirizzo riservato alla produzione di latte quasi esclusivamente destinata alla trasformazione casearia, per la quale nel corso dei secoli si è selezionata una razza ad esclusiva attitudine lattifera, la Sarda. L'importanza e la diffusione di questa razza, con un patrimonio stimato di oltre 3.400.000 capi, ha reso necessaria l'istituzione di un vero e proprio libro genealogico, riguardante all'inizio solo la provincia di Cagliari e poi estesosi alle altre province (Pau, 2006). Gli allevamenti sardi producono circa 350.000 tonnellate di latte e 30.000 tonnellate di carne (ISTAT, 2010), irrisorio può invece ritenersi il valore di mercato della lana per la scarsa resa che ha alla filatura; di fatto, il suo utilizzo per la tessitura è relegato quasi esclusivamente alla creazione dell'orbace, tessuto tipico della regione sarda, utilizzato in particolare per la produzione degli abiti tradizionali (Cau, 2008).

La carne, prodotta unitamente al latte, trova collocazione sul mercato prevalentemente come agnello da latte o Agnello IGP di Sardegna secondo il disciplinare stabilito dal Regolamento CE 183 del 2001, macellato a circa un mese di vita ad un peso vivo di 9-11 kg. Si tratta di una produzione tipica che coincide con le festività natalizie e, in misura minore, pasquali, in occasione delle quali il prodotto riesce a spuntare quotazioni accettabili. Al di fuori di queste finestre stagionali, la carne di agnello non appare sufficientemente apprezzata. Risulta infatti trascurabile il valore attribuito alla carne di individui adulti o agnelloni, macellati a 4-5 mesi di età, a causa della cospicua deposizione di grasso (Idda et al., 2010).

La sua capacità produttiva (circa 180 litri di latte in 180 giorni di lattazione standard) ha fatto sì che si diffondesse anche in altre parti d'Italia, dove è stata utilizzata per incrociare o sostituire direttamente le razze locali. In tutta la penisola si allevano oltre quattro milioni di ovini di razza Sarda, di cui circa 350.000 iscritti al Libro Genealogico (Asso.Na.Pa., 2012).

Dal punto di vista morfologico la pecora Sarda è un animale di taglia medio-piccola, con altezze al garrese comprese tra i 63 ed i 71 cm e pesi di circa 37-45 kg e 56-64 kg, rispettivamente per le femmine ed i maschi. La testa è leggera, con profilo diritto o leggermente montonino nei maschi, faccia bianca ed occhi vivaci; orecchie medio-piccole e corna assenti o poco sviluppate. Il corpo è armonico, con una struttura meso-dolicomorfa; tronco allungato con lunghezza di 74 cm nei maschi e 64 cm nelle femmine, coperto da un vello bianco, aperto, costituito da boccoli appuntiti, di lunghezza compresa tra i 10 ed i 15 cm. La lana che si può ricavare da ciascun animale varia da 1 kg circa per le pecore ai 2-2,5 kg per gli arieti.

La resa alla macellazione è tra le più basse per le carni ovine, con soltanto il 44-45%, a cui va aggiunto il fatto che per tradizione il consumo di carne ovina in Sardegna riguarda in maniera prevalente quello dell'agnello da latte.

Nelle femmine la componente selettiva predominante è quella relativa alla conformazione della mammella. Una mammella di pecora Sarda deve essere sferica, voluminosa, ben sostenuta, forte negli attacchi e ben definita nelle emimammelle; con capezzoli proporzionati e dritti che guardano verso il basso; deve avere una consistenza morbida, spugnosa, elastica e quasi floscia dopo la mungitura (Asso.Na.Pa., 2012). Soprattutto negli ultimi decenni, con l'avvento delle mungitrici meccaniche, questo aspetto ha assunto notevole importanza nella scelta della rimonta.

1.2 IL LATTE OVINO.

Il latte è una miscela eterogenea costituita da proteine, grassi, lattosio e minerali, in equilibrio tra loro, presenti in varie fasi (emulsioni, sospensioni colloidali e soluzioni solubili) e dispersi in soluzione acquosa (Ramos e Juarez, 2011).

Per la legislazione italiana il latte di ogni specie lattifera rappresenta "il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, completa ed ininterrotta di animali in buono stato di salute, di alimentazione e in corretta lattazione"; quando non è precisata la specie come "latte", si intende esclusivamente il latte vaccino (Corradini, 1995).

Il latte di pecora presenta notevoli differenze rispetto al latte bovino: una maggiore specifica gravità, viscosità, indice di rifrazione e un punto di congelamento più basso (Haenlein e Wendorff, 2006). Inoltre è leggermente più acido del latte di vacca, probabilmente a causa dell'elevato contenuto proteico, ed è più resistente alla proliferazione di batteri nelle prime ore dalla mungitura, grazie alla sua maggiore attività immunologica. Possiede l'odore caratteristico dell'animale che lo produce ed è di colore bianco opaco (Ramos e Juarez, 2011) rispetto al latte di vacca che invece è giallastro a causa della presenza di carotene (Folch e Sanchez, 1993).

La sua composizione, come nelle altre specie, è influenzata da molteplici fattori quali la genetica, la razza, lo stadio di lattazione, il parto, l'alimentazione, la stagione e le condizioni in cui gli animali vengono allevati (Ledda, 1992).

Il principale elemento condizionante è la razza. Razze selezionate ad elevata attitudine lattifera, infatti, producono un latte con un più basso livello di solidi totali. Un altro fattore da considerare è lo stadio di lattazione (Ramos e Juarez, 2011) dal quale emerge che le curve di grasso e proteina sono inversamente speculari a quelle di produzione e riflettono le variazioni quanti-qualitative del contenuto calorico della

razione. Inoltre esse sono generalmente correlate e decorrono parallelamente durante tutto l'arco della lattazione; tipicamente, presentano lo stesso declino durante le prime settimane, aumentano gradualmente dopo il primo mese, per poi riabbassarsi in coincidenza del picco e quindi risalire progressivamente a fine lattazione. Al termine dei sette mesi di lattazione, il tenore di materia grassa può presentarsi all'8,1-10% e il contenuto proteico al 6,8-8,9% (Ramos e Juarez, 2011). Contrariamente, quando vi sono squilibri a livello ruminale, le curve dei solidi del latte non aumentano al declinare della curva di produzione, mentre il contenuto di lattosio scende leggermente per tutta la lattazione (Jooyandeh e Alberoumand, 2010).

La Tabella 4 mostra la composizione specifica del latte ovino, che generalmente contiene una maggiore quantità di solidi totali, e delle principali sostanze nutritive, come proteine di alta qualità, calcio, fosforo e lipidi, rispetto al latte di capra e di vacca (Jooyandeh e Aberoumand, 2010; Ramos e Juarez, 2011).

Tabella 4. Composizione del latte ovino (da Ramos e Juarez, 2011).

Componente	contenuto medio %	intervallo %	sostanza secca %
Acqua	81,60	79,27–83,80	
Lattosio	4,61	4,10–4,95	25,0
Grasso	7,09	5,10–8,70	38,5
Proteine	5,72	4,75–6,60	31,1
Caseine	4,44		
Sieroproteine	0,98		
N non proteico	0,047		
Ceneri	0,91	0,70–1,10	4,9
Solidi totali	18,40	16,20–20,73	
Solidi non-grassi	11,31		

Se comparato al latte della specie bovina (Tabella 5), infatti, il latte di pecora presenta tratti singolari relativi in particolare al tenore di grassi e alle proteine.

Tabella 5. Principali caratteristiche del latte ovino e bovino.

	latte di pecora Sarda	latte vaccino
Proteine totali	5.64	3.28
Caseine	4.49	2.54
Lipidi	6.93	3.68
Lattosio	4.84	4.82
pH	6.68	6.64

Entrambi gli elementi sono di netto superiori nel latte ovino e rappresentano i principali costituenti della materia secca, espressi con percentuali del 69% nel latte di pecora contro il 56% nel latte vaccino. Questo caratterizza non soltanto le capacità di caseificazione (la resa di formaggio è più alta di circa il 15 % per il latte ovino rispetto al 10 % di quello vaccino), ma anche il tipico sapore del latte ovino destinato al consumo umano e le sue proprietà organolettiche (Ramos e Juarez, 2011).

I lipidi sono la componente più variabile del latte e quella che maggiormente incide sui costi, sul valore nutrizionale e sulle caratteristiche fisiche e sensoriali dei prodotti caseari (Park et al., 2007).

Il fattore più importante che condiziona la composizione in acidi grassi nel latte è l'alimentazione. In particolare, essi sono influenzati sia dalla fibra nella razione sia dall'aggiunta di supplementi lipidici alla dieta (Bocquier e Caja, 2001), ma anche dalle riserve energetiche dell'animale.

La frazione lipidica del latte di pecora è costituita nella quasi totalità da trigliceridi (circa il 98%), da lipidi semplici (diacilgliceroli, monoacilgliceroli, esteri del colesterolo), e solo in piccolissima parte da lipidi complessi (fosfolipidi) e da composti liposolubili (steroli, esteri del colesterolo, idrocarburi)(Park et al., 2007).

La caratteristica principale del latte dei piccoli ruminanti è l'elevato contenuto di acidi grassi a media e corta catena (MCFA). Questi ultimi hanno un metabolismo diverso da quello degli acidi grassi a lunga catena (Gurr, 1995; Bach et al., 1996) e

costituiscono un rapido approvvigionamento energetico, soprattutto per i soggetti che soffrono di malnutrizione o sindrome da malassorbimento di grasso (Raynal-Ljutovac et al., 2008). Tra quelli a corta catena, presentano un quantitativo più elevato rispetto al latte vaccino e minore rispetto a quello caprino, gli acidi capronico, caproleico e caprinico, i quali sono i responsabili del caratteristico sapore e odore dei formaggi ovis e possono essere utilizzati anche per rilevare frodi alimentari dovute a miscele di latte da specie differenti (Ramos e Juarez, 2011).

I grassi si trovano in emulsione nella fase acquosa del latte sottoforma di globuli. Un'altra rilevante peculiarità è proprio la loro dimensione. Alcuni studi, infatti, hanno dimostrato una maggiore percentuale di globuli di grandezze medie inferiori rispetto al latte vaccino (Mehaia, 1995; Attaie e Richter, 2000). Questo aspetto appare vantaggioso in quanto conferisce maggiore digeribilità e un metabolismo dei lipidi più efficiente rispetto ai grassi del latte vaccino (Park, 1994). Nessuna differenza apprezzabile è stata riscontrata nel meccanismo di secrezione del globulo di grasso, nonché nella struttura e nella composizione della membrana che è simile nelle tre specie (Scolozzi et al., 2003).

Tra gli acidi grassi saturi a lunga catena (Tabella 6), la presenza più forte è quella degli acidi palmitico e stearico, mentre, per quel che riguarda i monoinsaturi, si riscontrano i valori maggiori per l'acido oleico. Gli acidi polinsaturi, in bassa percentuale, sono rappresentati in maniera esclusiva dagli acidi linoleico e linolenico.

Tabella 6 – Principali acidi grassi presenti nel latte ovino

	% sul totale dei grassi
Grassi saturi totali	4,21
C12:0 - Laurico	0,42
C14:0 - Miristico	0,01
C16:0 - Palmitico	1,58
Grassi monoinsaturi totali	1,45
C14:1 - Miristoleico	0,02
C18:1 - Oleico	1,28
C20:1 - Eicosaneico	0,03
Grassi polinsaturi totali	0,26
C18:2 W6 - Linoleico	0,13
C18:3 W3 - Linolenico	0,04

A seguito del processo di caseificazione la componente grassa aumenta con il prolungare del periodo di stagionatura del formaggio. Questo fattore non trascurabile, in quanto alcuni degli acidi grassi monoinsaturi presenti, in particolar modo il palmitico ed il miristico, svolgono un ruolo nell'eziologia delle malattie cardiovascolari dell'uomo, andando ad incrementare il rischio d'infarto o di trombi (La Rocca, 2007).

Le caratteristiche negative legate agli acidi grassi sono però ben bilanciate da quelle positive, in particolar modo dalle conosciute proprietà antinfiammatorie dell'acido linoleico (e dei suoi isomeri posizionali e geometrici), dotato di potere stimolante e consolidante il sistema immunitario grazie all'azione antiossidante e alle proprietà antitumorali e antiaterogeniche (Khanal 2004; Parodi 2004; Lee et al., 2005).

Dal punto di vista proteico, il contenuto medio nel latte di pecora (5,8%) è superiore a quello di capra (4,6%) e di vacca (3,3%), ed è influenzato oltre che dalla specie, da variabili fisiologiche, climatiche e manageriali (Park et al., 2007). La frazione proteica del latte comprende le caseine che rappresentano la componente principale (nel latte ovino: 76%-83%) delle proteine totali; le sieroproteine solubili

(α -lattoalbumina e β -lattoglobulina) che costituiscono circa il 17-22% nell'ovino (Ramos e Juarez, 2011) e le proteine minori del latte.

Le caseine sono proteine globulari (fosfoproteine e glicoproteine), sintetizzate esclusivamente dall'alveolo mammario, presenti nel latte in dispersione colloidale sotto forma di micelle, le quali sono costituite da sub-micelle, e ciascuna sub-micella a sua volta dalle quattro frazioni caseiniche. Le sub-micelle, attraverso ponti fosfato di calcio, si associano per costituire micelle di diametro maggiore. Le strutture micellari dei piccoli ruminanti differiscono da quelle del latte di vacca per il diametro medio e per il grado di idratazione e di mineralizzazione (Park et al., 2007). Le caseine precipitano a pH 4,6 a temperatura ambiente, mentre nelle stesse condizioni le proteine del siero del latte rimangono solubili (Ramos e Juarez, 2011).

Le principali caseine dei ruminanti sono la α 1-caseina, la α 2-caseina, β -caseina e κ -caseina. Quest'ultima, particolarmente importante ai fini della rapidità nella formazione del coagulo del latte e della sua resistenza, condiziona notevolmente l'efficienza del processo di caseificazione (Park et al., 2007).

Le proteine del siero dopo la coagulazione delle caseine si ritrovano nel siero di latte, sono ricche in aminoacidi essenziali, come triptofano e lisina (Raynal-Ljutovac et al., 2008), e perciò vantano un elevato valore biologico che le rende piuttosto interessanti per la formulazione di integratori ad uso umano. Se confrontato con il latte di altri mammiferi, il latte ovino è caratterizzato dal più alto contenuto di β -lattoglobulina, proteina responsabile del trasporto degli acidi grassi e del retinolo, caratterizzato da attività antiossidante e da proprietà anticancerogene e antivirali (Król et al., 2008). L' α -lattoalbumina, invece, è una metallo-proteina contenente un atomo di calcio in ciascuna molecola ed è importante dal punto di vista biologico in quanto è coinvolta nella sintesi lattosio (Ramos e Juarez, 2011).

Tutte le lattoproteine, sia le quattro frazioni caseiniche che le due principali sieroproteine, presentano polimorfismi genetici, cioè variazioni della sequenza nucleotidica che causano alterazioni importanti nella struttura della proteina codificata e, di conseguenza, delle proprietà tecnologiche e nutrizionali del latte.

Le proteine del latte di pecora e capra sono anche importanti fonti di peptidi “bioattivi”, cioè di sostanze che pare abbiano effetti benefici sulla salute umana. Questi sembrano agire come modulatori fisiologici di vari processi biologici quali la difesa immunitaria, l’assunzione di nutrienti, il trasferimento di informazioni neuroendocrine, il metabolismo del calcio e la mineralizzazione dell’osso, l’ipertensione, la prevenzione di patologie come tumori e malattie cardiovascolari (Park et al., 2007).

Di grande interesse anche le proteine minori del latte, le quali includono immunoglobuline, lattoferrina, transferrina, ferritina, peptone proteoso, calmodulina (calcio binding protein), prolattina, e la proteina folato-binding. La lattoferrina, precisamente, possiede note proprietà antibatteriche e contribuisce alla protezione da agenti microbici esterni, grazie alla sua azione di lisi sulla membrana batterica dei Gram-negativi (Viejo Díaz, 2004).

Le proteine totali del latte di capra e di pecora rappresentano, in molti Paesi, uno dei principali criteri per i pagamenti in base alla qualità (Raynal -Ljutovac et al., 2005 ; Pirisi et al., 2007).

Per quel che riguarda i glucidi, il lattosio è il principale carboidrato del latte ed è presente nel latte ovino con tenori che sono molto vicini a quelli del latte vaccino, attestandosi sui 4,84-4,88 punti percentuali (Mura et al., 2012), contro i 4,82-4,85 del lattosio rinvenibile in vacche di razza Frisona e Bruna (Bittante, 2011).

Il pH mostra leggere variazioni a seconda dello stadio di lattazione, con i valori minimi che si presentano all’inizio ed alla fine della lattazione. La media dei

valori di una lattazione è di 6,68 (Pazzola et al., 2013) contro i 6,64 registrati in bovine da latte (Cipolat-Gotet et al., 2013).

Le concentrazioni di minerali nel latte dei piccoli ruminanti sono di gran lunga superiori rispetto a quelle del latte umano, anche se non si trovano sempre in quantità costanti, in quanto vengono influenzate da diversi fattori che riguardano l'animale (razza, fase di lattazione, stato nutrizionale e salute della mammella), da fattori ambientali (alimentazione) e da fattori genetici (Park e Chukwu, 1988). Tra i minerali, gli elementi più importanti sono il Ca, P, K, Na e Mg. Calcio e fosforo assumono particolare rilievo sia in termini nutrizionali che per il loro ruolo nella struttura della micella caseinica e quindi nel comportamento delle caseine durante la lavorazione del latte (Ramos e Juarez, 2011).

1.3 LE PATOLOGIE NELL'ALLEVAMENTO OVINO.

Un adeguato management in allevamento è estremamente importante e rappresenta un fattore fondamentale per la tutela del benessere animale; di fatto condizioni aziendali non ottimali riducono la quantità e la qualità delle produzioni e favoriscono lo sviluppo di patologie.

Le malattie degli animali da reddito, soprattutto quelle trasmissibili, stanno acquisendo oggi un interesse sempre più rilevante, non solo perché diffusibili e seriamente rischiose per la salute pubblica, ma anche perché in grado di determinare danni economici dovuti alle restrizioni che vengono imposte alla libera commercializzazione, sia degli animali vivi che dei prodotti di origine animale, provenienti dalle zone colpite. Questo indica che lo stato sanitario delle popolazioni animali allevate, l'assenza nel proprio territorio di agenti di malattie trasmissibili e il poter garantire tale condizione di indennità nei confronti di determinate infezioni rappresentano un valore aggiunto essenziale per lo sviluppo di una moderna zootecnia proiettata nell'attuale sistema produttivo globalizzato oltre che un'opportunità di crescita per Paesi rimasti a lungo ai margini dell'economia.

Non si può pensare alla sanità umana senza collegarla al mondo animale. In particolare, le malattie degli animali da reddito condizionano negativamente le produzioni animali in tutto il mondo con conseguenze drastiche sull'alimentazione umana, sulla qualità e sulla sanità dei prodotti di origine animale. Questi effetti si traducono direttamente in una possibile diffusione di patogeni attraverso gli alimenti, e indirettamente in una diminuzione delle condizioni di benessere degli animali (Roger, 2008) e nella possibilità che i trattamenti farmacologici sugli animali generino eventuali residui di farmaci in carne e latte. La presenza di taluni residui antibiotici nel latte rappresenta un potenziale rischio per i consumatori poiché essi possono essere tossici, pericolosi per la salute umana e causare antimicrobico-

resistenza (Demoly e Romano, 2005; Wilke et al., 2005); inoltre possono provocare problemi tecnologici durante la fabbricazione di prodotti lattiero-caseari (Nagel et al., 2012).

E' opportuno puntualizzare che tutte le malattie infettive e parassitarie sono malattie trasmissibili. Per malattia trasmissibile si intende una malattia il cui agente causale può essere trasferito da un individuo ad un altro (Farina e Scatozza, 1998). Una malattia può essere *trasmissibile* ma *non contagiosa* nel caso in cui per la sua trasmissione sia necessario un vettore.

L'allevamento ovino è caratterizzato da una elevata incidenza di patologie di natura infettiva e parassitaria e di altre disfunzioni, tra le quali meritano di essere menzionate anche le dismetabolie (per esempio quelle legate alla gravidanza come chetosi, alcalosi, acidosi), quali manifestazioni di eventuali squilibri alimentari del rapporto fibra-proteina e di una mancata rispondenza dei piani alimentari e della qualità degli alimenti rispetto ai fabbisogni nutrizionali del gregge.

Le malattie parassitarie.

Le malattie parassitarie degli animali da reddito, seppur con incidenze diverse nelle aree sviluppate e in quelle in via di crescita, sono ampiamente distribuite in tutto il mondo (Perry e Randolph, 1999) ed in particolare nel nostro territorio, dove costituiscono uno dei problemi più frequenti e più critici nel settore dell'allevamento dei piccoli ruminanti, con un notevole impatto sull'economia e sulla gestione aziendale.

La Sardegna presenta un singolare quadro epidemiologico derivante da coesistenti condizioni che si intersecano (consistente patrimonio ovino, habitat favorevole, caratteristiche tecniche di conduzione semibrado, tipo di alimentazione, momento della fase produttiva, ciclo biologico del parassita), le quali rendono

inevitabile e talvolta favoriscono la presenza di parassiti all'interno delle greggi di pecore o capre. È necessario mettere in risalto, inoltre, che la pratica del pascolo, tipicamente diffusa nell'allevamento ovino dell'Isola, rappresenta il principale fattore di rischio, in quanto favorisce il completamento del ciclo vitale della maggior parte delle specie parassitarie che colpiscono gli ovini e, pertanto, la diffusione di questi. Gli ovini sono parassitati da una vasta gamma di parassiti interni ed esterni (Taylor, 2010).

Anche se raramente letali, le parassitosi, soprattutto quelle causate da parassiti interni, sono la causa più comune di diarrea, riduzione dell'incremento ponderale e perdita di peso, anemia, ritardi nella crescita, alterazione delle performance riproduttive e, di conseguenza, accorciamento della carriera produttiva, con notevoli danni economici dovuti all'aumento dei costi di produzione e alle perdite sia in termini di latte che di carne (Miller et al., 2012). Per di più, possono determinare un'accentuazione di patologie microbiche e virali, se contemporaneamente presenti nell'animale.

La frequenza e la predominanza delle specie parassitarie è strettamente legata al clima, all'area geografica e al sistema di allevamento (alimentazione, densità degli animali, ecc.). La situazione epidemiologica italiana è caratterizzata dalla presenza importante di endoparassiti quali i protozoi del genere *Eimeria* e *Toxoplasma*, nematodi gastrointestinali e broncopolmonari, sia nelle greggi ovine che in quelle caprine (Rinaldi et al. 2007; Garippa et al. 2008; Manfredi et al 2010).

Le teniasi ed in particolare l'echinococcosi-iatidiosi è considerata una delle più importanti parassitosi di interesse zoonosico che continua a imperversare nei territori della nostra Isola, dove il binomio pecora-cane è notevolmente diffuso. Un'altra malattia parassitaria da non sottovalutare in allevamento è la coccidiosi, causata da protozoi; colpisce giovani agnelli e capretti di 1-2 mesi che si infestano durante i loro

primi anni di vita (Andrews, 2013), interessando la mucosa del piccolo intestino. La terapia specifica consiste nella somministrazione per via orale di sulfamidici. Nei casi più gravi può essere valido anche l'uso di altri antibiotici per le infezioni secondarie e una terapia sintomatica con sostanze idratanti e ricostituenti generali.

Non trascurabile è inoltre l'effetto delle ectoparassitosi sullo stato sanitario dei piccoli ruminanti, specialmente delle infestazioni da zecche, legato alla loro ben nota capacità vettoriale nei confronti di *Babesia*, *Coxiella*, *Theileria*, *Anaplasma* e altri microrganismi.

Per le loro peculiarità le malattie parassitarie costituiscono un problema difficilmente eliminabile, che richiede un costante monitoraggio. Una corretta diagnosi rappresenta il punto cruciale per il loro controllo, merita quindi una grande attenzione per gli effetti negativi che questo gruppo di malattie possono avere sullo stato di salute, di benessere e di produttività dei ruminanti, principalmente di pecore al pascolo (Demeler et al., 2012). Inoltre, risulta determinante per poter stabilire appropriati programmi antiparassitari completamente efficaci.

Relativamente alle patologie di natura infettiva, distinguiamo quelle causate da virus e quelle da batteri.

Le patologie virali.

Nell'ambito delle malattie che affliggono il comparto dei piccoli ruminanti, quelle causate dai virus generano un forte impatto all'interno della sanità animale determinando gravi danni sull'economia aziendale e talvolta negative ripercussioni nel contesto sociale. Difatti, focolai di malattie infettive virali possono presentarsi come delle zoonosi e quindi temibili per la salute dell'uomo.

I virus costituiscono un gruppo di agenti infettivi in grado di colpire cellule animali, vegetali e batteriche. Essi sono dei parassiti strettamente obbligati sia delle

cellule eucariotiche (virus propriamente detti) che procariotiche (batteriofagi) e pertanto, necessitano di cellule viventi per la loro replicazione e sopravvivenza (Patel et al., 2012).

Per quanto riguarda il trattamento e il controllo delle infezioni virali rappresentano, a livello globale, una delle problematiche più urgenti della sanità pubblica umana e veterinaria. Gli “antivirali” agiscono bloccando il processo di replicazione del virus, ma presentano un campo d’azione piuttosto limitato, sono caratterizzati da elevata tossicità e sviluppano resistenza molto facilmente. Per queste ragioni la miglior terapia rimane la prevenzione che si basa su vaccini, quando questi sono disponibili. Assumere antibiotici durante le infezioni virali sicuramente non le elimina, ma è noto che queste talvolta sono aggravate da patologie batteriche secondarie. Ebbene, somministrare antibiotici nel corso di una malattia virale potrebbe essere d’ausilio per prevenire queste complicanze.

Tra le patologie virali, in Sardegna, la *Blue Tongue* (BT) o Febbre catarrale degli ovini rappresenta da un decennio un’emergenza sanitaria per la sua complessità e le devastanti ripercussioni sul patrimonio ovino isolano. È una malattia infettiva trasmissibile (viene trasmessa da artropodi vettori ematofagi del genere *Culicoides*), non contagiosa, che colpisce i ruminanti domestici ed altre specie selvatiche. L’infezione è caratterizzata da una elevata mortalità e da una sintomatologia molto grave negli ovini, contraddistinta principalmente da edema, congestione della mucosa orale e cianosi della lingua.

Nella diagnosi differenziale di *Blue Tongue* va considerata un’altra malattia virale altamente infettiva, che mostra un’alta incidenza negli allevamenti della nostra regione, l’Ectima contagioso, la quale si può presentare con sintomi clinici (lesioni alla mucosa orale), simili alla BT. L’Ectima contagioso, a differenza della BT, è una zoonosi e provoca nell’uomo una patologia dermatologica ben caratterizzata

chiamata "Orf". Crea perdite di bestiame e costi notevoli nella gestione economica nella maggior parte dei paesi che allevano pecore e capre a scopo commerciale (Hosamani et al., 2009).

In Sardegna, altre patologie dei piccoli ruminanti che costituiscono un problema di tipo sanitario ed economico sono le Lentivirosi, le quali vengono in questi ultimi anni segnalate sempre con maggiore frequenza. Causano molteplici sindromi e malattie infiammatorie progressive e debilitanti nei piccoli ruminanti (Adedeji et al., 2013) che includono la Maedi Visna, una malattia infettiva tipica degli ovini che può presentarsi in due forme cliniche: una polmonite interstiziale progressiva (Maedi) ed una forma di leucoencefalomielite (Visna). L'infezione è caratterizzata da un lungo periodo di incubazione, evoluzione lenta e progressiva, esito invariabilmente letale.

Le patologie batteriche.

Mastiti.

La mastite è una delle più importanti cause di malattia che colpisce l'allevamento dei piccoli ruminanti (Mavrogianni et al., 2011). Mastiti cliniche e subcliniche influenzano direttamente la funzione della ghiandola mammaria e presentano un grande impatto economico sulle industrie lattiero-casearie del settore ovino e caprino (Guerreiro et al., 2013).

La mastite, infiammazione della ghiandola mammaria, è una patologia multifattoriale, di solito causata da un'infezione microbica che provoca la riduzione della produzione e della qualità del latte, e di conseguenza maggiori spese di produzione (Cremonesi et al., 2009), dovute ai costi di diagnosi, ai trattamenti, alle misure di prevenzione e alla sostituzione di animali riformati. I fattori che predispongono alla mastite sono: una scarsa igiene all'atto della mungitura, lesioni

della mammella dovute principalmente a difetti della mungitrice meccanica, irritazioni chimiche e, nella maggior parte dei casi, infezione batteriche (Al-Majali e Jawabreh, 2003). Può anche essere causata da infezioni virali, traumi e cambiamenti fisiologici e metabolici (Bergonier et al., 2003).

I microrganismi penetrano nella ghiandola mammaria attraverso il capezzolo, colonizzano il canale e la cisterna dove si moltiplicano e rilasciano tossine che distruggono i tessuti preposti alla produzione di latte. L'infezione intramammaria induce un aumento della permeabilità endoteliale che determina il passaggio di componenti dal sangue al latte, come neutrofili, citochine ed enzimi endogeni, i quali scatenano tutti quei meccanismi deputati alla risposta immunitaria (Albenzio et al., 2012). Le mastiti sono classificate in due tipi principali: cliniche e subcliniche (Cremonesi et al., 2006).

La mastite clinica può evolvere in un decorso acuto o cronico; è caratterizzata dalla manifestazione dei sintomi ed è generalmente associata ad alterazioni nella composizione del latte come ad esempio una diminuzione del contenuto di grassi e lattosio totale, un aumento del pH e delle cellule somatiche, che porta ad una minor resa e qualità del latte (Ogola et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2007). I danni associati alle mastiti riguardano non solo le modificazioni della qualità del latte ma anche la sua mancata produzione, con conseguente ridotta crescita degli agnelli, riforma anticipata degli animali e, talvolta nei casi più acuti, quadri sistemici gravi, con febbre, depressione e anche mortalità. Le mastiti acute sono caratterizzate da insorgenza improvvisa, arrossamento, gonfiore e dolorabilità della mammella. Sebbene le forme cliniche rappresentino una considerevole fonte di mancato reddito, la mastite subclinica, a causa della sua più alta prevalenza, riveste un ruolo predominante dal punto di vista economico (Las Heras, 1999). Nonostante si verifichi in tutto il mondo, la sua importanza economica è particolarmente

significativa nei paesi del Mediterraneo, perché questi sono i più alti produttori di latte ovino nella UE (Ali Dadkhan, 2012). La mastite subclinica è un'inflammazione che non è prontamente rilevabile clinicamente (Batavani et al., 2003), ma in alcune specie è evidenziabile attraverso la conta delle cellule somatiche nel latte. Essa rappresenta un marker sensibile della salute della mammella, ed è considerata, dunque, uno strumento attraverso il quale valutare la qualità del latte e lo stato sanitario dei singoli quarti, dei singoli capi e dell'intero gregge. Tuttavia, esistono importanti differenze tra i piccoli ruminanti e le vacche da latte, per cui i parametri utilizzati per queste ultime non si applicano necessariamente ai precedenti, ma anzi portano ad errori nella diagnosi subclinica delle mastiti in pecore e capre (Contreras et al., 2007). In realtà, in queste specie è difficile individuare una soglia precisa della concentrazione di cellule somatiche nel latte al di sopra della quale definire come altamente probabile lo stato di infezione della mammella (Raynal-Ljutovac et al., 2007). Infatti, questo parametro è influenzato, nel latte di pecore e capre, da diverse variabili non patologiche ma fisiologiche, quali la fase di lattazione, la razza, l'età, il parto, l'estro, la tipologia di allevamento, le variazioni stagionali (Gonzalo et al., 2010). Il California mastitis test (CMT) è uno strumento molto utile, facile da eseguire e a basso costo per la rilevazione della mastite subclinica. Gli stafilococchi coagulasi negativi (CNS) sono i principali agenti eziologici di tale mastite (30% - 95%) in pecore da latte (Ergun et al., 2009).

Pertanto, la ghiandola mammaria è sotto la costante minaccia di una varietà di agenti patogeni e ambientali; sebbene diversi studi su pecore e capre abbiano dimostrato che la prevalenza di tali microrganismi è ridotta in seguito all'effettiva applicazione di strategie di controllo e prevenzione (Albenzio et al., 2012). Diversi microrganismi come *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Enterobacteriaceae (E.coli)*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella haemolytica*,

Corynebacteria e funghi possono causare mastiti negli ovini; tra questi *Staphylococcus aureus* e *Pasteurella haemolytica* sono considerati i due agenti causali più frequenti delle mastiti cliniche negli ovini (Mavrogianni et al., 2011).

Staphylococcus aureus rappresenta storicamente una delle più importanti cause di mastite subclinica e clinica che evolve in forma cronica (Demon et al., 2012). È responsabile di una mastite gangrenosa che si presenta di solito sotto forma abbastanza grave, con lesioni necrotiche irreversibili alla mammella che determinano la perdita dell'organo; in alcuni casi porta a morte l'animale dopo 3-4 giorni. A questo microrganismo sono imputabili circa il 40% dei casi di mastite clinica in pecore che allattano gli agnelli e approssimativamente l'80% in pecore produttrici di latte (Mavrogianni et al., 2011). È più frequentemente diagnosticato in pecore e capre e, a causa della gravità clinica dei sintomi e anche del rischio di contaminazione dei prodotti lattiero-caseari da tossine termostabili (Contreras et al., 2007), rappresenta una problematica sia per la salute pubblica che per il settore dell'industria di trasformazione, il quale, nonostante l'intensa attività di ricerca e l'attuazione di molteplici misure di prevenzione (NMC, 2006), non è riuscito ad eradicare questa patologia (Zadoks e Fitzpatrick, 2009).

La terapia antimicrobica rimane una componente essenziale per controllare i programmi della mastite stafilococcica. Sebbene *S. aureus* sia suscettibile a molti antimicrobici in vitro (Erskine et al., 2002; EUCAST, 2011), questo patogeno ha sviluppato diverse strategie per svincolarsi dal sistema immunitario dell'ospite e il trattamento spesso non risulta efficace (Barkema et al., 2006). L'efficacia di programmi di vaccinazione contro le mastiti causate da *S. aureus* è stata riportata per le pecore, ma non per le capre (Amorena et al., 1994; Tollersrud et al., 2002).

Merita inoltre di essere menzionata una malattia infettiva e diffusiva dei piccoli ruminanti, conosciuta in Sardegna da decenni, che rappresenta ancora oggi un

irrisolto problema per le aziende ovine e caprine, la cosiddetta sindrome da agalassia contagiosa. È provocata nella specie ovina da *Mycoplasma Agalactiae* che causa sintomi diversi oltre alla mastite, quali cheratocongiuntivite e artrite. Produce una severa mastite sub-acuta o cronica che porta, nella maggior parte, dei casi ad una totale interruzione della lattazione, per questo costituisce una delle più importanti cause di mastite in aree endemiche, dove i casi subclinici sono frequenti (Contreras et al., 2007). È una malattia denunciabile e senza dubbio può essere considerata seconda soltanto alla Brucellosi per le sue gravi ripercussioni sanitarie ed economiche.

La complessa epidemiologia delle mastiti rende il loro controllo necessariamente rivolto verso diversi aspetti dell'allevamento, tra i quali assume priorità l'igiene generale. Nell'allevamento da latte notevole rilievo viene attribuito all'igiene della mungitura che costituisce una fase molto delicata della produzione del latte. Pertanto la corretta routine di tale operazione e la manutenzione degli impianti sono molto importanti ai fini di ridurre gli stress da mungitura a livello mammario, di salvaguardare il benessere del gregge e, soprattutto, di ottenere un latte di qualità.

Inoltre, è necessario mettere in atto un rigoroso rispetto delle norme igieniche e un sistema di pulizia e sanificazione di tutti gli impianti ed attrezzature correlate che entrano in contatto con il latte (guaine, tubi, valvole, raccoglitori ecc.). Tali operazioni di lavaggio devono essere regolarmente eseguite con prodotti disinfettanti adatti allo scopo. Sarebbe inoltre auspicabile un'adeguata disinfezione dei capezzoli mediante il cosiddetto “*dipping*” o detersione per immersione, il quale è stato dimostrato essere altamente efficace nel prevenire nuove infezioni intramammarie. Vanno poi curate eventuali lesioni ai capezzoli, che rappresentano facili vie d'ingresso per i patogeni.

Anche per quanto riguarda le macchine mungitrici, è essenziale effettuare un controllo del meccanismo dell'impianto per il suo regolare funzionamento (pompa del vuoto, frequenza di pulsazione, ecc), prima e dopo ogni mungitura.

Allo stesso modo, un adeguato esame della qualità dell'acqua utilizzata per lavare la macchina si rende necessario per evitare focolai di infezioni, come spesso vengono segnalati per *P. aeruginosa* (Las Heras et al., 1999).

Le strategie di intervento prevedono quindi, oltre a operazioni di carattere generale, quali la corretta gestione zootecnica, sanitaria e dell'alimentazione, misure più specifiche come il trattamento antibiotico, il quale può contribuire a limitare i danni. La terapia intramammaria in asciutta, raramente utilizzata sugli ovini, consente di somministrare con sicurezza dosi elevate di antibiotico, assicura una prolungata persistenza del principio attivo nella mammella e riduce contemporaneamente il rischio della presenza di residui nel latte (De Santis et al., 2001). Negli animali con mastiti acute, però, può rendersi necessario anche il trattamento parenterale nel corso della lattazione, di solito a base di penicilline nella specie ovina. In questo caso va tenuto presente il problema dei residui nel latte.

Aborti.

L'aborto, definito come l'interruzione della gravidanza, è molto frequente nella specie ovina e costituisce uno dei principali motivi di mancato profitto da parte degli allevatori. Stabilirne le cause è fondamentale sia per prevenire il ripetersi di tale evento sia per evitare, allorché gli agenti causali siano di tipo infettivo, l'insorgenza di possibili malattie trasmissibili all'uomo (zoonosi). In base all'origine possiamo distinguere le cause che determinano l'aborto in: batteriche, parassitarie, virali e non infettive.

Tra gli aborti di natura virale, nella specie ovina, il più importante agente è il virus della Malattia delle Frontiere o *Border disease* che appartiene alla famiglia dei

Flavivirus (genere *Pestivirus*), causa questi ultimi di malattie economicamente importanti nei ruminanti domestici e nei suini in tutto il mondo: diarrea virale bovina (BVD) nei bovini, *Border disease* (BD) negli ovini e capre e peste suina classica (CSF) nei suini (Valdazo-Gonzalez et al., 2007).

Gli aborti di natura parassitaria sono causati da miceti assunti con alimenti ammuffiti o per via respiratoria, micotossine, e principalmente da *Toxoplasma gondii*, protozoo responsabile della toxoplasmosi, zoonosi a diffusione cosmopolita per il suo peculiare ciclo biologico, che provoca aborto nell'ovino e natimortalità negli agnelli (Edwards e Dubey, 2013).

Gli aborti di origine batterica sono provocati da clamidiosi, brucellosi, febbre Q, salmonellosi, campilobacteriosi, leptospirosi, listeriosi e micoplasmosi.

Clamidiosi.

Un'importante infezione abortigena nella pecora è la clamidiosi o aborto enzootico, il cui agente eziologico è un batterio Gram-negativo membro della famiglia *Chlamydiaceae*, caratterizzato da un unico genere, *Chlamydia*, differenziato in nove specie diverse. Sono patogeni intracellulari obbligati e causano una vasta gamma di malattie nell'uomo, in altri mammiferi e uccelli (Huang et al., 2013). Tra le diverse specie *Chlamydia psittaci*, *C. abortus* e *C. pecorum* possono causare la malattia negli ovini.

Negli ovini e caprini l'infezione da *Chlamydia abortus* dà luogo al cosiddetto aborto enzootico che colpisce gli animali nell'ultimo periodo di gestazione. L'aborto tardivo è raramente accompagnato da ritenzione placentare, scolo vaginale e talvolta si ha nascita di un feto morto o prematuro. La malattia presenta limitate ripercussioni sulla pecora, la fertilità non viene compromessa, ma gli animali possono restare infetti per tutta la vita ed eliminare il microrganismo attraverso l'aborto e gli scoli uterini.

L'infezione, che provoca gravi perdite finanziarie per il settore ovino in tutto il mondo, è anche trasmissibile all'uomo, con particolare gravi conseguenze per le donne in gravidanza (Milne et al., 2009) e sindromi respiratorie. Il contatto con pecore infette, al momento dell'aborto o del parto, rappresenta l'evento maggiormente rischioso.

La diagnosi si realizza attraverso prove di laboratorio su sezioni di cotiledoni infetti o di placenta, in grado di isolare gli antigeni della *Clamydia*. Agenti immunizzanti di tipo spento e terapie antibiotiche a base di ossitetracicline sono risultati efficaci nella prevenzione e nel trattamento dell'aborto enzootico.

Inoltre, fondamentale risulta la gestione dell'allevamento durante l'emergenza sanitaria con l'isolamento delle pecore che hanno abortito, la distruzione delle placente e il miglioramento delle condizioni igieniche dell'ambiente, con conseguente riduzione del rischio di infezione del gregge.

Brucellosi.

La brucellosi è una malattia infettiva che ha storicamente accompagnato l'allevamento ovino e caprino in gran parte del mondo e in particolare nel bacino del Mediterraneo (Garin-Bastuji et al., 2006). Colpisce i ruminanti domestici (*Brucella abortus* nei bovini e *Brucella melitensis* in pecore e capre) ed è causata da batteri Gram-negativi, intracellulari facoltativi (Vemulapalli et al., 2004), che vengono trasmessi all'uomo attraverso il contatto con animali infetti o mediante il consumo di latticini e carni contaminati (Gupta et al., 2007).

Il sintomo più rilevante dell'infezione è l'aborto, in genere tardivo, fra il terzo e quarto mese di gravidanza, seguito da ritenzione placentare e in alcuni casi da mastite e sterilità. Nel maschio possono verificarsi orchite ed epididimite acuta che possono provocare infertilità. Momenti ad alto rischio per la diffusione dell'infezione

sono rappresentati dall'aborto o dal parto. L'eliminazione batterica avviene per tempi prolungati e talvolta permanenti anche attraverso il latte e il seme.

La malattia può essere trasmessa per contatto diretto, attraverso l'accoppiamento, mediante la via respiratoria, orale, venerea, transcutanea e congiuntivale. L'alta resistenza del batterio a svariate condizioni ambientali permette alle Brucelle di sopravvivere nel suolo e nella lettiera, sopportando sia l'essiccazione, sia le basse temperature, in particolare quando è sotto lo zero (CFSPH, 2009).

La Brucellosi umana, nota come Febbre Maltese, causata da *Brucella melitensis*, è una delle più importanti zoonosi di distribuzione mondiale (Suraud et al., 2008). Gli esseri umani di solito si infettano per via alimentare, consumando latte o latticini infetti, non pastorizzati, per via respiratoria attraverso inalazione di aerosol infetto, per via transcutanea, manipolando feti, invogli fetali o organi infetti e per via congiuntivale.

I normali disinfettanti, la pastorizzazione del latte e la stagionatura dei formaggi oltre i 75 giorni sono in grado di inattivarla. La clorotetraciclina in associazione con la streptomina si sono dimostrate efficaci nel trattamento antibatterico.

La profilassi della brucellosi ovina, data la sua rilevanza in sanità pubblica ed economica, dagli anni '60 è condotta in Italia attraverso un piano nazionale di controllo e risanamento, che prevede l'eliminazione dei soggetti positivi, l'adozione di misure di polizia sanitaria e restrizioni commerciali relative agli animali e al latte prodotto. Questo piano ha progressivamente portato la diffusione dell'infezione a livelli estremamente bassi in quasi tutto il Paese e ha permesso l'acquisizione della qualifica sanitaria di allevamento ufficialmente indenne per tutti gli allevamenti della regione Sardegna .

Salmonellosi e Campilobatteriosi.

La Salmonellosi, causata da *Salmonella abortus ovis*, e la Campilobatteriosi da *Campylobacter fetus fetus* rappresentano altre due malattie infettive che determinano aborto nella specie ovina.

Il sierotipo *abortus ovis* è il più comune agente eziologico di aborto ovino nell'Europa meridionale. Quando *S. Abortus ovis* è introdotta per la prima volta in un gregge indenne può causare aborti nell'ultimo trimestre di gravidanza nel 30-50% delle pecore gravide (Belloy et al., 2009), raramente accompagnati da ritenzione placentare e metrite e di solito a carattere epidemico. Negli anni successivi l'infezione diventa endemica con aborti sporadici che si verificano più spesso nei soggetti giovani o appena introdotti nel gregge. Possono verificarsi anche nati-mortalità o nascita di agnelli a termine ma poco vitali, che vengono a morte nel giro di poche ore per setticemia.

L'aborto dà origine a una forte contaminazione ambientale da parte di Salmonelle, che presentano una buona resistenza nel territorio. L'infezione avviene principalmente attraverso la via orale, ma anche respiratoria e congiuntivale. Inoltre, sembra che l'agnello possa infettarsi anche tramite l'assunzione di colostro e latte infetto. Il batterio può essere escreto anche con le feci, per tempi prolungati, da portatori cronici privi di sintomi clinici. Questi agenti patogeni sono zoonotici (Givens e Marley, 2008).

L'infezione da *C. fetus fetus* presenta aspetti simili a quelli dell'infezione da *S. abortus ovis*. *Campylobacter fetus* è un batterio Gram-negativo, microaerofilo, che può causare aborto spontaneo nei bovini e negli ovini e rappresenta una grave minaccia per la salute umana (Zhao et al., 2012). La trasmissione avviene attraverso le feci, i feti abortiti, la placenta e le lochiazioni di pecore che abortiscono. Le pecore si presentano asintomatiche e l'aborto sopraggiunge nel terzo trimestre (Givens e

Marley, 2008). L'infezione è raramente riscontrata nell'uomo, tuttavia in soggetti immunodepressi può causare gastroenterite.

La profilassi per queste infezioni si basa essenzialmente su misure dirette: isolamento degli animali che presentano scoli vaginali e che abortiscono, disinfezioni ambientali, attenzione all'introduzione di nuovi soggetti nel gregge e ai contatti anche indiretti con altre greggi. Le vaccinazioni non offrono garanzie di efficacia, come pure il trattamento antibiotico.

Enterotossiemia da Clostridium.

Fra gli agenti di enterotossiemia, il più importante è il *Clostridium perfringens*, un batterio Gram-positivo, anaerobio, sporigeno (Morrison et al., 2012).

Questo microrganismo produce malattie enteriche in pecore, capre e altri animali, si ritrova largamente distribuito nel suolo e rappresenta un normale ospite della flora microbica intestinale della maggior parte delle specie animali, compreso l'uomo. In condizioni particolari, per esempio quando l'ambiente intestinale è alterato da improvvisi cambiamenti alimentari o da altri fattori, *C. perfringens* prolifera e produce diverse tossine ad elevato potere patogeno che agiscono a livello locale o vengono assorbite nella circolazione generale con effetti solitamente devastanti sull'ospite (Uzal e Songer, 2012).

A seconda delle tossine prodotte dai diversi tipi di *C. perfringens* si distinguono diverse forme patologiche, molto spesso assai gravi e associate a mortalità, dissenteria, enterite emorragica e ulcerativa, forme renali, cerebrali, cardiache, polmonari. In generale sono maggiormente colpiti i soggetti più giovani, vigorosi e in buono stato di salute.

I fattori scatenanti le enterotossiemie sono diversi. Mutamenti o errori del regime alimentare (poca fibra, erba fredda, iper-assunzione di cereali) o bruschi sbalzi termici (pascolamento nelle prime ore del mattino, forte escursione termica

giorno-notte) possono provocare atonia dell'apparato digerente, con conseguente innalzamento del pH che porta a uno squilibrio della flora batterica del tratto digestivo, favorevole alla replicazione di *C. perfringens* e alla produzione di tossine.

La diagnosi delle clostridiosi si basa sulla sintomatologia clinica, sulle lesioni rilevabili all'autopsia, su esami di laboratorio rivolti a identificare il microrganismo responsabile e le tossine prodotte. La profilassi riconosce nella vaccinazione uno strumento fondamentale.

Zoppie.

Le zoppie rappresentano una problematica frequente nell'allevamento ovino e caprino. Sono fortemente favorite da una congiunzione di fattori predisponenti di natura ambientale, genetica, strutturale e manageriale.

La pedaina ed in generale tutte le zoppie incidono in maniera fortemente negativa sul benessere degli animali con pesanti ricadute sulla produttività e sulla redditività del gregge attraverso gravose riduzioni della produzione di latte, carne e lana. La pedaina è una malattia diffusa delle pecore, altamente contagiosa, che provoca zoppia con evidente manifestazione di dolore (Ware, 2005). È riconoscibile da altre forme di zoppia per il carattere diffusivo e per il caratteristico fetore emanato dai piedi colpiti.

Le lesioni sono inizialmente localizzate nello spazio interdigitale, ma possono estendersi alla base dell'unghia e nella parte cornea, causando il distacco parziale o totale dell'unghia. La pedaina è causata dall'associazione di due batteri Gram-negativi anaerobi, il *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus* e il *Fusobacterium necrophorum*. L'azione sinergica di queste due specie batteriche produce la malattia (Bennet et al., 2009). *F. necrophorum* è un normale componente della flora intestinale degli ovini e di altri ruminanti e, in condizioni ambientali favorevoli, può replicare a livello degli spazi interdigitali, creando una situazione ideale per

l'instaurarsi della superinfezione da *D. nodosus*. Altri germi possono essere isolati dalle lesioni (agiscono in sinergia o come fattori di complicazione): *Archanobacterium (Actynomices) pyogenes*, *Spirocheta penortha*, *Clostridium perfringens tipo A*.

Fattori predisponenti sono una trascurata cura del piede, squilibri alimentari, elevate densità di animali, climi umidi con temperature sopra i 10 °C che favoriscono il crearsi di condizioni di fangosità del terreno e la moltiplicazione batterica. Usura irregolare e conformazione inadeguata del piede favoriscono la penetrazione degli agenti patogeni negli strati profondi e la loro moltiplicazione.

Il trattamento del singolo capo colpito prevede una corretta toelettatura dell'unghia, l'applicazione locale di antibiotici tramite pennellatura o spray e un eventuale trattamento antibiotico parenterale. Data la diffusibilità della malattia, la presenza di capi infetti giustifica però trattamenti di massa, costituiti da bagni ai piedi con soluzioni di solfato di zinco (10%), di solfato di rame (10%) o formalina (5%). Buona norma preventiva è evitare l'acquisto di capi provenienti da greggi in cui la pedaina è presente. Sono inoltre disponibili vaccini che possono essere d'ausilio nel controllo dell'infezione.

1.4 LE TERAPIE ANTIMICROBICHE NELL'ALLEVAMENTO OVINO.

Cenni storici.

La sanità degli animali deve essere tutelata mediante il controllo e la prevenzione della diffusione di malattie. È pertanto fondamentale in allevamento l'utilizzo di appropriati programmi sanitari che prevedono, oltre alle vaccinazioni obbligatorie, all'igiene degli allevamenti, al controllo dei vettori di alcune malattie, l'attuazione di specifici trattamenti terapeutici.

I farmaci antimicrobici rappresentano preziosi strumenti per la salute ed il benessere degli animali ed apportano un contributo significativo alla produttività e all'efficienza aziendale. A tal fine sono frequentemente utilizzati, nella pratica veterinaria, per il trattamento e la prevenzione di alcune malattie come le mastiti ed altre infezioni microbiche (Camara et al., 2013).

La scoperta degli antibiotici risale quasi alla metà del XX secolo (Davies e Davies, 2010) e segna una delle più rivoluzionarie svolte nella storia della medicina. Sebbene il termine "Chemioterapia" sia stato coniato all'inizio del 1900 da un geniale scienziato tedesco, P. Ehrlich, sostenitore convinto e fondatore di questa branca della farmacologia, le moderne ricerche sugli antibiotici iniziarono intorno al 1928, anno in cui Alexander Fleming scoprì la penicillina, una sostanza originata e diffusa da un fungo (il *Penicillium notatum*) in grado di inibire lo sviluppo di numerose specie di batteri (Carli et al., 2009).

Oltre alle penicilline, in pochi anni si identificarono altre sostanze (tra le più note vanno citate la streptomina e le tetracicline), sino ad arrivare ai giorni d'oggi dove si conoscono un vastissimo numero di farmaci antibatterici che differiscono notevolmente fra di loro, non solo da un punto vista chimico-fisico, ma anche per le loro proprietà farmacologiche, lo spettro e il meccanismo di azione.

A seguito di successivi sviluppi, molte infezioni batteriche precedentemente fatali, ora possono essere trattate con successo, ma il largo impiego di agenti antibatterici ha portato a notevoli problemi, tra cui la nascita e la diffusione di agenti patogeni resistenti ai farmaci e la preoccupazione della persistenza di residui di farmaci nei tessuti commestibili (Maddison et al., 2008).

Il termine “antibiotico” (dal greco antico: anti, "contro", e bios, "vita") viene definito come una sostanza prodotta da varie specie di microorganismi (batteri, funghi, actinomiceti ecc.) in grado di sopprimere la crescita di altri microrganismi ed eventualmente distruggerne altri (Waksman e Woodruff, 1941).

Rappresentano una categoria farmaceutica in costante evoluzione, per cui molte molecole naturali sono state modificate chimicamente ottenendo nuovi farmaci, detti di semisintesi. Infatti, se fino a pochi decenni fa gli antibiotici erano classificati distintamente dai chemioterapici per l'origine naturale dei primi e sintetica dei secondi (i primi provengono, ad esempio, dal metabolismo di miceti, muffe o da quello di determinati batteri come gli streptomiceti), oggi non ha più motivo di sussistere una distinzione così netta (Pelaez, 2006). Attualmente tutti i farmaci antimicrobici, per quanto dissimili sotto il profilo dinamico e cinetico, sono classificabili nella sola categoria dei chemioterapici (Carli et al., 2009).

L'impatto degli antibiotici sulla medicina e sulla società è immenso, tale da aver rappresentato a partire dal dopoguerra, insieme ai miglioramenti dell'alimentazione e dell'igiene ambientale, uno dei principali fattori in grado di condizionare in modo significativo la durata e la qualità della vita.

Il primo impiego di antimicrobici per il trattamento delle infezioni in medicina veterinaria è datato alla fine del 1940, poco dopo la loro diffusione (Mitchell et al., 1998). Infatti, grazie a studi condotti su polli e suini, i quali mostrarono che basse dosi di penicillina e tetraciclina erano in grado di facilitarne la crescita e di migliorarne la produttività, in Gran Bretagna, a partire dagli anni Cinquanta, fu consentito l'uso di questi farmaci come promotori di crescita e, da allora, l'uso degli antibiotici in zootecnia si espanse rapidamente, trovando numerose applicazioni (Piras, 2012).

Le modalità di classificazione dei chemioterapici.

Uno schema di una certa rilevanza è quello che suddivide tali farmaci in famiglie; quelle maggiormente utilizzate in ambito veterinario sono le tetracicline, seguite da macrolidi, lincosamidi, penicilline, sulfonamidi, aminoglicosidi, fluorochinoloni, cefalosporine e fenicoli. Gli antimicrobici utilizzati negli animali sono generalmente gli stessi utilizzati negli esseri umani (Bhavsar e Thaker, 2012).

In base al tipo di azione si distinguono antibiotici battericidi (penicilline, cefalosporine, aminoglicosidi) e batteriostatici (tetracicline, macrolidi, sulfamidici). I primi provocano danni strutturali incompatibili con la vita dei microrganismi, determinando rapida lisi e morte, mentre i secondi agiscono bloccando la crescita dei batteri e rallentando, in alcuni casi fino a inibirla, la moltiplicazione batterica. La distinzione tra antibiotici battericidi e batteriostatici non è molto rigorosa. Infatti, agenti antibatterici possono avere azione batteriostatica o mostrare effetto battericida ritardato quando raggiungono la concentrazione minima inibente (MIC), mentre diventano battericidi quando raggiungono una concentrazione più elevata o minima battericida (MBC) (Ruegg, 2013).

La classificazione più semplice è quella che si basa sull'efficacia clinica, in funzione della gamma di microrganismi che il farmaco è in grado di inibire, e quindi facendo riferimento al loro spettro d'azione che può essere ampio, medio oppure ristretto. Gli antibiotici ad ampio spettro sono attivi contro un gran numero di microrganismi, sia verso i batteri Gram-positivi sia verso quelli Gram-negativi (per es. le tetracicline), mentre gli antibiotici a spettro ristretto (per es. la penicillina G, attiva solo su Gram-positivi) agiscono solo su determinati batteri.

Di un certo interesse è la classificazione degli antibiotici in base al loro meccanismo di azione su differenti bersagli cellulari. In base a questo criterio si distinguono:

- antibiotici che inibiscono la sintesi della parete cellulare batterica (cefalosporine, penicilline);
- antibiotici che alterano la membrana citoplasmatica del batterio;
- antibiotici che inibiscono il meccanismo di replicazione e di trascrizione degli acidi nucleici (fluorochinoloni, metronidazolo, rifampicina, sulfamidici, trimetoprim);
- antibiotici che interferiscono con la sintesi proteica (aminoglicosidi, cloramfenicolo, lincosamidi, macrolidi, tetracicline);
- antibiotici che interferiscono con il metabolismo energetico (Carli et al., 2009).

Antibiotici: applicazioni pratiche e ripercussioni.

Gli antibiotici nel settore veterinario sono diventati, a partire dagli anni '50, un mezzo fondamentale per la lotta alle malattie infettive degli animali. La loro introduzione ha contribuito notevolmente a garantire ed assicurare lo standard delle

produzioni di alimenti di origine animale. Sono ampiamente utilizzati per fini terapeutici e profilattici negli animali da latte (Comunian et al., 2010).

Per contro, il loro uso nel campo zootecnico, talora indiscriminato, eccessivo ed inadeguato, ha generato pesanti inconvenienti. Tra questi, il problema dei residui dei farmaci nei prodotti alimentari è uno dei più preoccupanti, sia per il potenziale rischio dato dagli effetti tossici sui consumatori (Demoly e Romano, 2005), sia dal punto di vista tecnologico, in quanto residui di antibiotici possono interferire con la produzione di prodotti caseari, come il formaggio, rendendo difficile la coagulazione del latte crudo (García-Mayor et al., 2012).

Inoltre, l'uso di antibiotici negli animali promuove lo sviluppo di gravi fenomeni di resistenza batterica e quindi di ceppi batterici resistenti agli antibiotici potenzialmente in tutto il mondo (Aminov, 2010). Questi possono indurre resistenza crociata contro altri antibiotici di struttura o meccanismo d'azione simile, con una conseguente riduzione della loro efficacia terapeutica e con possibili rischi per la salute pubblica (Maka et al., 2014).

Tale fenomeno avverso si manifesta in maniera drammatica non solo in campo veterinario ma anche e soprattutto in medicina umana. Specificatamente, alcuni dei batteri resistenti negli animali sono trasmissibili all'uomo, principalmente attraverso la catena alimentare o mediante il contatto diretto con gli animali da allevamento. Gli esempi più noti di batteri patogeni di origine alimentare sono: *Salmonella*, *Campylobacter* e il commensale *Enterococcus* (EFSA, 2008).

Per queste considerevoli ragioni, tutti i medicinali veterinari, prima di essere immessi sul mercato vengono autorizzati e registrati dal Ministero della Salute. Sono necessari anni di studio e di sperimentazioni prima di attestare l'efficacia di un antibiotico verso una determinata patologia e una specie animale. Il Ministero della salute valuta gli studi di tollerabilità, di tossicità, di efficacia clinica, di impatto

ambientale di tutti i farmaci veterinari. Controlla, inoltre, le indagini sulla deplezione residuale, le quali determinano i "tempi di attesa" che è necessario rispettare prima del consumo di alimenti di origine animale, quali latte, carne, uova e miele, al fine di garantire al consumatore prodotti privi di residui di farmaci, se utilizzati nel modo corretto e secondo le prescrizioni descritte nel foglietto illustrativo del farmaco veterinario. La farmacovigilanza disciplina l'argomento in questione e il suo compito è quello di fornire una serie di garanzie: l'uso sicuro dei medicinali veterinari negli animali, la sicurezza degli alimenti di origine animale, la sicurezza per l'uomo che viene a contatto con i medicinali veterinari e la sicurezza per l'ambiente (Direttiva EC 82, 2001; Direttiva EC 28, 2004).

Gli antibiotici sono utilizzati negli animali con diversi fini: terapeutico, metafilattico, profilattico e come promotori di crescita. L'uso terapeutico ha lo scopo di controllare un'infezione batterica esistente; per metafilattico si intende il trattamento di alcuni animali con antimicrobici dopo l'insorgenza di un'infezione batterica in una parte del gruppo, nell'intento di proteggere il resto del gruppo; diversamente dall'uso terapeutico e metafilattico, la profilassi è una misura esclusivamente preventiva che dovrebbe essere utilizzata con discrezione; infine i promotori di crescita sono sostanze chimiche, naturali o sintetiche, in grado di influenzare il metabolismo degli animali a cui sono somministrate in maniera da aumentare il loro ritmo di crescita. Ovviamente la scelta di un agente antimicrobico appropriato e mirato verso una specifica patologia rappresenta il punto di partenza per qualsiasi approccio terapeutico e perciò sarebbe auspicabile isolare il patogeno batterico mediante una conferma di laboratorio, nonché effettuare un'accurata valutazione della sua sensibilità in vitro agli antibiotici (Schwarz et al., 2001).

Attualmente sono disponibili per gli animali numerose categorie di antimicrobici, con varie forme farmaceutiche (bolo, drench) che vengono

somministrate con modalità differenti: per via endovenosa, intramuscolare o sottocutanea; per via orale nei mangimi o nell'acqua; localmente sulla cute e per infusioni intramammaria e intrauterina (Kantiani et al., 2009).

Tra tutti gli antibiotici disponibili in commercio, quelli più frequentemente impiegati nell'allevamento ovino sono le tetracicline e le beta-lattamine.

Tetracicline.

Il termine “tetraciclina” si riferisce a diversi antibiotici di origine naturale o semi-sintetica con la stessa struttura chimica di base: un nucleo lineare tetraciclico fuso con una varietà di gruppi funzionali (Pastor-Navarro et al., 2009).

Le tetracicline sono largamente sfruttate in medicina; sono state segnalate come gli antibiotici più intensamente utilizzati nell'Unione Europea in campo veterinario, per trattare infezioni sia sistemiche che locali soprattutto negli animali produttori di alimenti, grazie anche al loro prezzo economico (Moeller et al., 2007). Sono antibiotici ad ampio spettro contro un'ampia gamma di batteri Gram-positivi e batteri aerobi e anaerobi Gram-negativi. Inoltre, sono attive nei confronti di alcuni microorganismi resistenti ai chemioterapici che agiscono sulla parete cellulare batterica, quali le *Rickettsie*, le *Clamydie*, i *Micoplasmi* (infezioni delle quali risulta il farmaco di elezione), e nei confronti di certi micobatteri atipici, dei protozoi, di diverse spirochete. Per contro sono poco efficaci, soprattutto a causa di fenomeni di resistenza, verso funghi, *Escherichia coli*, *Salmonella*, stafilococchi, streptococchi, enterococchi, pneumococchi, *Proteus* e *Pseudomonas spp* (Runti, 1969; Maddison et al., 2008; Bilandzic et al., 2011).

Agiscono inibendo la sintesi delle proteine all'interno dei batteri: dopo essere penetrate, in parte per diffusione e in parte per un sistema di trasporto attivo che richiede consumo di energia (responsabile degli elevati livelli raggiunti nei batteri

sensibili), si legano ai recettori di membrana dei ribosomi (subunità 30S) ostacolando così, probabilmente tramite molteplici meccanismi, la sintesi proteica. Sono generalmente batteriostatiche, pertanto è essenziale un buon funzionamento delle difese organiche perché il loro impiego abbia successo (Merck, 1995; Conzuelo et al., 2012).

Dopo somministrazione orale, le tetracicline, in particolar modo l'ossitetraciclina, possono causare vomito a causa delle loro proprietà irritanti. Sono in genere discretamente assimilate nel tratto prossimale dell'intestino tenue, anche se l'assorbimento è ridotto da diverse sostanze, come la presenza di cibo (Neilsen e Gyrd-Hansen, 1996); fattore importante da considerare nella terapia del bestiame in cui il farmaco viene somministrato mediante il mangime. Anche la presenza di cationi metallici, di origine alimentare (latte e latticini come fonte di calcio) o apportati attraverso alcuni farmaci (medicazioni intestinali a base di idrossido di alluminio, di magnesio, sali di ferro e di calcio, eccetera), ne riduce, per chelazione, l'assorbimento gastroenterico. Inoltre, sempre la stessa ragione, le tetracicline non vanno somministrate insieme a farmaci antiacidi o adsorbenti come ranitidina e colestiramina (Bassetti, 2001). È utile invece associare alle tetracicline per via orale acido citrico, sodio metafosfato o glucosamina, che impediscono il legame con il calcio e ne aumentano l'assorbimento.

Nei ruminanti questi antibatterici possono causare una profonda alterazione della microflora batterica ruminale e intestinale a causa delle alte concentrazioni raggiunte nell'intestino. Per questo motivo si consiglia la somministrazione per via parenterale, in seguito alla quale le tetracicline, legandosi alle proteine ematiche, si distribuiscono rapidamente ed efficacemente nei vari tessuti dell'organismo, stabilendo in breve tempo livelli terapeutici adeguati. Si accumulano principalmente nei reni, nel fegato, nella bile, nella milza, nel polmone, nelle ossa, nei denti, ad

eccezione del liquido cefalo-rachidiano. Vengono escrete per via renale con meccanismi di filtrazione glomerulare ad eccezione della doxiciclina che viene eliminata per via intestinale (Bhavsar e Thaker, 2012).

In ragione del fatto che tendono a chelare ioni calcio (meno la doxicillina), questi antibiotici si depositano irreversibilmente nelle ossa in accrescimento, inibendone la calcificazione, nonché sulla dentina e sullo smalto dentale in formazione dei giovani animali, determinando colorazione giallastra e poi bruna, e anche nel feto per passaggio transplacentare. Pertanto possono essere controindicati per lunghi periodi di utilizzo in animali in gravidanza, anche per i loro effetti antianabolici, e nei neonati.

Trovano applicazione pratica in numerose infezioni generali: broncopolmoniti, aborto enzootico da *Clamidia psittaci*, patologie intestinali da *E.coli*, pedaina, infezioni del tratto urinario, metriti, mastiti, ma anche in seguito a trattamenti post-traumatici o post-operatori e ferite settiche. Inoltre si sono dimostrate altamente valide nel trattamento di infezioni acute e croniche da *Brucella melitensis* e *ovis* (Merck, 1995).

Tra le tetraciline classiche, tetraciclina, ossitetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina sono le più impiegate e disponibili in commercio (Traviesa-Alvarez et al., 2007). Attualmente, l'ossitetraciclina è la più utilizzata nell'allevamento ovino in quanto è il solo composto del gruppo sottoforma di preparazioni a lento rilascio (long-acting). Perciò possiede il vantaggio di garantire un prolungamento dei tempi di assorbimento, per l'azione irritante che determina nei siti di inoculazione intramuscolare e sottocutaneo (Nouws et al., 1990), e concentrazioni ematiche e tissutali elevate.

Betalattamine.

Alla famiglia delle betalattamine appartengono diverse classi di farmaci, quali penicilline, cefalosporine, carbapenemi, monobattamici e inibitori β -lattamasi (Bhavsar e Thaker, 2012), che presentano in comune, nella loro struttura chimica, un anello β -lattamico (Trautmann, 2011).

Comprendono alcuni degli antibiotici più frequentemente utilizzati nella pratica veterinaria (Camara et al., 2013) per il trattamento di patologie come polmonite, diarrea, artrite batterica (Goto et al., 2005), mastite ed altre patologie degli animali lattiferi (Roca et al., 2010). In particolare, penicilline e cefalosporine si presentano come farmaci di scelta per molte infezioni per le seguenti ragioni: sono battericidi, coprono un ampio spettro antibatterico, sono molto sicuri e poco tossici; peraltro alcuni sono attivi per via orale (Hubschwerlen, 2007).

Le betalattamine hanno azione battericida per inibizione della sintesi della parete batterica che si realizza solo nelle cellule in fase di crescita o in moltiplicazione, nelle quali è fortemente attiva la sintesi del peptidoglicano, che conferisce rigidità e resistenza alla parete (McLeod, 2013).

Pertanto, solo i microrganismi dotati di parete cellulare sono sensibili all'azione di questi antibiotici; nell'ambito di questo gruppo, la resistenza è ben nota e si attua attraverso tre principali meccanismi.

Quello più comune è la produzione di enzimi da parte dei microrganismi, le β -lattamasi, che inattivano il farmaco mediante l'apertura dell'anello β -lattamico. Gli stafilococchi sono i principali batteri Gram-positivi nei quali la resistenza betalattamica si sviluppa per questa ragione (Carli et al., 2009). La produzione di β -lattamasi è stata accertata anche nei Gram-negativi nei quali pare sia la causa primaria di resistenza a questa famiglia di antimicrobici (Arlet et al., 2006).

Inoltre la resistenza può essere conferita grazie a modifiche nei siti di legame. Ciò comporta l'incapacità del farmaco di riconoscere ed agganciarsi ai recettori

specifici. Questo rappresenta una delle principali cause di resistenza in vari patogeni compresi il problematico stafilococco e specie streptococciche.

Un altro sistema è dovuto alla ridotta permeabilità di barriera che impedisce l'accesso dell'antibiotico alla membrana citoplasmatica. E' stato accertato che i Gram-negativi dotati di capsula esterna, come *Pseudomonas*, possiedono un vero e proprio dispositivo di filtro che limita la penetrazione dei farmaci idrofili (Wilke et al., 2005).

Penicilline.

La penicillina G (nota anche come benzilpenicillina), capostipite naturale delle penicilline, è stata la prima sostanza ad attività antibatterica della storia della medicina (Marchand-Brynaert e Brulè, 2008).

I primi limiti di tale sostanza erano lo spettro di attività circoscritto a cocchi Gram-positivi, sia aerobi che anaerobi, ad alcuni bacilli Gram-negativi, a spirochete, ad *Actinomyces* (Carli et al., 2009), e la possibilità di somministrazione solo per via parenterale perché instabile a pH acido. Questi condizionamenti terapeutici furono superati con la sintesi di molecole acido resistenti prima, e di Penicilline semisintetiche resistenti alle β -lattamasi (oxacillina, cloxacillina, dicloxacillina) e semisintetiche ad ampio spettro (o aminopenicilline) dopo.

In particolare, le penicilline semisintetiche consentono la somministrazione per via orale e/o parenterale, elevata biodisponibilità, ampliamento dello spettro d'azione a gran parte dei bacilli Gram-negativi, fino all'attività antibatterica rivolta al genere *Pseudomonas* (Carbossipenicilline). Quasi tutte le penicilline sono idrolizzate e inattivate dal pH acido dello stomaco e quindi non assorbite per via orale salvo la penicillina V, le aminopenicilline e le isoxazolilpenicilline (Bhavsar e Thaker, 2012).

Per di più la somministrazione per via orale può alterare la flora batterica intestinale e compromettere la sintesi di vitamina K, motivo per cui sono più utilizzate le vie parenterali, le quali hanno un assorbimento molto rapido, raggiungendo in pochi minuti la massima concentrazione ematica, diffondendosi e distribuendosi rapidamente in tutti i tessuti. Sono escrete completamente per filtrazione glomerulare e secrezione tubulare con conseguente concentrazione nelle urine. Vengono anche eliminate nel latte, in tracce, dove possono persistere per diverse ore (Bhavsar e Thaker, 2012).

Le penicilline rappresentano la classe antibiotica meglio tollerata a causa della scarsa tossicità, ma si possono osservare alcuni fenomeni avversi tra le quali irritazione locale a seguito di iniezione intramuscolare.

Sono comunemente utilizzate nel trattamento e nella prevenzione di infezioni locali o sistemiche quali mastiti da *Staphylococcus* e *Streptococcus*, enterotossiemie da *Clostridium spp*, complicazioni da *Pasteurella*, *Salmonella*, *Leptospira* e *Fusiformis nodosus*. La resistenza a tali antibiotici è ampiamente diffusa; per ovviare a tale inconveniente, ottimi risultati si ottengono mediante associazioni di penicilline ad ampio spettro con β -lattamasi inibitori, come l'amoxicillina potenziata dall'acido clavulanico.

Le penicilline trovano impiego anche in applicazioni topiche oculari, auricolari e cutanee; inoltre è ampiamente diffusa la tecnica di somministrazione intramammaria per il trattamento della mastite bovina e ovina. Amoxicillina e penicillina V sono tra le più comunemente utilizzate e possono anche essere somministrate per via orale.

Cefalosporine.

Il termine “cefalosporine” si riferisce ad una varietà di antibiotici semisintetici derivati dalla cefalosporina C, un antibiotico naturale isolato nel 1945 in Sardegna, dallo scienziato Brotzu (Almendros et al., 2008).

Nonostante siano classificate in quattro distinte generazioni in base al loro potere e spettro antibatterico, presentano caratteristiche farmacologiche simili tra loro e affini alle penicilline: sono battericide e poco tossiche, hanno breve emivita, ampia distribuzione tissutale, sono in forma attiva per via renale e la maggior parte sono somministrate per via parenterale. Pochissime cefalosporine sono stabili a pH acido e vengono somministrate oralmente (Bhavsar e Thaker, 2012).

Lo spettro antibatterico delle cefalosporine di I generazione include cocchi Gram-positivi, compresi i ceppi di *S. aureus* β -lattamasi produttori, ed enterobatteri non produttori di cefalosporinasi, quali *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella* e *Klebsiella*. A questo gruppo appartengono cefapirina, cefazolina, cefalexina.

Le cefalosporine di II generazione (cefoxitin, ceforanide, cefaclor) sono più stabili all'idrolisi delle β -lattamasi ed estendono lo spettro d'azione a cocchi Gram-positivi, Gram-negativi, enterobatteri e batteri anaerobi che appaiono resistenti alle molecole di I generazione. Risultano invece inefficaci nei confronti di enterococchi, *Actinobacter spp.*, *Pseudomonas Aeruginosa* e di molti anaerobi obbligati.

L'azione delle cefalosporine di III generazione (ceftiofur, ceftriazone, cefotassima, cefoperazone) presenta scarsa attività verso i Gram-positivi, ma esse risultano molto efficienti verso un gran numero di Gram-negativi, compresi anche *Pseudomonas spp.*, enterobatteri ed anaerobi. In particolare il ceftiofur trova applicazione nel trattamento della sindrome respiratoria del bovino sostenuta da *Pasteurella spp.*

Infine, le cefalosporine di IV generazione sono capaci di contrastare le infezioni sostenute da germi mutanti iperproduttori di cefalosporinasi cromosomiche inducibili, e cioè *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas* oltre che da Gram-positivi e negativi ed enterobatteri.

Come tutte le β -lattamine sono farmaci sicuri e maneggevoli; reazioni di tipo allergico-iperergico sono rare. Si mostrano particolarmente utili per la terapia di infezioni dei tessuti molli e delle ossa sostenute da batteri resistenti ad altri antibiotici, risultando efficaci nel trattamento delle osteomieliti, delle artriti e anche come supporto negli interventi chirurgici. Le cefalosporine in campo veterinario, a causa dei loro costi elevati, sono state impiegate in modo limitato per lungo tempo.

1.5 I RESIDUI ANTIBIOTICI NEL LATTE.

In ambito zootecnico la diffusa somministrazione di antimicrobici (illecitamente come agenti promotori di crescita o a scopo terapeutico) oppure il mancato rispetto dei tempi di attesa favoriscono la presenza di residui antibiotici nella catena alimentare potenzialmente pericolosi per la salute pubblica e per la comparsa di microrganismi antibiotico-resistenti (Bilandzic et al., 2011).

Secondo il DLgs. 158/2006 (attuazione Direttiva 2003/74/CE, art. 1, comma 2, lettera l) per residuo si intende quello “di sostanze ad azione farmacologica, di loro prodotti di trasformazione, nonché di altre sostanze che si trasmettono ai prodotti animali e che possono essere nocivi per la salute umana. Un’altra possibile definizione di “residuo” è quella di “frazione di uno xenobiotico presente in organi o tessuti di animali edibili, o comunque riscontrabile nelle produzioni animali o nei prodotti da queste derivanti, in grado di determinare possibili effetti farmacotossicologici nei confronti del consumatore” (Nebbia, 2009).

In base alla tipologia e alla modalità di trasmissione si è soliti classificare i residui nelle seguenti categorie:

- residui pervenuti: possono essere intenzionali, quando pervengono all’animale in seguito a trattamenti effettuati, e accidentali, quando derivano da contaminazione involontaria (per esempio inquinanti ambientali, contaminazione dei mangimi e dei foraggi o diretta da animale ad animale);
- residui aggiunti: sostanze che volontariamente vengono aggiunte agli alimenti per migliorarne qualità, conservabilità e sanità, note come additivi;
- residui neoformati: sostanze che si formano nell’alimento in seguito a processi di natura fisica e/o chimica.

Il mancato rispetto dei tempi di sospensione del farmaco è forse la principale causa della presenza di residui antibatterici negli alimenti. I tempi di sospensione

(cioè l'intervallo necessario all'organismo animale per metabolizzare il prodotto somministrato e così evitare di trovare residui negli alimenti), specifici per ogni farmaco, sono stabiliti, mediante studi di cinetica residuale sul medicinale veterinario nell'animale di destinazione, per assicurare che i residui ancora presenti siano al di sotto dei limiti massimi fissati (LMR). Altri fattori che possono determinare la presenza di residui nel latte sono: mancata od erronea individuazione degli animali trattati; inesatta registrazione del carico e scarico dei medicinali utilizzati; uso improprio di alcuni farmaci, per esempio in specie da reddito diverse rispetto alle quali le specialità medicinali sono state registrate (possibili le deroghe); impieghi in categorie diverse, per esempio a dosaggi troppo elevati; utilizzo di molecole vietate (CAF, nitroimidazoli, nitrofuranici e simili) o non autorizzate (non comprese nella tabella del Reg. UE 37/2010); usi differenti da quelli terapeutici previsti.

I rischi tossicologici legati all'assunzione di residui possono avere nell'uomo effetti diretti e indiretti. I primi sono quelli derivanti dall'assunzione di residui contenuti negli alimenti e si distinguono in: fenomeni tossici, manifestazioni allergiche, effetti cancerogeni, mutageni e teratogeni. Le conseguenze di uno stato di tossicosi possono manifestarsi sia in forma acuta, come nel caso di manifestazioni allergiche, sia in forma cronica, come nel caso di disturbi all'apparato neuroendocrino o dell'insorgenza di neoplasie. Per molecole per cui è dimostrato un potere cancerogeno si impone il residuo zero che equivale al divieto di utilizzo negli animali da reddito. I rischi tossicologici indiretti sono quelli responsabili di fenomeni di antibiotico resistenza e cross-resistenza verso altri antibiotici (Nebbia, 2009).

I residui rinvenuti nel latte possono provocare le medesime manifestazioni tossiche causate dagli antibiotici durante le terapie generali, soprattutto nei lattanti che vengono alimentati con latte proveniente da soggetti trattati. I segni clinici più frequenti sono le sindromi allergiche (dermatiti, shock anafilattico) in cui

l'antibiotico funge da agente scatenante in individui sensibili. Altro inconveniente, soprattutto nei neonati prematuri, è la possibilità di mobilizzare la bilirubina legata alle proteine e di provocare una sintomatologia piuttosto grave, la sindrome grigia. Inoltre gli antibiotici possono interferire con la flora microbica intestinale (Madden et al., 2005). Pertanto, anche se spesso sono presenti nel latte in concentrazioni molto basse, è sempre opportuno evitare l'utilizzo di questi farmaci negli animali che allattano o che producono latte per uso umano.

Oltre ad essere potenzialmente pericolosi per la salute umana, di recente è stata dimostrata la responsabilità dei residui anche nei confronti dell'inquinamento ambientale (Calza et al., 2010).

Rivestono notevole interesse perfino nel settore lattiero-caseario (Andrew, 2009) poiché tali residui possono interferire negativamente nella lavorazione di formaggi o yogurt, modificando profondamente l'equilibrio della flora microbica presente nel latte e quindi inibendo i processi fermentativi (Grunwald e Petz, 2003). Inoltre determinano un abnorme sviluppo di batteri coliformi che generano difetti deprezzanti il prodotto. Tali inconvenienti riguardano soprattutto la specie ovina e caprina, in quanto il loro latte è principalmente destinato alla caseificazione (Sierra, 2009).

Da sempre, l'obiettivo generale della politica di sicurezza alimentare dell'Unione Europea mira a garantire un elevato livello di salvaguardia della salute umana e degli animali, reso possibile mediante un incremento dei controlli sull'intera catena alimentare ponendo la qualità, inscindibile dalla sicurezza, al centro delle preoccupazioni. Pertanto, in considerazione dell'importante ruolo dell'uso dei medicinali veterinari nella produzione zootecnica (Signorini et al., 2009), le autorità governative hanno ritenuto necessario, attraverso la farmacovigilanza e la farmacovigilanza, approfondire le conoscenze e gli studi sui farmaci veterinari

destinati agli animali in produzione, approvando o registrando usi sicuri e monitorando i prodotti alimentari per la presenza di residui dannosi o proibiti. In particolare intervengono le Agenzie della Comunità Europea preposte alla tutela della sicurezza del consumatore, quali l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) che fornisce consulenze scientifiche indipendenti su qualunque argomento abbia un'attinenza con la sicurezza alimentare e l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) la quale emana direttive e regolamentazioni per armonizzare l'uso del farmaco veterinario all'interno degli Stati membri della UE.

Inoltre, a salvaguardia della salute pubblica e della salubrità degli alimenti di origine animale, dal 1988 viene predisposto e realizzato il "Piano Nazionale per la ricerca dei Residui" (PNR), un programma articolato su base annuale che prevede la sorveglianza ed il monitoraggio della presenza di residui di sostanze chimiche negli alimenti di origine animale. Il Piano Residui è svolto ai sensi del Decreto Legislativo 16 marzo 2006 n.158 e s.m., norma di recepimento delle Direttive comunitarie 96/22/CE e 96/23/CE.

Per di più la consapevolezza dei potenziali rischi per la salute del consumatore ha indotto i governi dei vari paesi ad introdurre nelle proprie legislazioni concentrazioni massime di residui tollerati negli alimenti. L'Unione Europea, attraverso il Regolamento (CE) n. 470/2009 che abroga il Regolamento (CEE) del consiglio n. 2377/90 del 26 giugno 1990, definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui (LMR o MRL) di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale (EU, 2010). Per "limite massimo di residui" s'intende la concentrazione massima per un residuo, in seguito alla somministrazione di un medicinale veterinario, che è legalmente permessa e che può dunque essere ammessa per legge o riconosciuta accettabile in un alimento senza costituire un rischio per il consumatore.

I LMR per una molecola vengono fissati a partire dalla Dose Giornaliera Accettabile (DGA) che indica una stima della quantità di un farmaco veterinario, espressa in rapporto alla massa corporea, che può essere assunta da un individuo per tutta la vita senza correre significativi rischi tossicologici.

I limiti massimi di residui (UE-LMR) di medicinali veterinari prodotti negli alimenti di origine animale sono stabiliti dalla Commissione del Codex Alimentarius (2009), dal Regolamento (CE) sopracitato n. 470/2009 (Regolamento 470, 2009) e dal Regolamento (UE) della Commissione n. 37/2010 (EU, 2010) concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione relativa ai limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale.

Il Regolamento (CE) n. 470/2009 stabilisce che:

“Al fine di tutelare la salute pubblica, i limiti massimi dei residui dovrebbero essere definiti conformemente ai principi generalmente riconosciuti della valutazione della sicurezza, tenendo conto dei rischi tossicologici, della contaminazione ambientale nonché degli effetti microbiologici e farmacologici dei residui. Si dovrebbe inoltre tenere conto di altre valutazioni scientifiche della sicurezza delle sostanze interessate che siano state effettuate da organizzazioni internazionali o da organismi scientifici stabiliti all'interno della Comunità”.

Inoltre il predetto Regolamento definisce «residui di sostanze farmacologicamente attive» tutte le sostanze farmacologicamente attive (espresse in mg/kg o µg/kg sulla base del peso fresco, siano esse sostanze attive, eccipienti o prodotti della degradazione) e i loro metaboliti che rimangono negli alimenti ottenuti da animali; indica inoltre tra gli «animali destinati alla produzione di alimenti» quelli selezionati, allevati, detenuti, macellati o raccolti allo scopo di produrre alimenti.

Esistono tuttavia sostanze farmacologicamente attive per le quali non è stato possibile fissare dei LMR; i residui di queste sostanze infatti rappresentano un

rischio per la salute umana anche a concentrazioni molto basse e di conseguenza il loro utilizzo per la formulazione di presidi medicinali non è autorizzato dalla Comunità Europea. Il cloramfenicolo, ad esempio, pur essendo un agente terapeutico molto valido, efficace per il trattamento della mastite nei bovini, può produrre effetti nocivi se assunto attraverso l'alimentazione, e perciò la somministrazione ad animali destinati alla produzione di derrate alimentari è severamente proibita sul territorio di tutti gli Stati membri (EU, 2010; Bilandzic et al., 2011).

Nel caso venga provato l'utilizzo di sostanze non autorizzate in animali da produzione e negli alimenti derivati sono disposte sanzioni amministrative e penali. L'azienda interessata è sottoposta a sequestro e vengono effettuate ulteriori indagini, nonché il prelievo di campioni al fine di svelare la portata del trattamento illecito. Sulla base dei risultati degli accertamenti gli enti di controllo possono destinare alla distruzione le derrate alimentari contenenti sostanze pericolose ed eventualmente procedere all'abbattimento degli animali che sono stati illecitamente trattati.

Se vengono ritrovati residui di sostanze autorizzate, ma in quantità superiori a quelle previste dai LMR, l'autorità competente effettua un'indagine nell'azienda di origine o di provenienza per stabilire le cause. Inoltre, in base ai risultati della ricerca è necessario adottare le misure necessarie per la tutela della sanità pubblica, compreso eventualmente il divieto di uscita degli animali o dei prodotti dall'azienda o dallo stabilimento di cui trattasi per un determinato periodo (IZSL&T, 2013).

Il passaggio dei farmaci nel latte rappresenta un'argomentazione di grande rilevanza, da tenere in considerazione al momento di un'eventuale terapia veterinaria, essendo il latte uno degli alimenti più importanti per la specie umana, sia come tale che sotto forma di prodotti di trasformazione. Per capirne di più è necessario fare dei riferimenti alla farmacocinetica, disciplina che studia cinetica, assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione del farmaco. I fattori che

influenzano la distribuzione del farmaco nel latte sono: la struttura chimica del principio attivo, la posologia del trattamento e le modalità di somministrazione.

Se prendiamo in considerazione la mastite che rappresenta una delle patologie più frequenti negli ovini, la terapia può realizzarsi per via endomammaria, la quale rimane quella di elezione in caso di mastiti sub-cliniche o croniche, principalmente utilizzata nelle bovine da latte, o per via parenterale, impiegata in presenza di mastite acuta o per qualsiasi infezione batterica.

Precisamente nel corso di gravi processi infettivi della mammella, la terapia antibiotica intramammaria potrebbe essere inefficace a causa della scarsa distribuzione del farmaco nel parenchima mammario; in questi casi è quindi preferibile il trattamento con farmaci sistemici, che permette un miglior controllo della diffusione del patogeno e di eventuali forme subcliniche non diagnosticate nei quarti apparentemente sani (Serieys et al., 2005). Ciò è particolarmente veritiero per i piccoli ruminanti in cui l'applicazione topica intramammaria dei farmaci è di difficile attuazione (Bergonier et al., 2003). Da un punto di vista clinico, il successo della terapia antimastitica per via endovenosa o intramuscolo dipende dall'effettivo passaggio del farmaco dal sangue nel latte. In questi casi è di significativa importanza la scelta di antibatterici che vengano escreti con il latte e raggiungano concentrazioni terapeutiche nella mammella. Tra questi l'enrofloxacin, antibatterico appartenente alla classe dei fluorochinoloni, appare idoneo per il trattamento sistemico delle mastiti nei piccoli ruminanti in quanto caratterizzato da un ampio spettro d'azione, dalla trasformazione metabolica in un derivato attivo, la ciprofloxacina, e da una larga eliminazione nel latte (Tortora et al., 2005)

Tenendo presente che il latte è un'emulsione di lipidi e proteine in soluzione acquosa, in esso si possono trovare sostanze liposolubili, idrosolubili e che si legano a proteine plasmatiche. I farmaci si possono distribuire sia nella fase acquosa che

nella fase grassa del latte e possono legarsi alle proteine del latte e a quelle del tessuto mammario. I farmaci, dopo l'assorbimento attraverso il circolo sanguigno, arrivano nell'interstizio perialveolare della ghiandola mammaria. Da questo distretto, durante la lattazione, le molecole libere, non più legate alle proteine plasmatiche, possono attraversare la lamina basale e l'epitelio alveolare per giungere nel latte per mezzo di diversi meccanismi. E' stato dimostrato che il passaggio di queste sostanze e, in particolare degli antibiotici, a livello della ghiandola mammaria, avviene solitamente per mezzo di diffusione passiva semplice. La concentrazione dei farmaci nel latte dipende dalla solubilità della sostanza in questione e, inoltre, può essere rilevante il grado di ionizzazione del farmaco. Visto che il pH del latte è più acido del pH del plasma, farmaci debolmente basici avranno maggiore facilità a diffondere dal plasma al latte, mentre farmaci debolmente acidi, ovviamente, mostreranno un comportamento contrario (Ziv, 2013).

Altri meccanismi che permettono agli antibiotici di passare dal sangue al latte sono quelli attivi, che richiedono dispendio di energia (consumo di ATP), fornita da processi metabolici intracellulari; inoltre, alcuni chemioterapici attraversano le membrane per diffusione facilitata mediante "carriers" o per pinocitosi.

1.6 I TEST PER LA RILEVAZIONE DI RESIDUI ANTIBIOTICI NEL LATTE.

Come detto nei precedenti paragrafi introduttivi, i residui delle sostanze farmacologicamente attive, come gli antibatterici, possono essere riscontrati nel latte e in tutti gli alimenti di origine animale a seguito di trattamenti terapeutici dell'animale stesso o, pervenuti in modo accidentale, durante qualsiasi fase della filiera produttiva, per esempio a causa di contaminanti ambientali o di inquinamento del mangime.

Per questo motivo, i diversi organismi legislativi nazionali e sovranazionali hanno fissato i cosiddetti *maximum residue limits* (MRLs), ovvero la concentrazione massima di residui consentita legalmente negli alimenti affinché il prodotto si possa destinare sia alla commercializzazione che al successivo consumo e non rappresenti un pericolo per il consumatore.

Al giorno d'oggi sono stati descritti e sperimentati vari metodi analitici per la ricerca di residui di farmaci ad azione antimicrobica. Col tempo si sono perfezionati e sono diventati talmente sensibili che consentono di determinare negli alimenti e nel latte quantità dell'ordine di ppb (parte per bilione o microgrammo/Kg). È stato, infatti, abbandonato e attualmente non è più ritenuto valido il vecchio concetto del “livello zero o residuo zero” che non ammetteva la presenza di sostanze xenobiotiche nelle derrate di origine alimentare (Signorini et al., 2009).

Tali metodologie vengono suddivise, in base ai loro meccanismi, in diversi gruppi: si conoscono test di inibizione della crescita microbica, test enzimatico-colorimetrici, test del legame recettoriale, metodiche cromatografiche, biosensori e test immunochimici (Ergin-Kaya e Filazi, 2010).

Possono inoltre essere classificate, secondo le risposte che forniscono, in qualitative, quantitative e semiquantitative.

I test qualitativi danno risposte che indicano la presenza o l'assenza di una sostanza in un alimento. Per poter identificare i campioni positivi o negativi è indispensabile che venga fissato un valore soglia, tenendo conto dei MRL.

Quelli di tipo quantitativo confrontano il campione in esame con dei valori di riferimento certificati, mediante i quali è possibile realizzare una curva di calibrazione.

I test semi-quantitativi somigliano a quelli quantitativi, ma a differenza di questi non danno risposte espresse come precisi valori, piuttosto come range di concentrazione, ad esempio campioni negativi, debolmente positivi, positivi, molto positivi.

Non è possibile stabilire se un metodo sia migliore di un altro. Nessuna tecnica, infatti, permette di avere il massimo di semplicità, velocità, sensibilità, accuratezza, precisione e convenienza. A seconda delle differenti esigenze analitiche bisogna scegliere il compromesso migliore. Qualunque sia la preferenza, è necessario ovviamente che la metodica venga validata ovvero sia provata la corrispondenza tra le specifiche caratteristiche del prodotto e le sue effettive prestazioni. Inoltre, del metodo selezionato, vanno verificate le proprietà: la sensibilità (capacità di identificare correttamente come positivi i campioni contenenti una certa quantità di analita), la specificità (il rapporto tra il numero di risultati negativi e il numero totale di campioni analizzati), l'accuratezza (vicinanza del valore rilevato a quello vero) e la precisione (vicinanza tra loro dei valori rilevati per una stessa analisi ripetuta) (Rosar, 2013).

Per esempio, i test di inibizione della crescita microbica e i test immunologici possono essere utilizzati come metodiche di screening, in quanto permettono di saggiare in breve tempo una grande quantità di campioni, dando un basso numero di falsi negativi e un numero accettabile di falsi positivi; forniscono, però, solo misure

semiquantitative e non sono abbastanza specifici per garantire accurate identificazioni (Berendsen et al., 2011). Per superare queste difficoltà, e quindi avere prova della positività e della quantificazione del residuo, vengono utilizzate altre tecniche di tipo quantitativo, come la cromatografia liquida, possibilmente associate alla spettrometria di massa per una conferma di certezza (García Mayor et al., 2012).

Tra i vari tipi, quelli più frequentemente impiegati in ambito veterinario e largamente disponibili sul mercato sono i metodi microbiologici, i quali permettono di rilevare la presenza di antibiotici mediante un microrganismo che viene inibito dalla loro presenza. Generalmente si basano sull'arresto della crescita delle colonie batteriche di un organismo standard, il *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, su terreni di coltura a base di sostanze antimicrobiche presenti nel medium analizzato (Comunian et al., 2010; Nagel et al., 2011).

Di solito tali test sono estremamente sensibili ai β -lattamici ma mostrano scarso potenziale di rilevazione per altri gruppi di antimicrobici utilizzati per il trattamento del bestiame, come aminoglicosidi, macrolidi, chinoloni, tetracicline e sulfamidici (Montero et al., 2005; Althaus et al., 2009). A causa della bassa sensibilità di *G. stearothermophilus* verso questi ultimi, alcuni autori hanno sviluppato metodi multi-residuo costituiti da un differente numero di microrganismi e da particolari condizioni specifiche (pH, temperatura e tempo di incubazione) per l'analisi di diversi antimicrobici contemporaneamente (Althaus et al., 2009). Il loro meccanismo avviene mediante incubazione di un microrganismo sensibile in presenza del campione di latte. Quando il latte non è contaminato, il batterio cresce e può essere rilevato visivamente grazie ad un cambiamento di colore del mezzo agar dovuto alla produzione di acido. In presenza di un antibiotico, o di un qualsiasi altro inibitore, il microrganismo riesce a svilupparsi comunque, ma si osserva una

variazione che può dipendere o da una zona di inibizione o dalla mancanza di un colore.

Tutti i metodi ad inibizione della crescita sono relativamente veloci e semplici, generalmente affidabili e convenienti, ma hanno limitata specificità e richiedono lunghi periodi di incubazione (Moeller et al., 2007; Conzuelo et al., 2012). Un elevato numero è disponibile in commercio e molti di questi test sono stati convalidati e confrontati da numerosi autori. Il più diffuso è il Delvotest, ma ne esistono altri (Copan, Eclipse eccetera) basati sull'utilizzo di *Bacillus stearothermophilus* o di altri batteri (*Streptococcus thermophilus* nel Valio T101) presenti singolarmente o in associazione (Kantiani et al., 2009).

La maggior parte di tali tecniche è stata progettata e testata principalmente sul latte vaccino e successivamente utilizzata per il latte di altre specie lattifere; pochi studi sono stati effettuati finora sul latte di pecora e capra (Sierra et al., 2009). Per alcuni test microbiologici, diversi autori hanno sottolineato il problema dei risultati falsi positivi e dubbi, osservati in particolar modo durante l'analisi di campioni di latte ovino (Molina et al., 2003; Althaus et al., 2009). Questi possono essere attribuibili alla presenza dell'elevata conta delle cellule somatiche e ad aspetti correlati con alcuni costituenti del latte ovino (Althaus et al., 2003). Infatti, la diversa composizione chimica e la maggiore attività di agenti microbici inibitori della crescita nel latte di pecora rispetto al latte vaccino (es. lattoperossidasi, lattoferrina, lisozima ed enzimi) possono rappresentare la causa delle differenti risposte ai test microbiologici utilizzati negli ovini (Molina et al., 2003).

Alcuni metodi alternativi di tipo quantitativo, quindi più precisi ed affidabili rispetto ai precedenti, sono stati sviluppati sulla base di tecniche cromatografiche, come la cromatografia su strato sottile (TLC), l'elettroforesi capillare (CE) e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Sono test specifici che ricercano

molecole singole o anche più contaminanti e sono in grado di quantificarle. Richiedono lunghe procedure di estrazione, personale qualificato e sono piuttosto costosi. Vengono utilizzati soprattutto per determinare tetracicline nel latte e nei tessuti animali (Mesgari Abasi et al., 2009; Fritz e Zuo, 2007).

Particolarmente utili in questo campo, grazie alla loro semplicità ed economicità, sono i metodi immunochimici. Essi sono, di solito, in grado di rilevare basse concentrazioni di residui, in breve tempo, riducendo al minimo le fasi preliminari dell'analisi. I metodi ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) sono attualmente tra i più utilizzati (Pastor-Navarro et al., 2009). I principali svantaggi risiedono in una certa complessità di studio e preparazione, nel gran numero di fasi di incubazione e di lavaggi richiesti e in una loro difficoltà ad essere automatizzati (Conzuelo et al., 2012).

Recentemente, inoltre, è stato proposto un nuovo metodo per la ricerca di antibiotici, e in particolare tetracicline, che si basa sull'utilizzo di un immunosensore amperometrico (Conzuelo et al., 2012). Questo può individuare varie molecole della classe delle tetracicline, nel latte vaccino, con un limite di rilevazione di valori a concentrazioni nettamente inferiori al MRL specifico per la classe che è pari a 100 mg/kg. Il tempo di analisi è di circa 30 minuti, inferiore a quello necessario per i test ad inibizione microbiologica ma superiore a quello tipico dei test rapidi, che sono in grado di svelare residui antibiotati in breve tempo.

I test rapidi sono di tipo qualitativo e usano diverse tecniche che consentono in pochi minuti di realizzare un'analisi qualitativa (presenza o assenza), senza però quantificare l'antibiotico presente. In genere determinano solo i β -lattamici che sono i più usati ed i più contaminanti, ma anche le tetracicline e altre famiglie (Penzym, Betastar, Snap, Charm II ecc).

Un test appartenente a questa tipologia è il Betastar®, il quale rileva la presenza di antibiotici del gruppo dei β -lattamici (ad esempio penicillina, ampicillina, amoxicillina, ceftiofur) nel latte. Questo gruppo di principi attivi è tra gli antibiotici più frequentemente utilizzati in medicina veterinaria per il trattamento degli animali in Europa (Chafer-Pericásey al., 2010; Kantiani et al., 2010) e di conseguenza tra i più comuni residui riscontrati nel latte (Gustavsson et al., 2004).



Figura 1. Il test diagnostico BETASTAR® Combo (DKOMa/Product Information/Betastar® Combo/Dec 2010 v2/3:3.)

Betastar® Combo 3.0 (Figura 1), oltre allo spettro di sensibilità di Betastar®, individua la presenza di antibiotici del gruppo delle tetracicline nel latte (ad esempio ossitetraciclina e clortetraciclina) e permette il rilevamento di residui di β -lattamici e

tetracicline in una sola operazione. Le tetracicline occupano il secondo posto come antibiotici contaminanti il latte e sono frequentemente riscontrate soprattutto nel latte ovino e caprino; tale evento assume notevole rilievo nella realtà della Sardegna, dove l'antibiotico più largamente o quasi esclusivamente utilizzato è l'ossitetraciclina (Ibba, 2005).

Questo test di tipo “receptor-based” si basa sulla reazione di reagenti legati a particelle d'oro (Neogen, 2011).

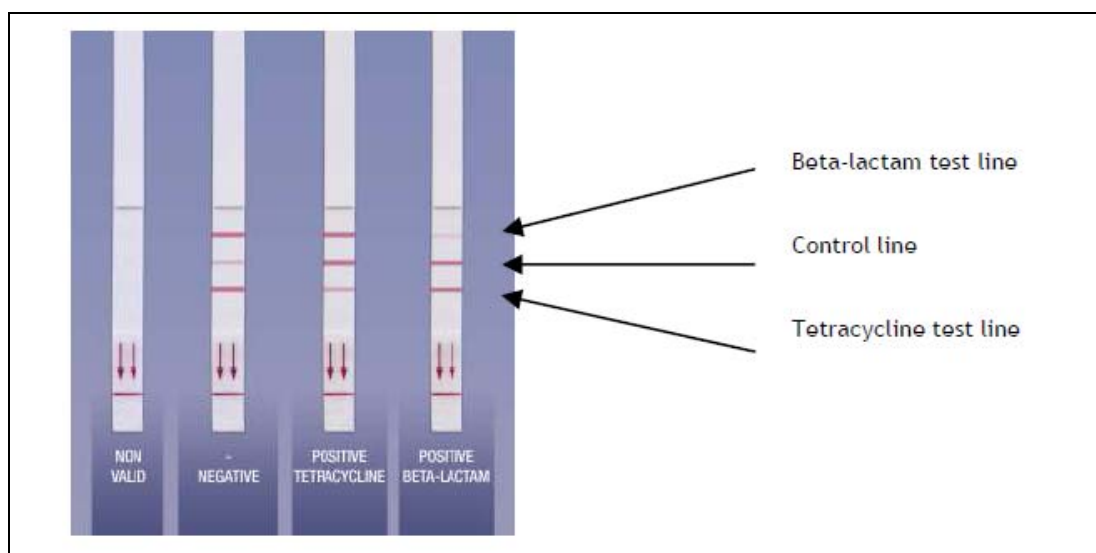


Figura 2. Interpretazione dei risultati del test diagnostico BETASTAR® Combo (DKOMa/Product Information/Betastar® Combo/Dec 2010 v2/3:3.).

Si articola in due semplici passaggi (Figura 2): durante la prima fase, quella di incubazione (che avviene a 47,5°C per tre minuti), il latte viene aggiunto al reagente legante le particelle d'oro contenuto nel flacone e, creando una soluzione e causando l'interazione degli antibiotici (sia β -lattamici e/o tetracicline) con i reagenti di legame; durante la seconda fase, si inserisce la striscia-test nella fiala e si ripete l'incubazione per altri due minuti alla stessa temperatura; la soluzione migra sulla

cartina (medium immunocromatografico) sulla quale sono presenti tre linee di rilevamento.

La linea inferiore della cartina cattura tutti i reagenti della classe delle tetracicline che non hanno interagito con il legante durante l'incubazione preliminare. La linea mediana è la linea di controllo che garantisce il corretto funzionamento della prova stessa e che è utile anche come confronto con le linee inferiori e superiori. La riga superiore cattura tutti i betalattamici che non hanno interagito con il legante durante l'incubazione preliminare.

Questo test è stato ampiamente esaminato ed attualmente utilizzato nel latte vaccino e nessuno finora lo ha mai sperimentato nella specie ovina. Ma, come riportato da Comunian et al. (2010), la diversa composizione del latte di pecora potrebbe influire in modo significativo sul rilevamento di antibiotici in questa matrice.

L'uso di questi test di screening, disponibili in commercio e sviluppatasi per essere utilizzati direttamente sul campo (“on-farm”) e fornire un risultato diagnostico in pochi minuti, ha svolto un ruolo importante nel prevenire la vendita e il consumo di prodotti lattiero-caseari contaminati da antibiotici.

Questi test, originariamente progettati per ottenere un rapido risultato in azienda, hanno dimostrato di essere strumenti efficaci per la ricerca di residui di antibiotici anche nel latte miscelato proveniente da specie diverse (Contreras et al., 1997; Andrew, 2000) o sulle farine di latte disidratato (Kneebone et al., 2010).

2. Scopo

Nei Paesi industrializzati i prodotti di origine animale costituiscono la componente predominante dell'alimentazione umana. Latte e carne forniscono all'uomo nutrienti fondamentali di alto valore energetico difficili da ricavare da diete composte solo da alimenti di origine vegetale.

In questo panorama, caratterizzato oggi da una crescente domanda di alimenti proteici, si assiste, nel settore zootecnico, ad una spinta sempre più forte verso un'ottimizzazione delle produzioni. Tale propensione si è potuta realizzare sia attraverso la selezione genetica ed il miglioramento delle tecniche di produzione, sia attraverso il ricorso alla somministrazione di sostanze diverse da quelle alimentari, quali farmaci, additivi e ormoni. L'impiego di tali sostanze, purtroppo, può causare gravi pericoli igienico-sanitari per gli alimenti e, di conseguenza, per la salute umana.

A questa tendenza si aggiunge, inoltre, la comune prassi dell'utilizzo di antibiotici che trovano diverse applicazioni pratiche nel settore zootecnico. La principale destinazione è rappresentata dal trattamento terapeutico di patologie o infezioni comuni che, solitamente, richiedono dosi alte di farmaco per periodi di tempo relativamente brevi. Gli antibatterici, però, possono essere anche usati a scopo preventivo per evitare la diffusione di malattie trasmissibili e, in questo caso vengono somministrati a basse dosi per periodi più prolungati. Infine, li si può impiegare come promotori di crescita con terapie che spesso durano per gran parte della vita dell'animale.

A tal proposito l'uso sistematico di questi farmaci, talvolta improprio ed eccessivo, può avere importanti ripercussioni sulla società, sia per l'impatto ambientale connesso alla gestione dei reflui zootecnici contaminati da residui di medicinali, sia per la presenza dei residui di antibiotici negli alimenti di origine animale.

Tale tematica assume notevole interesse dal punto di vista della sanità pubblica ma anche da quello della situazione economica, principalmente nel comparto lattiero-caseario (Salter et al., 2011). È noto infatti che l'ingestione continua di latte antibiotato può causare nell'uomo reazioni allergiche, interferenze nella flora intestinale, e creare fenomeni di resistenza alle differenti classi batteriche, rendendo così il trattamento antibiotico inefficace. Per quanto concerne la trasformazione del latte, oltre all'impossibilità di alcune produzioni, queste sostanze interferiscono nei processi tecnologici dei prodotti caseari, disturbando la normale fermentazione lattica ed alterando le qualità organolettiche dei prodotti finiti, deprezzandoli e rendendoli quindi poco remunerativi sul mercato.

Questa problematica va ad aggravare una situazione già critica, nella nostra realtà regionale, che vede come protagonista il costante sottodimensionamento del prezzo del latte ovino pagato in Sardegna, rispetto alle quotazioni "ufficiali" del resto d'Italia e d'Europa, spinto al ribasso dalle tensioni di un mercato non preparato a far fronte alle esigenze dei produttori.

La Sardegna, essendo il maggior produttore nazionale di latte ovino, risente notevolmente di tali ristrettezze, esacerbate pesantemente anche dalla sua condizione di insularità e dalle arretratezze manageriali rispetto al nord Italia. In una regione in cui la pastorizia è fondamentale per l'economia locale, come già detto, si allevano poco più di tre milioni di ovini, circa il 43% del patrimonio nazionale, appartenenti tutti alla razza Sarda. Questa presenta un'attitudine per il latte, per la quale, in questi anni, attraverso strategie di selezione genetica, è stata promossa una considerevole azione mirata all'innalzamento qualitativo del prodotto, supportata tra l'altro dalla creazione di un libro genealogico.

Il latte prodotto in Sardegna viene interamente destinato alla commercializzazione e alla trasformazione, della quale solo in piccolissima parte si

occupano le stesse aziende familiari, ma che per la maggior parte è curata dalla grande distribuzione, sostenuta da imprese industriali private e in minor misura da cooperative (Idda et al., 2010).

In questo contesto, sia nella nostra regione come in altri Paesi del Mediterraneo, la produzione di latte di pecora e capra riveste un ruolo primario grazie alla sua antica storia pastorale e alla crescente commercializzazione dei prodotti tipici, come ad esempio i formaggi (Beltran et al., 2013a) che portano la denominazione di origine protetta.

Per queste singolari ragioni e, anche in considerazione delle odierne preferenze dei consumatori verso argomenti di costante attualità come la sicurezza e la garanzia degli alimenti, emerge l'esigenza di valutare attentamente la qualità del latte, principalmente in termini di proprietà tecnologiche o di coagulazione, la quale può essere influenzata negativamente dalla presenza di residui di antibiotici nel latte (Andrew, 2009). La pratica di svelare la presenza di residui antimicrobici appare ancora come un'attività limitata, a causa della complessa attrezzatura di laboratorio necessaria e degli alti costi richiesti (Camara et al., 2013). Tuttavia, sono stati istituiti programmi di controllo che includono vari metodi analitici per determinarne la presenza nel latte (Ergin-Kaya e Filazi, 2010) e attualmente sono disponibili in commercio numerosi test di screening in grado di rilevare diversi tipi di antibiotici (ISO/IDF, 2010), alcuni dei quali sono stati valutati anche nella pecora (Yamaki et al., 2004; Le Breton et al., 2007). La scelta di un particolare test dipende da molte varianti tra le quali la fase di controllo (allevamenti, caseifici o laboratori) e il tipo di antibiotico utilizzato nella catena di produzione del latte.

I cosiddetti "Receptor-binding" sono comunemente utilizzati, grazie alla loro risposta semplice e veloce, nelle aziende agricole e nei caseifici (Beltran et al., 2013a). Queste metodiche, basate sull'uso di recettori specifici per individuare

molecole di antibiotici, erano originariamente progettate per la rapida individuazione di antibiotici β -lattamici nel latte di vacca (Charm e Zomer, 1995). Negli ultimi anni i test si sono evoluti, ampliando il loro spettro per la rilevazione di numerosi antimicrobici, come tetracicline, gentamicina, enrofloxacin, o sulfamidici; inoltre, altre innovazioni riguardano la riduzione del periodo di analisi richiesto e la capacità di individuare contemporaneamente vari gruppi di antibiotici grazie alla scoperta di test combinati (Beltran et al., 2013b).

Considerando lo scenario produttivo del sistema caseario ovino nel quale l'attività pastorale della Sardegna viene collocata e la quasi totale assenza locale di una valida metodica che individui la presenza di antibiotici nel latte ovino, insieme al mio gruppo di ricerca abbiamo deciso, dopo proposta di una ditta privata, di validare una pratica in grado di rilevare gli antibiotici nel latte ovino.

Se valutiamo il territorio regionale a cui è legata la nostra grande tradizione agricola emerge chiaramente che la tipologia di allevamento è costituita dal sistema estensivo, basato sull'apporto di risorse pascolative e reso possibile dalle grandi superfici agricole disponibili che permettono di sfruttare il suolo, contemporaneamente per le coltivazioni e per il mantenimento del bestiame.

Per tali ragioni, appare del tutto evidente la necessità di mettere a punto un procedimento pratico, veloce e semplice, che possa essere utilizzato direttamente in allevamento o in qualsiasi laboratorio di analisi sul latte di massa o individuale, senza dover ricorrere a particolari ed ingombranti strumentazioni, scomode e poco maneggevoli da trasportare sul campo.

Per questa ricerca è stato testato un apposito kit rapido, fino a quel momento utilizzato solo nella specie bovina, in grado di individuare prontamente nel latte due famiglie di antibiotici, presenti in differenti concentrazioni: betalattamine e tetracicline.

Lo scopo di questo studio è di valutare il presente test e di affinare un protocollo consono alla rilevazione di betalattamici e/o tetracicline nel latte di pecora, al fine di convalidare il prodotto per la specie ovina.

3. Materiali e metodi

Animali e campionamenti.

La prima fase del disegno del protocollo sperimentale, che consisteva nella scelta e campionamento degli animali, è stata progettata in modo che rispondesse ad una reale situazione riscontrabile sul campo e, in particolare, inerente la realtà dell'allevamento ovino da latte normalmente praticato in Sardegna.

Gli animali selezionati per la sperimentazione erano esclusivamente impiegati per la raccolta dei cosiddetti campioni di latte NCS (*negative control samples*, campioni di controllo negativi). Per queste attività non è stata richiesta alcuna autorizzazione specifica a comitati deputati a garantire l'etica e il benessere animale poiché, in accordo con l'articolo 2 della Direttiva 86/609/EEC, le procedure usate non sono incluse nei criteri generali di una sperimentazione animale; inoltre, gli animali utilizzati non appartenevano a specie protette o in pericolo d'estinzione.

Un totale di 13 pecore primipare di razza Sarda venivano scelte in maniera casuale tra gli animali appartenenti ad un gregge di un'azienda privata sita nel comune di Porto Torres, in Provincia di Sassari. L'azienda era condotta a livello familiare e la gestione zootecnica degli animali seguiva i tradizionali metodi semi-estensivi dell'allevamento ovino normalmente praticato in Sardegna. Il gregge era composto da circa 200 pecore in lattazione e quattro arieti, che venivano principalmente alimentati al pascolo. Il pascolamento avveniva nei terreni circostanti l'azienda e aveva una durata di circa tre ore al giorno (dalle 10:00 alle 13:00); inoltre gli animali ricevevano una supplementazione di 200 g/capo/giorno di polpa di barbabietola e 300g/capo di un mangime concentrato pelletato (15,5% proteina cruda) due volte al giorno durante le procedure di mungitura. Precisamente le pecore erano munte due volte al giorno (alle ore 6:00 e alle 17:00, Figura 3) attraverso l'utilizzo di una mungitrice meccanica; la mammella non veniva deterisa prima della mungitura ma, subito dopo la stessa, i capezzoli erano immediatamente sottoposti a

disinfezione con un trattamento spray a base di ipoclorito di sodio, per diminuire l'ingresso di microrganismi attraverso il foro papillare e verso il parenchima mammario. La riproduzione era basata sulla monta naturale e gli agnelli venivano allattati dalle proprie madri e svezzati ad una età di circa 30 giorni e un peso medio di 10 kg.

I 13 animali utilizzati per la raccolta dei NCS erano selezionati tra le pecore primipare (le cosiddette “saccaie”) che avevano partorito nei precedenti mesi di Febbraio e Gennaio 2012. Durante la fase preliminare di programmazione della ricerca, la decisione di utilizzare pecore primipare anziché pluripare è stata maturata sulla considerazione che animali giovani potevano garantire un rischio inferiore di patologie infettive passate e future e, di conseguenza, una minore eventualità di effettuare dei trattamenti antibiotici. Infatti, gli animali erano esclusivamente utilizzati per la raccolta di latte NCS, che doveva provenire esclusivamente da pecore “*antibiotics free*”, ed essere successivamente contaminato in laboratorio per ottenere i *positive control samples* (PCS).

Per assicurare un corretto riconoscimento degli animali, questi erano identificati individualmente tramite targa auricolare e bolo ruminale rilevabile con transponder elettronico, secondo il Regolamento del Consiglio EU 21/2004 (EC, 2004). Inoltre, al fine di facilitare le procedure di individuazione degli animali durante le fasi del campionamento, una banda plastica colorata veniva apposta attorno alla regione del metatarso degli animali sottoposti alla prova (Figura 3).



Figura 3. Dall'alto e da sinistra a destra: procedure di mungitura; integrazione alimentare; identificazione tramite trasponder elettronico; identificazione tramite banda colorata in plastica al metatarso.

I 13 animali erano sottoposti a visita clinica e giudicati sani al momento della selezione e non avevano evidenza di malattie durante l'intero periodo delle prove.

Oltre a ciò, per garantire che i campioni di latte NCS fossero realmente *antibiotics free*, sono state individuate e scelte pecore sulle quali non era mai stata effettuata alcuna terapia antimicrobica. Il solo trattamento ricevuto era legato alla somministrazione per via orale di un farmaco antielmintico nel mese di Agosto 2011 (12 mL/capo ORAMEC, ivermectina, Merial Italia SpA, Assago, Italia).

In Tabella 7 è riportato il codice identificativo, la data di nascita e del parto delle 13 pecore.

Tabella 7. Codice identificativo, data di nascita e del parto dei tredici animali utilizzati per la raccolta dei NCS.

n	cod. identificativo	Data di nascita	Data del parto
1	038*****767	Ottobre 2010	03 Gennaio 2012
2	038*****795	Ottobre 2010	15 Gennaio 2012
3	038*****793	Ottobre 2010	07 Febbraio 2012
4	038*****796	Ottobre 2010	12 Febbraio 2012
5	038*****759	Ottobre 2010	24 Gennaio 2012
6	038*****784	Ottobre 2010	18 Gennaio 2012
7	038*****780	Ottobre 2010	23 Gennaio 2012
8	038*****775	Ottobre 2010	10 Gennaio 2012
9	038*****753	Ottobre 2010	15 Gennaio 2012
10	038*****802	Ottobre 2010	21 Gennaio 2012
11	038*****801	Ottobre 2010	15 Gennaio 2012
12	038*****798	Ottobre 2010	24 Gennaio 2012
13	038*****770	Ottobre 2010	27 Gennaio 2012

Con lo scopo di investigare il probabile effetto causato dai differenti stadi di lattazione e aumentare il numero totale di prove, la raccolta dei campioni NCS veniva progettata in tre differenti sedute: 30 Maggio, 13 Giugno e 27 Giugno 2012. Precedentemente alla seduta del 30 Maggio, sette dei 13 animali prescelti venivano selezionati casualmente (tramite estrazione) e successivamente sottoposti al campionamento in azienda. La scelta di aver identificato un numero totale di 13 animali, quindi maggiore rispetto ai sette realmente sottoposti al prelievo di latte, era stata pianificata intenzionalmente per soddisfare due esigenze: i) sostituire eventuali animali che mostrassero segni di malattia e di conseguenza venissero eliminati dalla prova; ii) aumentare il livello di casualità (*randomization*) nella selezione degli animali sottoposti al prelievo dei campioni di latte NCS.

Per ognuna delle tre prove, l'iter di campionamento era identico e seguiva il seguente protocollo (Figura 4). Durante le operazioni della mungitura mattutina, presso l'azienda, le sette pecore venivano individuate tramite l'osservazione della banda plastica verde e successivamente si procedeva alla identificazione

inequivocabile tramite lettura del trasponder elettronico. Le sette pecore erano munte a mano invece che con la mungitrice automatica, per evitare possibili contaminazioni crociate della mammella e del latte attraverso le tettarelle e le tubature del sistema di mungitura; inoltre i primi getti di latte venivano eliminati e non inclusi nella raccolta per il campionamento e il mungitore prima della mungitura di ogni animale indossava un nuovo paio di guanti in plastica.

L'intera produzione della mungitura mattutina di ciascun capo veniva raccolta in un contenitore in plastica monouso, pesato e travasato in una bottiglia in plastica usa e getta. Per ogni pecora ed ogni prova si utilizzavano un contenitore ed una bottiglia nuovi. Le bottiglie erano immediatamente refrigerate a 4 °C e trasferite presso il laboratorio del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari (DMVSS) entro 30 minuti dalla fine della fase di mungitura.



Figura 4. Dall'alto e da sinistra: mungitura manuale di una delle sette pecore per il prelievo del campione NCS; misurazione della quantità di latte prodotto; trasferimento nelle bottiglie per il trasporto.

Presso i laboratori del DMVSS, le sette bottiglie contenenti i campioni NCS venivano conservate a 4 °C fino al completamento dei test, che avveniva entro 12 ore dal prelievo.

Da ognuno dei sette campioni NCS, un sottocampione di circa 40 mL veniva trasferito in un contenitore di plastica e inviato al Laboratorio latte dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna (ARAS) di Oristano. Presso il Laboratorio ARAS i campioni erano analizzati entro lo stesso giorno della raccolta per la misurazione di proteine totali, grasso, lattosio (International Dairy Federation standard IDF 141C:2000), caseine, urea e pH tramite spettrofotometro I.R. (Milko-Scan FT 6000; Foss Electric, DK-3400 Hillerød, Denmark); punto crioscopico in gradi Hortvet (H°) secondo IDF 108:2002 e crioscopio a termistori (Astor 4000/SE Double; Astori Tecnica, Poncarale BS, Italia); conta delle cellule somatiche (CCS) tramite conta-cellule automatico (Fossomatic 5000, Foss Electric) secondo IDF 148-2:2006; e conta microbica totale mesofilica (CMT) tramite Bacto-Scan FC 150, Foss Electric (IDF 358:2000).

Successivamente, in laboratorio, veniva effettuata una seconda selezione casuale. Tre campioni, denominati X, Y e Z, erano distinti tra i sette trasportati presso il DMVSS ed effettivamente utilizzati come NCS per le prove, in seguito venivano inquinati con differenti concentrazioni di antibiotico per ottenere i campioni PCS. La Tabella 8 riassume i codici identificativi delle sette pecore, il peso del latte prodotto e i campioni NCS; i risultati delle analisi del latte delle tre prove sono riportati nelle Figure 5 (prova del 30 Maggio), 6 (13 Giugno) e 7 (27 Giugno 2012). Le caratteristiche del latte erano in generale corrispondenti ai dati pubblicati per lo standard ufficiale della Pecora Sarda (Asso.Na.Pa, 2012).

Tabella 8. Campioni e produzioni delle sette pecore sottoposte a campionamento nelle tre prove.

Prova	campione	peso latte (kg)	id. pecora	NCS
30 Maggio	1	0,425	775	
	2	0,415	796	
	3	0,450	759	
	4	0,495	770	
	5	0,540	798	X
	6	0,550	801	Y
	7	0,520	802	Z
13 Giugno	1	0,480	802	Z
	2	0,495	796	
	3	0,430	759	
	4	0,535	801	Y
	5	0,620	798	X
	6	0,485	770	
27 Giugno	1	0,450	796	
	2	0,645	798	X
	3	0,500	759	
	4	0,490	770	
	5	0,620	801	Y
	6	0,500	775	
	7	0,580	802	Z

Per la prova del 13 Giugno, sono stati prelevati soli sei campioni poiché una pecora (id. 775) non è stata erroneamente campionata.

A.R.A. della Sardegna		Stampa Parametrica Analisi										
88	ANALISI PER 9287	99	ANALISI EXTRA PAGAM. DIFFERENZIATO	0	LATTE OVINO						PRELIEVO : 30/05/2012	
CLIENTE : 92 87000 IST. ENDOCRINOLOGIA SS		GRUPPO CAMPIONI : 1		Rapporto di Prova N.								
PGR.	GRASSO	PROTEINE	LATTOSIO	CELL/1000	C.BAT/1000	UPC/ml	pH	CASEINE	UREA	FT	CRIOSCOPI	FT
	g/100 ml	g/100 ml	g/100 ml	cell/ml	UPC/ml	UPC/ml		g/100 ml	mg/dl		°H	
1	5,67	5,52	5,20	33	5	5	6,71	4,34	21,70		0,564	
2	7,01	5,22	4,66	107	2	2	6,76	3,99	17,40		0,560	
3	6,77	5,53	4,90	83	13	13	6,70	4,34	26,10		0,572	
4	6,45	6,01	5,20	48	6	6	6,77	4,82	26,30		0,579	
5	5,76	5,55	4,85	117	3	3	6,68	4,29	27,10		0,574	
6	5,67	5,33	5,04	70	4	4	6,72	4,17	28,90		0,570	
7	5,53	5,44	4,82	66	2	2	6,76	4,21	42,80		0,569	

Figura 5. Caratteristiche del latte nella prova del 30 Maggio.

A.R.A. della Sardegna		Stampa Parametrica Analisi									
88	ANALISI PER 9287	99	ANALISI EXTRA PAGAM. DIFFERENZIATO	0	LATTE OVINO						PRELIEVO : 13/06/2012
CLIENTE	: 92 87000	IST. ENDOCRINOLOGIA SS	GRUPPO CAMPIONI : 1						Rapporto di Prova N.		
PGR.	GRASSO	PROTEINE	LATTOSIO	CELL/1000	C.BAT/1000	PH	CASEINE	UREA FT	CRIOSCOP FT		
	g/100 ml	g/100 ml	g/100 ml	cell/ml	ml		g/100 ml	mg/dl	°H		
1	7,05	5,21	4,91	115	25	6,68	4,17	27,80	0,565		
2	5,58	5,30	4,70	52	3	6,61	4,06	32,20	0,568		
3	7,38	5,25	4,82	7790	55	6,87	4,16	19,70	0,560		
4	6,02	5,22	4,85	108	7	6,68	4,08	28,90	0,567		
5	6,17	5,22	5,02	404	3	6,68	4,10	33,80	0,570		
6	6,87	5,09	4,97	109	9	6,63	4,05	29,50	0,566		

Figura 6. Caratteristiche del latte nella prova del 13 Giugno.

A.R.A. della Sardegna		Stampa Parametrica Analisi									
88	ANALISI PER 9287	99	ANALISI EXTRA PAGAM. DIFFERENZIATO	0	LATTE OVINO						PRELIEVO : 27/06/2012
CLIENTE : 92 87000 IST. ENDOCRINOLOGIA SS		GRUPPO CAMPIONI : 1			Rapporto di Prova N.					UREA FT CRIOSCOP FT	
PGR.	GRASSO	PROTEINE	LATTOSIO	CELL/1000	C.BAT/1000	PH	CASEINE	UREA FT CRIOSCOP FT	mg/dl	°H	
	g/100 ml	g/100 ml	g/100 ml	cell/ml	UFC/ml		g/100 ml				
1	7,94	5,34	4,81	964	13	6,83	4,24	9,90	0,583		
2	8,03	5,98	5,04	1120	25	6,63	4,77	9,90	0,604		
3	8,14	6,28	4,70	265	35	6,66	4,91	9,90	0,596		
4	7,45	5,31	4,64	90	9	6,68	4,17	9,90	0,582		
5	7,76	6,25	4,48	653	58	6,62	4,84	9,90	0,598		
6	7,47	6,11	4,61	136	51	6,64	4,78	9,90	0,605		
7	7,45	5,91	4,82	123	24	6,71	4,69	9,90	0,590		
8	7,79	6,07	4,50	901	54	6,76	4,83	12,00	0,583		
9	7,80	6,08	4,50	895	84	6,76	4,83	12,40	0,584		

Figura 7. Caratteristiche del latte nella prova del 27 Giugno. I campioni 8 e 9 sono relativi al latte di massa.

Anche in questa fase della prova come avveniva in precedenza, l'ulteriore riduzione dei campioni sottoposti ad analisi, dai sette prelevati ai tre utilizzati come NCS, era programmata per rispondere a due necessità: i) rimpiazzare probabili campioni che avessero mostrato positività al test di ricerca di residui antibiotici; ii) aumentare il livello di casualità (*randomization*) nella selezione degli animali sottoposti al prelievo dei campioni di latte NCS.

Antibiotici e concentrazioni.

Gli antibiotici analizzati durante le prove ed utilizzati per la preparazione dei campioni PCS sono Penicillina G, Amoxicillina, Cefazolina e Ossitetraciclina cloridrato. Le quattro differenti molecole erano scelte tra quelle appartenenti alle classi dei betalattamici e delle tetracicline e, inoltre, tra quelle più comunemente utilizzate per le terapie antimicrobiche nella pratica clinica dell'allevamento dell'ovino da latte in Sardegna (Ibba, 2005).

Le concentrazioni adottate per la contaminazione dei campioni NCS in laboratorio e l'ottenimento dei campioni PCS erano determinate in base ai Maximum Residue Limit (MRL) propri per ciascuna sostanza farmacologicamente attiva, fissati da due documenti ufficiali: i) il Regolamento EU 37/2010 (EU, 2010); ii) la procedura di validazione dei metodi di screening di residui di medicinali veterinari contenuta nelle Linee guida del Laboratorio di Referenza Comunitario (*Community Reference Laboratories*, CRLs 2010) al paragrafo 5.1.1. pag. 7, Numero dei campioni necessari per la validazione.

In particolare, le Linee guida CRLs stabiliscono che per ogni metodo di indagine la determinazione della specificità e la concentrazione minima di ricerca debbano essere determinate sulla base del MRL e che:

“la capacità di rilevazione ($CC\beta$) è il più piccolo contenuto della sostanza che può

essere rilevata, identificata e/o quantificata in un campione con una probabilità di errore pari a β . Per i test di screening l'errore β (e cioè la percentuale di falsi negativi) deve essere inferiore al 5%. Nel caso di sostanze con una MRL stabilita dal Regolamento, $CC\beta$ è la concentrazione alla quale il metodo è in grado di rilevare una concentrazione limite con una certezza statistica pari a $1 - \beta$. $CC\beta$ è la concentrazione alla quale si registrano solo una percentuale di falsi negativi $\leq 5\%$. In questo caso, $CC\beta$ deve essere inferiore o uguale al MRL.”

Inoltre:

“più bassa è la concentrazione di rilevazione target in rapporto al MRL, minori repliche sono necessarie per fornire lo stesso grado di confidenza che il metodo identifichi correttamente campioni effettivamente contaminati a concentrazioni pari al MRL.”

e

“se la concentrazione di rilevazione target è stabilita essere pari o inferiore la metà del MRL ($\frac{1}{2}MRL$), la registrazione di nessuno o un solo risultato falso-negativo all'interno dell'analisi di almeno 20 campioni di controllo positivi (i PCS della nostra prova) sarà sufficiente per dimostrare che $CC\beta$ è inferiore al MRL e inferiore o uguale al $\frac{1}{2}MRL$; se la concentrazione di rilevazione target è stabilita essere tra il 50% e il 90% del MRL, almeno 40 campioni di controllo positivi (con non più di 2 risultati falso-negativi) sarà sufficiente per dimostrare che $CC\beta$ è inferiore al MRL; se la sensibilità del test è tale che si avvicina al MRL (concentrazione di rilevazione target stabilita 10% sotto il MRL), è richiesto un numero maggiore di campioni di controllo positivi. Un massimo di 60 repliche (con non più di 3 risultati falso-negativi) è necessario per dimostrare il $CC\beta$ proprio della prova. Le prove possono essere condotte in fasi successive; ad esempio esaminare le prime venti repliche di campioni di controllo positivi, e se più di un campione è sotto il livello limite (più di

un falso-negativo) la validazione può essere interrotta a questo punto, e la concentrazione di rilevazione target può passare al livello successivo e alle relative repliche”.

In sintesi, secondo le sopracitate Linee guida dei CRLs, ognuno dei tre campioni NCS, per definire il limite di rilevazione del test di ogni specifica molecola, veniva contaminato presso i nostri laboratori con tre differenti concentrazioni, che corrispondevano a $0,5 \times \text{MRL}$, $0,5 < 0,9 \times \text{MRL}$ e $0,9 < 1 \times \text{MRL}$. Poiché il numero di repliche dipende dalla concentrazione MRL alla quale il test mostra un numero di falsi-negativi inferiore al 5% (1 su 20 repliche per la contaminazione del campione pari a $0,5 \times \text{MRL}$, 2 su 40 repliche per $0,5 < 0,9 \times \text{MRL}$, 3 su 60 repliche per $0,9 < 1 \times \text{MRL}$), il numero totale dei test era variabile per ognuna delle quattro differenti molecole e per ciascuna delle tre prove.

La Tabella 9 riassume gli MRL e le concentrazioni di contaminazione del protocollo.

Tabella 9. Antibiotici, MRL (Reg. EU 37/2010) e concentrazioni di contaminazione del protocollo.

Antibiotici	MRL ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	concentrazioni contaminanti ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Penicillina G	4	2, 3, 4
Amoxicillina	4	2, 3, 4
Cefazolina	50	25, 40, 50
Ossitetraciclina	100	50, 75, 100

Procedure di contaminazione.

I prodotti usati per ottenere le soluzioni madre (*antibiotics stock solutions*) ed i relativi campioni PCS sono riportati in Tabella 10.

Tabella 10. Antibiotici, prodotti e aziende produttrici.

Antibiotico	prodotto	produttore	codice
Penicillina G	Penicillin G sodium salt	Sigma-Aldrich, UK	P3032
Amoxicillina	Amoxicillin	Sigma-Aldrich, UK	A8523
Cefazolina	Cefazolin sodium salt	Apollo Scientific, UK	BIC0101
Ossitetraciclina	Oxytetracycline hydrochloride	Sigma-Aldrich, UK	O5875

Per ognuno dei quattro antibiotici veniva preparata una soluzione stock di circa 5 mL con concentrazione di 2 mg/mL, secondo le istruzioni del produttore (Figura 8).

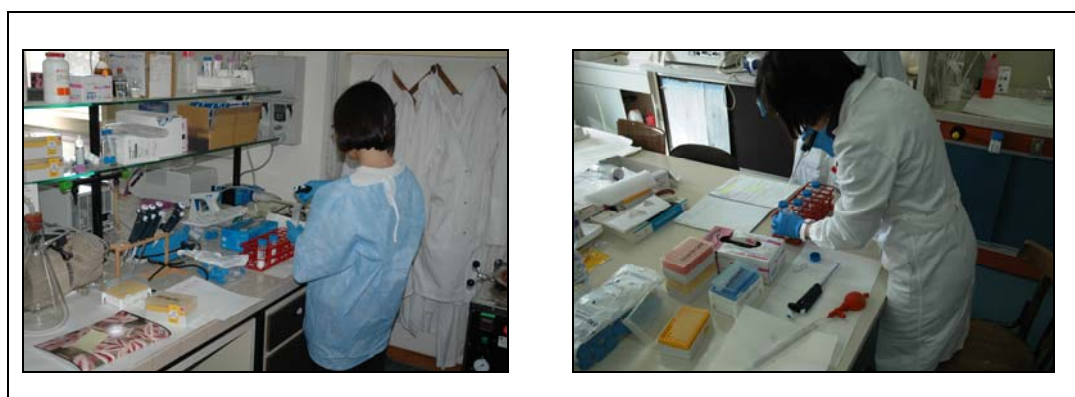


Figura 8. Da sinistra a destra: preparazione della soluzione stock e Soluzione A; preparazione delle soluzioni B e C.

All'interno di una provetta conica di plastica da 15 mL (BD Falcon, USA), veniva pesata, attraverso l'uso di una bilancia analitica, una quantità approssimativa di 10 mg di principio attivo. Il corrispondente volume del solvente, che portava ad ottenere una soluzione da 2 mg/mL, veniva determinato sulla base del peso del principio attivo e della percentuale in peso del prodotto; quest'ultimo era specificato

nel certificato di analisi proprio del lotto di ogni singolo antibiotico. Le soluzioni stock venivano preparate all'inizio delle operazioni e mantenute a 4 °C per un massimo di 24 ore ed eliminate alla fine delle analisi, nelle giornate delle tre prove.

Per l'ottenimento dei PCS, venivano utilizzati i seguenti protocolli con le relative diluizioni seriali (Figura 8).

Penicillina G e Amoxicillina.

Fase 1.

Una soluzione con concentrazione pari a 1000 ppb ("Soluzione A") veniva preparata seguendo la seguente formula:

$$2 \text{ mg/mL soluzione stock} = 2\,000\,000 \text{ ppb}$$

$$(2\,000\,000 \text{ ppb} \times 0,01 \text{ mL}) \div 20 \text{ mL} = \text{soluzione lattea } 1000 \text{ ppb}$$

Attraverso l'utilizzo di una pipetta graduata da sierologia (VWR, USA), 20 mL di latte crudo venivano posti in una provetta conica di plastica da 50 mL (BD Falcon, USA); si eliminava un volume di latte crudo pari a 0,01 mL e si aggiungevano 0,01 mL della soluzione stock da 2 mg/mL; la soluzione ottenuta, chiamata Soluzione A, veniva agitata manualmente per inversione per 10 volte.

Fase 2.

Una soluzione di 20 mL con concentrazione pari a 100 ppb ("Soluzione B") veniva preparata seguendo la seguente formula:

$$(1000 \text{ ppb} \times 2 \text{ mL}) \div 20 \text{ mL} = \text{soluzione lattea } 100 \text{ ppb}$$

Attraverso l'utilizzo di una pipetta graduata da sierologia (VWR, USA), 20 mL di latte crudo venivano posti in una provetta conica di plastica da 50 mL (BD Falcon, USA); si eliminava un volume di latte crudo pari a 2 mL e si aggiungevano 2 mL della Soluzione A; la soluzione ottenuta, chiamata Soluzione B, veniva agitata manualmente per inversione per 10 volte.

Fase 3.

La soluzione alla concentrazione contaminante finale (“Soluzione C”) veniva preparata seguendo la seguente formula e la Tabella 11:

$$(20 \text{ mL} \times \text{_____ ppb latte contaminato}) \div 100 \text{ ppb} = \text{_____ latte mL}$$

100 ppb (Soluzione B)

Tabella 11. Concentrazioni finali per Penicillina G o Amoxicillina e relativo volume da aggiungere della Soluzione B (20 ppb di latte).

Concentrazione	finale	volume della Soluzione B da aggiungere
2		0,4 mL
3		0,6 mL
4		0,8 mL
5		1,0 mL

Attraverso l'utilizzo di una pipetta graduata da sierologia (VWR, USA), 20 mL di latte crudo venivano posti in una provetta conica di plastica da 50 mL (BD Falcon, USA); si eliminava un volume di latte crudo pari a quello indicato in Tabella 11 e si aggiungeva un medesimo volume di Soluzione B; la soluzione ottenuta, chiamata Soluzione C, veniva agitata manualmente per inversione per 10 volte.

Cefazolina e Ossitetraciclina.

Fase 1.

Una soluzione con concentrazione pari a 1000 ppb (“Soluzione A”) veniva preparata seguendo la seguente formula:

$$2 \text{ mg/mL soluzione stock} = 2\,000\,000 \text{ ppb}$$

$$(2\,000\,000 \text{ ppb} \times 0,01 \text{ mL}) \div 20 \text{ mL} = \text{soluzione lattea } 1000 \text{ ppb}$$

Attraverso l'utilizzo di una pipetta graduata da sierologia (VWR, USA), 20 mL di latte crudo venivano posti in una provetta conica di plastica da 50 mL (BD Falcon, USA); si eliminava un volume di latte crudo pari a 0,01 mL e si

aggiungevano 0,01 mL della soluzione stock da 2 mg/mL; la soluzione ottenuta, chiamata Soluzione A, veniva agitata manualmente per inversione per 10 volte.

Fase 2.

La soluzione alla concentrazione contaminante finale (“Soluzione B”) veniva preparata seguendo la seguente formula e la Tabella 12:

$$(20 \text{ mL} \times \text{_____ ppb latte contaminato}) \div 1000 \text{ ppb} = \text{_____ latte mL}$$

1000 ppb (Soluzione A)

Tabella 12. Concentrazioni finali per Cefazolina o Ossitetraciclina e relativo volume della Soluzione A da aggiungere.

Concentrazione finale	volume della Soluzione A da aggiungere
25	0,5 mL
40	0,8 mL
50	1,0 mL
60	1,2 mL
70	1,4 mL
80	1,5 mL
90	1,6 mL
100	1,8 mL
125	2,0 mL

Attraverso l'utilizzo di una pipetta graduata da sierologia (VWR, USA), 20 mL di latte crudo venivano trasferiti in una provetta conica di plastica da 50 mL (BD Falcon, USA); si eliminava un volume di latte crudo pari a quello indicato in Tabella 12 e si aggiungeva un medesimo volume di Soluzione A; la soluzione ottenuta, chiamata Soluzione B, veniva agitata manualmente per inversione per 10 volte.

Procedure d'utilizzo, lettura e interpretazione del test.

Per ognuna delle tre prove, i test venivano sempre completati seguendo lo stesso ordine e le stesse metodologie, ed utilizzando il medesimo lotto di produzione del kit a disposizione.

All'inizio di ogni prova, prima dell'allestimento delle soluzioni stock e di quelle contaminanti A, B e C, ognuno dei tre campioni NCS denominati X, Y e Z veniva sottoposto a 20 test per saggiare la reale conformità dei cosiddetti campioni *antibiotics free* o *blank sample*. Successivamente i campioni NCS erano contaminati per ottenere i campioni PCS (*Positive Control Samples*) con il seguente ordine cronologico: Penicillina G, Amoxicillina, Cefazolina e Ossitetraciclina.

I campioni PCS alle differenti concentrazioni relative ai quattro antibiotici (Tabella 9), venivano analizzati dalla concentrazione più bassa (20 repliche per la concentrazione pari a $0,5 \times \text{MRL}$); se si registrava più di un test falso-negativo su 20, anche se il totale di 20 test non fosse stato ancora analizzato, si procedeva all'analisi della successiva concentrazione contaminante (40 repliche per $0,5 < 0,9 \times \text{MRL}$); se si registravano più di due test falso-negativi su 40, anche se il totale di 40 test non fosse stato ancora analizzato, si procedeva all'analisi della successiva concentrazione contaminante (60 repliche per $0,9 < 1 \times \text{MRL}$).

Qualora si registrassero più di tre test falso-negativi su 60, anche se il totale di 60 test non fosse stato ancora analizzato, si procedeva all'analisi della sensibilità del metodo con la ricerca della più bassa concentrazione $> 1 \times \text{MRL}$ con non più di un falso-negativo su 20 repliche.

Sia per i test effettuati sui campioni *blank* (NCS) che per quelli sui campioni contaminati (PCS), si procedeva all'analisi dei campioni sempre con la stessa successione temporale: X, Y e Z.

Per evitare contaminazioni crociate e conseguenti test falsi-positivi, tavoli da lavoro e strumenti venivano detersi dopo ogni fase di contaminazione di ogni singolo antibiotico; il personale, inoltre, utilizzava sempre una nuova fornitura di guanti in plastica prima di ogni nuova operazione relativa alla preparazione delle concentrazioni contaminanti, ed un nuovo camice usa e getta dopo l'uso di ogni

singola molecola.

Ogni confezione del prodotto Betastar® Combo 3.0 comprende 25 boccette individuali contenenti i reagenti, una siringa pipettatrice con 25 puntali monouso e il contenitore con 25 cartine (*dipsticks*).

Le procedure di esecuzione dei test (Figura 9) avvenivano seguendo il seguente protocollo (Neogen, 2011) sia per i campioni NCS che PCS.



Figura 9. Dall'alto e da sinistra: boccetta contenente i reagenti e contenitore con cartine (*dipsticks*); incubazione a temperatura controllata; sistema di lettura Accuscan III; lettura con Accuscan III.

Un volume di latte di 200 μL , veniva miscelato ai reagenti contenuti nella boccetta, mediante inversione per 5 volte. La boccetta veniva sottoposta ad

incubazione tramite Rapid Test Incubator (Chr. Hansen, Denmark) alla temperatura di $47,5 \pm 1$ °C per 1 minuto. Immediatamente dopo questo periodo le cartine venivano immerse nella soluzione liquida contenuta nella boccetta (latte più reagente), che veniva sottoposta ad un nuovo periodo di incubazione a $47,5 \pm 1$ °C per 2 minuti (Figura 10).



Figura 10. Preparazione, incubazione e lettura dei test.

Al termine di questo periodo la cartina veniva rimossa dalla boccetta e immediatamente sottoposta a lettura tramite AccuScan III reader (Neogen Corporation, USA). Questa strumentazione fornisce una lettura oggettiva del test, poiché è in grado di calcolare il rapporto (*ratio*) tra l'intensità della linea specifica per betalattamine e tetracicline e la linea di controllo; quando il rapporto è superiore a 1,0 il test è negativo, mentre se il rapporto è inferiore o uguale a 1,0 il test è positivo (Neogen, 2007).

Analisi dei dati.

I risultati erano registrati ed analizzati in funzione delle tre differenti prove, dei campioni NCS o PCS, delle diverse molecole antibiotiche e delle concentrazioni.

Il numero di test positivi/negativi era registrato per determinare la sensitività del test. Inoltre le *ratio* fornite dal AccuScan III reader erano analizzate per ottenere i valori minimi e massimi, la media e la deviazione standard e le possibili differenze statistiche in funzione dei diversi livelli.

Per quanto riguarda i campioni NCS, gli effetti delle prove e della singola pecora venivano valutati con un'analisi della varianza a due vie basata sul modello:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + E_j + TE_{ij} + e_{i(jk)}$$

in cui Y_{ijk} è la variabile, μ è la media generale, T_i è l'effetto fisso della prova ($i = 3$; 30 Maggio, 13 Giugno e 27 Giugno), E_j è l'effetto random della singola pecora ($j = 3$; X, Y e Z), TE_{ij} è l'effetto dell'interazione ed infine $e_{i(jk)}$ è l'effetto dell'errore.

Relativamente ai campioni PCS, gli effetti della singola pecora e della prova non venivano inseriti nel modello statistico poiché non erano significativi per i campioni NCS; a causa dell'assenza di dati (*rank deficiency*) e delle celle vuote nelle tabelle di contingenza (ad esempio i test effettuati per i PCS contaminati con penicillina per la Pecora Z in tutte le prove avevano 20 positivi alla concentrazione di 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e le concentrazioni di 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o superiori non venivano analizzate) gli effetti della singola pecora e della prova non venivano inseriti nel modello. Per questi motivi, l'analisi delle *ratio* dei campioni PCS veniva effettuata tramite un'analisi GLM (general linear model) con C_i come effetto fisso della concentrazione ($i = 3$ o superiori; $0,5 \times \text{MRL}$, $0,5 < 0,9 \times \text{MRL}$, $0,9 < 1 \times \text{MRL}$ e $> 1 \times \text{MRL}$).

Successivamente, per indagare se nei campioni PCS contaminati con una sola molecola della classe delle betalattamine si potesse registrare un'influenza anche

sull'intensità della linea specifica per le tetracicline e viceversa, le *ratio* ottenute per ogni molecola sono state confrontate con quelle ottenute per i campioni NCS. Un'analisi statistica preliminare ha mostrato che le *ratio* della linea per le tetracicline non erano influenzate dalla concentrazione della Penicillina, le *ratio* della linea per le tetracicline non erano dipendenti dalla concentrazione di Amoxicillina e Cefazolina, e che le *ratio* della linea per le betalattamine non erano dipendenti dalla concentrazione di Ossitetraciclina (ad esempio, le *ratio* della linea delle betalattamine in seguito alla contaminazione con Ossitetraciclina a 100 µg/kg erano più elevate delle *ratio* in seguito a contaminazione con Ossitetraciclina a 50 µg/kg ma più basse di quelle in seguito a contaminazione con Ossitetraciclina a 125 µg/kg). Per tale ragione, l'indagine era effettuata con una procedura GLM a una via con C_i come effetto fisso del contaminante ($i = 4$ per le *ratio* della linea per le tetracicline: campioni *blank*, PCS Penicillina, PCS Amoxicillina e PCS Cefazolina; $i = 4$ per le *ratio* della linea per le betalattamine: campioni *blank* vs campioni PCS).

L'analisi statistica veniva condotta utilizzando il software Minitab statistical, Minitab release 13.32 (Minitab Inc. 2000, 127 State College, PA), l'effetto del modello dichiarato significativo per $P < 0,05$ e la comparazione multipla tra le medie era effettuata tramite il metodo di Bonferroni.

4. Risultati e discussione

Campioni negativi, Negative Control Samples (NCS).

Nelle tabelle 13 e 14 sono riassunti i risultati relativi ai test riguardanti i campioni negativi, Negative Control Samples (NCS), in funzione delle tre prove, delle tre pecore e delle due classi di antibiotici, betalattamine e tetracicline, che sono ricercati dal metodo Betastar® Combo 3.0. La Tabella 13 riporta il numero dei test risultati negativi, che quindi mostravano un rapporto (*ratio*) tra la linea di controllo e le linee per gli antibiotici superiore a 1,0, mentre la Tabella 14 riepiloga il risultato ottenuto dall'analisi statistica, i valori medi, minimi e massimi delle *ratio*.

Nel totale, i 180 test effettuati sui campioni NCS erano sempre negativi e, come evidenziato dall'analisi statistica, le *ratio* non venivano influenzate né dall'effetto della differente prova (stadio di lattazione) né da quello della singola pecora; l'effetto dell'interazione ha significativamente influenzato i valori delle *ratio* con la media più elevata (5,750) relativa alla linea delle betalattamine per la pecora Y durante la prova del 13 giugno, mentre per le tetracicline i valori riguardanti la pecora X, sempre durante la prova del 13 giugno (10,200).

Come esposto nel capitolo Materiali e Metodi, per prima cosa si procedeva all'analisi dei campioni negativi con lo scopo di confermarne la reale condizione di campioni *antibiotics free*; questa procedura consentiva di escludere che la successiva contaminazione dei NCS e i risultati relativi ai campioni PCS (*Positive Control Samples*), fossero influenzati dall'ignota contaminazione antibiotica dei campioni di latte, la quale poteva causare la comparsa di falsi positivi durante le prove.

Inoltre, un'analisi statistica supplementare veniva eseguita per osservare la differente reazione delle linee delle betalattamine e tetracicline verso i medesimi campioni NCS; il risultato ha confermato che le *ratio* per la linea delle tetracicline ($7,314 \pm 2,29$, media \pm deviazione standard) erano più elevate per $P < 0,01$ rispetto a quelle per le betalattamine ($4,303 \pm 0,90$).

Tabella 13. Numero dei test con risultato negativo per i *negative control samples* (NCS), in funzione di ogni classe di antibiotici (singola linea della striscia reagente), della prova e della pecora.

prova	30 maggio			13 giugno			27 giugno		
	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
Betalattamine	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
Tetracicline	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito negativo per valori delle ratio superiori a 1,0.

Tabella 14. Medie (\pm SD), valori minimi e massimi delle ratio per i *negative control samples* (NCS), in funzione di ogni classe di antibiotici (singola linea della striscia reagente), della prova e della pecora.

	(n)	prova			pecora			effetto e <i>P-value</i>		
		30 maggio	13 giugno	27 giugno	X	Y	Z	T	E	T×E
		(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
Betalattamine	media	4,041	4,744	4,125	3,940	4,758	4,211	0,210	0,175	0,000
	\pm SD	$\pm 0,249$	$\pm 0,249$	$\pm 0,249$	$\pm 0,249$	$\pm 0,249$	$\pm 0,249$			
	min	2,753	2,968	2,677	2,753	2,677	3,047			
	max	5,189	7,324	5,978	5,429	7,324	5,969			
linea	media	6,444	9,411	6,088	6,959	8,248	6,736	0,088	0,460	0,000
	\pm SD	$\pm 0,837$	$\pm 0,837$	$\pm 0,837$	$\pm 0,837$	$\pm 0,837$	$\pm 0,837$			
	min	3,696	5,101	2,983	3,696	5,542	2,983			
	max	11,518	13,804	10,475	13,804	11,518	11,996			

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito negativo per valori delle ratio superiori a 1,0. SD: deviazione standard; min-max: valori minimi e massimi; T: prova, E: pecora, T×E: effetto dell'interazione.

Campioni positivi,

Campioni positivi, PCS, per la Penicillina.

Le tabelle 15 e 16 riassumono i risultati relativi ai campioni PCS inquinati con Penicillina, in funzione delle tre prove, delle tre pecore e delle differenti concentrazioni inquinanti.

La Tabella 15 riporta il numero dei campioni positivi per la linea delle betalattamine per lo studio della sensibilità al test, mentre la Tabella 16 riporta il risultato dell'analisi statistica e i relativi valori medi, minimi e massimi delle *ratio*.

Durante le tre prove, il limite di rilevazione della Penicillina veniva fissato tra 2 e 3 µg/kg (ppb). La linea delle tetracicline ha sempre mostrato un risultato negativo con valore medio±deviazione standard pari a 8,060±2,728, e 1,273 e 14,785 come valori minimo e massimo (dati mostrati in Tabella 23).

Le *ratio* erano influenzate dalla concentrazione inquinante per $P<0.001$ e, come atteso, i valori erano inferiori per la concentrazione pari 3 µg/kg (media 0,055) rispetto alla concentrazione pari a 2 µg/kg (0,473).

Tabella 15. Numero dei test con risultato positivo sulla linea della classe dei betalattamici, per i *positive control samples* (PCS) della Penicillina in funzione della concentrazione inquinante, della prova e della pecora.

Penicillina	prova											
	30 maggio				13 giugno				27 giugno			
	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
2 µg/kg	20/20	7/9	20/20	9/11	20/20	20/20	11/20	20/20	20/20	11/20	15/20	20/20
3 µg/kg	-	40/40	-	40/40	-	-	40/40	-	-	40/40	40/40	-

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0. La linea della classe delle tetracicline è sempre stata negativa.

Tabella 16. Media (\pm SD), valori minimi e massimi delle ratio per i *positive control samples* (PCS) della Penicillina in funzione della concentrazione inquinante.

	concentrazione (μ g/kg)		effetto e <i>P-value</i>
	2 (160)	3 (160)	
Penicillina	media \pm SD	0,473 ^B \pm 0,025	0,055 ^A \pm 0,025
	min	0,001	0,003
	max	1,972	0,696

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0. SD: deviazione standard, min-max: valori minimi e massimi; C: concentrazioni; ^{AB} medie nella stessa riga con differenti lettere maiuscole differiscono significativamente ($P < 0,01$) nella comparazione tra le concentrazioni.

Campioni positivi, PCS, per la Amoxicillina.

Le tabelle 17 e 18 riassumono i risultati relativi ai campioni PCS inquinati con Amoxicillina, in funzione delle tre prove, delle tre pecore e delle differenti concentrazioni inquinanti.

La Tabella 17 riporta il numero dei campioni positivi per la linea delle betalattamine per lo studio della sensitività al test, mentre la tabella 18 riporta il risultato dell'analisi statistica e i relativi valori medi, minimi e massimi delle *ratio*.

Il limite di rilevazione della Amoxicillina era tra 2 e 4 µg/kg, ma in un caso, precisamente per la Pecora X della prova del 27 giugno, è stato necessario incrementare la concentrazione inquinante fino al valore di 5 µg/kg. Anche per questa molecola la linea delle tetracicline ha sempre mostrato un risultato negativo e le *ratio* avevano una media±deviazione standard di 8,310±2,555, e valori minimo e massimo di 2,015 e 16,271 rispettivamente (dati mostrati in tabella 23).

Le *ratio* erano influenzate dalla concentrazione inquinante per $P<0.001$ e, come atteso, i valori erano inferiori per la concentrazione pari a 3 µg/kg (media 0,055) rispetto alla concentrazione pari a 2 µg/kg (0,473).

Per quanto riguarda l'influenza dell'effetto della concentrazione inquinante, anche per la Amoxicillina come per la Penicillina, si evidenziava una significativa azione sulla distribuzione delle *ratio* per $P<0.001$ con il valore medio più basso (0,389), registrato per la concentrazione più elevata, 5 µg/kg.

Tabella 17. Numero dei test con risultato positivo sulla linea della classe dei betalattamici, per i *positive control samples* (PCS) della Amoxicillina in funzione della concentrazione inquinante, della prova e della pecora.

	prova						13 giugno						27 giugno					
	30 maggio			13 giugno			13 giugno			27 giugno			27 giugno			27 giugno		
	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
2 µg/kg	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	20/20	0/3	0/6	20/20	0/3	0/6	20/20			
3 µg/kg	38/40	40/40	40/40	15/18	0/4	40/40	15/18	0/4	-	0/6	38/40	-	0/6	38/40	-			
4 µg/kg	-	-	-	60/60	59/60	-	60/60	59/60	-	18/24	-	-	18/24	-	-			
5 µg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20/20	-	-	20/20	-	-			

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0.

La linea della classe delle tetracicline è sempre stata negativa.

Tabella 18. Media (\pm SD), valori minimi e massimi delle ratio per i *positive control samples* (PCS) della Amoxicillina in funzione della concentrazione inquinante.

	concentrazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					effetto e <i>P-value</i>
	2	3	4	5		
	(64)	(188)	(144)	(20)		C
	(n)					
Amoxicillina	media	0,698 ^B	0,666 ^B	0,569 ^{AB}	0,389 ^A	0,001
	\pm SD	\pm 0,046	\pm 0,027	\pm 0,031	\pm 0,083	
	min	0,006	0,102	0,036	0,254	
	max	2,325	1,902	1,404	0,561	

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0. SD: deviazione standard; min-max: valori minimi e massimi; C: concentrazione; ^{AB} medie nella stessa riga con differenti lettere maiuscole differiscono significativamente ($P < 0,01$) nella comparazione tra le concentrazioni.

Campioni positivi, PCS, per la Cefazolina.

I risultati relativi ai campioni PCS inquinati con Cefazolina, in funzione delle tre prove, delle tre pecore e delle differenti concentrazioni inquinanti sono riportati nelle tabelle 19 e 20.

La Tabella 19 è riassuntiva per lo studio della sensitività al test e riporta il numero dei campioni positivi per la linea delle betalattamine, mentre la Tabella 20 i valori medi, minimi e massimi delle *ratio* ottenuti dall'analisi statistica.

Il limite di rilevazione della Cefazolina era sempre più elevato dei valori di 50 µg/kg, che corrisponde al valore specifico di MRL fissato per la molecola. Infatti durante le prove era sempre necessario utilizzare una concentrazione inquinante superiore, che è risultata compresa tra 60 e 100 µg/kg.

La linea delle tetracicline, così come avvenuto per le altre due molecole della classe delle betalattamine, Penicillina e Amoxicillina, ha sempre mostrato un risultato negativo, con media e deviazione standard delle *ratio* pari a $8,074 \pm 2,598$, e valori minimo e massimo di 2,420 e 15,393, rispettivamente (dati mostrati in Tabella 23).

Le *ratio* erano influenzate dalla concentrazione inquinante per $P < 0.001$ e i valori più bassi si registravano per tutte le concentrazioni tra 60 e 100 µg/kg.

Tabella 19. Numero dei test con risultato positivo sulla linea della classe dei betalattamici, per i *positive control samples* (PCS) della Cefazolina in funzione della concentrazione inquinante, della prova e della pecora.

	prova			30 maggio			13 giugno			27 giugno			
	pecora	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
25 µg/kg		0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
40 µg/kg		0/3	0/3	0/3	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
50 µg/kg		1/6	0/6	0/5	1/6	0/6	2/6	0/6	2/6	2/6	0/6	2/6	2/6
60 µg/kg		20/20	20/20	4/8	0/3	0/3	0/3	1/3	20/20	20/20	1/3	20/20	0/6
70 µg/kg		-	-	20/20	20/20	0/3	18/20	1/3	-	-	1/3	-	20/20
80 µg/kg		-	-	-	-	0/3	-	20/20	-	-	20/20	-	-
90 µg/kg		-	-	-	-	17/20	-	-	17/20	-	-	-	-
100 µg/kg		-	-	-	-	20/20	-	-	20/20	-	-	-	-

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0. La linea della classe delle tetracicline è sempre stata negativa.

Tabella 20. Media (\pm SD), valori minimi e massimi delle ratio per i *positive control samples* (PCS) della Cefazolina in funzione della concentrazione inquinante.

	concentrazione (μ g/kg)								effetto e <i>P-value</i>
	25	40	50	60	70	80	90	100	
	(n)	(33)	(53)	(86)	(86)	(23)	(20)	(20)	C
Cefazolina	media	2,417 ^D	1,697 ^C	1,350 ^B	0,854 ^A	0,637 ^A	0,627 ^A	0,891 ^A	0,485 ^A
	\pm SD	\pm 0,069	\pm 0,059	\pm 0,046	\pm 0,036	\pm 0,036	\pm 0,070	\pm 0,075	\pm 0,075
	min	1,699	1,165	0,869	0,443	0,129	0,174	0,717	0,359
	max	3,974	2,963	2,366	2,158	1,869	1,171	1,100	0,884

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0. SD: deviazione standard; min-max: valori minimi e massimi; C: concentrazione; ^{ABCD} medie nella stessa riga con differenti lettere maiuscole differiscono significativamente ($P < 0,01$) nella comparazione tra le concentrazioni.

Campioni positivi, PCS, per la Ossitetraciclina.

Le tabelle 21 e 22 riassumono i risultati relativi ai campioni PCS inquinati con Ossitetraciclina, in funzione delle tre prove, delle tre pecore e delle differenti concentrazioni inquinanti.

Lo studio della sensitività al test e il numero dei campioni positivi per la linea delle tetraciclina è riportato in Tabella 21 e il risultato dell'analisi statistica e i relativi valori medi, minimi e massimi delle *ratio* in Tabella 22.

Il limite di rilevazione della Ossitetraciclina veniva stabilito in un intervallo tra 50 e 100 µg/kg, ma nel caso della Pecora X della prova del 13 giugno, è stato necessario incrementare la concentrazione inquinante fino al valore di 125 µg/kg.

La linea delle betalattamine ha sempre mostrato un risultato negativo, con media e deviazione standard delle *ratio* pari a $3,106 \pm 0,747$, e valori minimo e massimo di 1,599 e 6,566, rispettivamente (dati mostrati in Tabella 24).

Le *ratio* erano influenzate dalla concentrazione inquinante per $P < 0.001$ e i valori più bassi si registravano per tutte le concentrazioni di 75 e 100 µg/kg, con 0,670 e 0,624 rispettivamente.

Tabella 21. Numero dei test con risultato positivo sulla linea della classe delle tetracicline, per i *positive control samples* (PCS) della Ossitetraciclina in funzione della concentrazione inquinante, della prova e della pecora.

	prova			30 maggio			13 giugno			27 giugno		
	pecora	X	Y	Z	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
50 µg/kg	1/5	2/4	0/2	0/2	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3	1/3	20/20	20/20
75 µg/kg	40/40	38/40	1/5	1/5	7/10	8/16	8/16	7/10	5/8	40/40	-	-
100 µg/kg	-	-	59/60	59/60	60/60	9/18	9/18	60/60	59/60	-	-	-
125 µg/kg	-	-	-	-	-	19/20	19/20	-	-	-	-	-

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0.

La linea della classe delle betalattamine è sempre stata negativa.

Tabella 22. Media (\pm SD), valori minimi e massimi delle ratio per i *positive control samples* (PCS) della Ossitetraciclina in funzione della concentrazione inquinante.

	concentrazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			effetto e <i>P-value</i>		
	50 (62)	75 (159)	100 (198)		125 (20)	
Ossitetraciclina	media \pm SD	0,816 ^B \pm 0,042	0,670 ^A 0,026	0,624 ^A \pm 0,023	0,803 ^{AB} \pm 0,073	C 0,000
	min	0,151	0,174	0,101	0,416	
	max	2,937	1,674	1,340	1,106	

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0. SD: deviazione standard; min-max: valori minimi e massimi; C: concentrazione; ^{AB} medie nella stessa riga con differenti lettere maiuscole differiscono significativamente ($P < 0,01$) nella comparazione tra le concentrazioni.

Influenza delle betalattamine sulla linea delle tetracicline e delle tetracicline sulla linea delle betalattamine.

Nel capitolo “Materiali e Metodi” è stato indagato il possibile effetto che le molecole della classe delle betalattamine hanno avuto sulla linea delle tetracicline e, viceversa, l’effetto che la molecola Ossitetraciclina ha avuto sulla linea delle betalattamine. I risultati sono rispettivamente riassunti nelle tabelle 23 e 24.

I test utilizzati per investigare la sensibilità alla Penicillina, Amoxicillina e Cefazolina hanno mostrato che la linea delle tetracicline, sempre negativa, era comunque influenzata dalle procedure di inquinamento con le molecole della classe delle betalattamine; le *ratio* mostravano i valori più bassi per i campioni NCS.

Nonostante sia stato ottenuto questo risultato dall’analisi statistica, il test mostrava un limite di sicurezza alquanto elevato poiché il valore medio delle *ratio* della linea delle tetracicline durante l’inquinamento con le betalattamine si attestava mediamente su valori otto volte più elevati del limite fissato per la positività, pari a 1,0.

Anche la linea delle betalattamine era influenzata durante i test relativi all’indagine sul latte inquinato con Ossitetraciclina, ma in questo caso si registravano i valori inferiori per i PCS. In maniera analoga a quanto discusso per la linea delle tetracicline, il valore medio delle *ratio* garantiva una discreta sicurezza, con livelli tre volte superiori rispetto a quello di 1,0, fissato come limite di positività.

Tabella 23. Media (\pm SD), valori minimi e massimi delle tetracicline per i *negative control samples* (NCS) e i *positive control samples* (PCS) della Penicillina, Amoxicillina e Cefazolina.

	(n)	NCS (180)	PCS Penicillina (415)	PCS Amoxicillina (345)	PCS Cefazolina (320)	effetto e <i>P-value</i>
media		7,314 ^A	8,318 ^B	8,074 ^B	8,060 ^B	0,000
\pm SD		\pm 0,192	\pm 0,126	\pm 0,139	\pm 0,144	
min		2,983	1,273	2,015	2,420	
max		13,804	14,785	16,271	15,393	

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0. SD: deviazione standard; min-max: valori minimi e massimi; ^{AB} medie nella stessa riga con differenti lettere maiuscole differiscono significativamente ($P < 0,01$) nella comparazione tra campioni NCS e PCS dei differenti antibiotici.

Tabella 24. Media (\pm SD), valori minimi e massimi delle ratio sulla linea delle betalattamine per i *negative control samples* (NCS) e i *positive control samples* (PCS) della Ossitetraciclina.

	(n)	NCS (180)	PCS Ossitetraciclina (439)	effetto e <i>P-value</i>
linea delle Betalattamine	media \pm SD	4,303 ^B \pm 0,901	3,106 ^A \pm 0,747	0,000
	min max	2,677 7,324	1,599 6,566	

La lettura del Betastar Combo 3.0 test è stata effettuata con AccuScan III e il risultato definito positivo per valori delle ratio inferiori o uguali a 1,0. SD: deviazione standard; min-max: valori minimi e massimi; ^{AB} medie nella stessa riga con differenti lettere maiuscole differiscono significativamente ($P < 0,01$) nella comparazione tra campioni NCS e PCS.

Comparazione con altri test per la rilevazione di antibiotici riportati in letteratura.

La prima fase del protocollo per la validazione del test rapido Betastar® Combo 3.0 si è incentrata sul controllo negativi NCS: risultati hanno evidenziato la completa assenza di risultati falsi positivi, con un computo finale di nessun falso positivo su un totale di 180 test.

Tale problema è stato per contro evidenziato in altri tipi di test rapidi su latte vaccino (Kneebone et al., 2010), ma anche nel caso di test microbiologici basati sulla inibizione della crescita microbica.

In particolare, in alcuni *papers* relativi a studi su latte di pecora sono state riportate differenti percentuali di risultati dubbi o falsi positivi durante le procedure per l'esame di campioni *antibiotics free*. Ad esempio, nel lavoro di Montero et al. (2005) si registrava un totale di tre test dubbi su 505, pari allo 0,6%, mentre nel lavoro di Althaus et al. (2009) questa percentuale era pari all'1 %, con un test dubbio su 100; nel *paper* di Comunian et al. (2010) si registrava invece una percentuale di falsi positivi dello 0,18 %, che corrispondeva a sette test su 3816.

I test basati sulla inibizione della crescita microbica sono stati valutati a fondo anche sul latte di pecora, poiché i residui di antibiotici sono un potenziale rischio per la salute umana, ma anche un fattore limitante per la fabbricazione di prodotti lattiero-caseari (Molina et al., 2003). Infatti, in una indagine condotta nella regione spagnola della Castilla–La Mancha, i campioni di latte di massa provenienti dagli allevamenti ovini con positività di residui antibiotici sono stati osservati con una percentuale del 1,3% (Yamaki et al., 2004).

Questo dato suggerisce che la ricerca di residui di antibiotici nel latte ovino deve essere una pratica da promuovere, anche sulla base di ricerche farmacologiche le quali hanno evidenziato che alcune delle molecole più utilizzate della classe betalattamici, come la penicillina e l'amoxicillina, potrebbero essere ancora al di

sopra della MRL una settimana dopo il trattamento intramuscolare e intramammario (Pengov e Kirbis, 2009).

Per quanto riguarda l'individuazione della Penicillina G, Althaus et al. (2003) e Comunian et al. (2010), utilizzando due differenti versioni di Delvotest (SP NT e Accelerator, rispettivamente), hanno riportato valori molto bassi successivi alle procedure di rilevazione, pari a 1 µg/kg e compresi tra 2 e 4 µg/kg rispettivamente.

Tale risultato è emerso anche in prove condotte sul latte di capra da Sierra et al. (2009); questi autori hanno utilizzato quattro diversi test di screening basati sulla inibizione della crescita microbica, ottenendo un limite di rilevazione soddisfacente sia per Penicillina G (tra 2 e 3 µg/kg) che Amoxicillina (3 e 5 µg/kg). Al contrario, Montero et al. (2005), in uno studio condotto con l'utilizzo del metodo Eclipse® 100 su latte di pecora, hanno registrato una maggiore sensibilità rispetto alle MRL specifiche, sia per la Penicillina G che per l'Amoxicillina.

Nel lavoro di Nagel et al. (2012) sono stati analizzati due test basati sull'inibizione microbiologica di due differenti batteri, il *Geobacillus stearothermophilus subsp. calidolactis* e il *Bacillus subtilis*; i residui di Penicillina G sono stati rilevati con un limite di *cut-off* adeguato, mentre la sensibilità per l'Amoxicillina è stata superiore rispetto al relativo MRL per il metodo basato sull'inibizione della crescita di *Bacillus subtilis*. Inoltre, un recente metodo applicato su latte di pecora, basato sulla tecnica della cromatografia liquida a serie di diodi (*liquid chromatography-diode array detection*, HPLC-DAD), è stato proposto da Cámara et al. (2013); questo è stato in grado di determinare, simultaneamente e con concentrazioni *cut-off* adeguate, nove molecole appartenenti alla classe dei betalattamici.

Rispetto ad altri test, Betastar® Combo 3.0 è in grado di ricercare residui di tetracicline a soddisfacenti livelli di *cut-off* sulla base dei MRL fissati dalla normativa dell'Unione Europea (Regolamento della Commissione 37/2010/EU).

Infatti, alcuni dei test basati sulla inibizione della crescita microbica usati per la rilevazione di antibiotici della classe dei betalattamici sono utilizzati anche per il rilevamento delle tetracicline, ma i risultati sono spesso insoddisfacenti perchè la concentrazione minima rilevata è superiore al MRL specifico. Questa caratteristica è stata registrata sia in prove condotte sul latte vaccino (Le Breton et al., 2007) che su quello ovino (Althaus et al., 2003; Montero et al., 2005).

In particolare questi ultimi autori hanno evidenziato rispettivamente un limite di rilevazione di 590 e 480 µg/L per tetraciclina e 320 e 560 µg/L per ossitettraciclina.

Althaus et al. (2003) suggeriscono che un problema del genere potrebbe essere collegato al tipo di microrganismo usato nel test analizzato per la prova e in molti test ad inibizione della crescita microbiologica (*Geobacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*).

Analogamente ad Althaus et al. (2003) e Montero et al. (2005), Comunian et al. (2010), in un lavoro relativo alla valutazione su latte ovino eseguito con un metodo basato sulla inibizione della crescita microbiologica dello stesso *G. stearothermophilus* var. *Calidolactis*, hanno trovato un limite di rilevamento per tetraciclina cloridrato fissato a 400 µg/L; questi autori hanno ipotizzato che, anziché il tipo di batterio, la particolare composizione del latte di pecora, e soprattutto le differenze nella concentrazione di grasso e proteine rispetto al latte vaccino, potrebbero interferire con l'attività del test.

Tale ultima ipotesi potrebbe essere la più oggettiva anche sulla base dei risultati pubblicati da Nagel et al. (2012), i quali hanno evidenziato che i limiti di

rilevazione non sono legati al tipo di microrganismo, essendo tali limiti più elevati del MRL specifico per le tetracicline, sia per il metodo che utilizza il *G. stearothermophilus var. calidolactis* che per quello basato su *B. subtilis*.

Una metodologia alternativa per il rilevamento di antibiotici della classe delle tetracicline, basata sull'uso di un immunosensore amperometrico monouso, è stata recentemente proposta da Conzuelo et al. (2012). Questo nuovo dispositivo può rilevare molte molecole della classe delle tetracicline nel latte vaccino con un limite di rilevazione a concentrazioni nettamente inferiori al limite di 100 µg/kg. Una delle caratteristiche del test, relativamente negativa, è però la durata del tempo di analisi che è pari a 30 minuti e va sommata al periodo per la preparazione dei supporti magnetici. Questi intervalli, anche se più brevi rispetto a quelli dei test basati sulla tecnica ELISA o sulla inibizione della crescita microbica, sono comunque sempre più lunghi dei tempi richiesti per i test rapidi, sul campo, del tipo analizzato nella presente tesi.

5. Conclusioni

La presente tesi di Dottorato ha descritto lo studio di un protocollo sperimentale utile alla validazione di un test rapido per la rilevazione di residui antibiotici nel latte ovino.

Durante l'analisi i campioni di controllo negativo (NCS) sono stati sempre rilevati come negativi per tutte le classi di antibiotici, le prove e le pecore, e non sono stati influenzati né dall'effetto della prova, né da quello della pecora individuale.

Nel complesso, il limite di rilevazione era totalmente soddisfacente per la Penicillina (tra 2 e 3 µg/kg), mentre per Amoxicillina e Ossitetraciclina, una volta su nove, era leggermente superiore al MRL fissato dall'Unione Europea.

I campioni di latte addizionati con Cefazolina erano invece risultati positivi a concentrazioni superiori al MRL.

La linea delle tetraciline era influenzata dalla contaminazione con betalattamine e viceversa, ma in ogni caso l'atteso risultato negativo era da tre a otto volte superiore rispetto al livello di *cut-off* positivo pari a 1,0.

Globalmente i risultati relativi alle prove dimostrano che Betastar® Combo 3.0 è in grado di rilevare gli antibiotici valutati, per valori inferiori agli MRL fissati per ciascuna molecola, ad eccezione della Cefazolina. Tale principio attivo trova una limitata diffusione nella pratica terapeutica dell'allevamento dei piccoli ruminanti, dove viene utilizzato principalmente per il trattamento delle mastiti subcliniche causate da stafilococchi; mentre è molto positivo il dato ottenuto per l'Ossitetraciclina dal momento che è tra i farmaci più largamente impiegati nella pecora.

Ciò potrebbe presentarsi vantaggioso per il comparto ovino della nostra Isola,

il quale rappresenta un'entità di cui è difficile definire limiti e pertinenza, ma che certamente da sempre ha assunto una forte valenza culturale e ambientale, che va ben oltre le sue dimensioni economiche.

Negli ultimi decenni questo settore si è fatto carico di una trasformazione che gli ha conferito caratteristiche strutturali e organizzative che non temono il confronto con i principali competitori mondiali.

In quest'ottica, una metodica come quella da noi convalidata potrebbe trovare agevolmente un'applicazione pratica in tutti i segmenti della filiera del latte ovino. Di fatto, per tenere sotto controllo determinati pericoli è doveroso adottare un approccio di filiera che coinvolga i produttori ed i trasformatori regionali di latte ovino e caprino, insieme alle istituzioni di assistenza e ricerca.

L'allevatore è il primo responsabile per il controllo dei residui attraverso la corretta gestione dei trattamenti, il rispetto dei tempi di sospensione e le procedure di produzione. Già in questa fase iniziale, un test di verifica come Betastar® Combo 3.0 potrebbe essere utilizzato con successo sui singoli animali o sul latte massale (totale o di gruppi relativi ai capi trattati) direttamente in azienda. Ciò anche in ragione del fatto che, presso l'industria casearia, l'eventuale presenza di inibenti viene sicuramente rintracciata e tale evento immediatamente comunicato all'allevatore, per il quale comporta delle penalizzazioni sia in termini economici che di credibilità. Inoltre si aggiungono ispezioni periodiche senza preavviso previste dal sistema di pagamento qualità e quelle realizzate dai Servizi veterinari delle ASL (sia a seguito di sospetto o segnalazione di positività, sia nell'ambito di piani di controllo ufficiali).

Nell'iter di trasformazione il latte di massa aziendale viene in genere

controllato dall'industria attraverso verifiche quotidiane sui serbatoi di stoccaggio, perlopiù con metodi rapidi dedicati a specifici gruppi di molecole antibiotiche, tra i quali anche Betastar® Combo 3.0 che, grazie alla sua semplicità e velocità nell'utilizzo, risponde efficacemente alle esigenze della cooperativa o impresa di trasformazione.

Questo test potrebbe essere impiegato, con esito favorevole, sul latte contenuto nelle cisterne del mezzo che viene convogliato dagli allevamenti verso i caseifici. In tale passaggio del sistema produttivo rappresenterebbe uno strumento valido, principalmente in caso di sospetto, per circoscrivere la positività ad un numero ristretto di allevamenti.

In conclusione, anche sulla base del confronto con altri test disponibili sul mercato e validati sul latte ovino, Betastar® Combo 3.0 è quindi risultato potenzialmente adatto per lo screening rapido e per la rilevazione di alcune delle molecole più usate della classe delle betalattamine e/o tetracicline nel latte di pecora.

Bisogna tener presente che molto si è fatto riguardo questa problematica. Fin dalla sua costituzione, l'Unione Europea ha promosso, con l'obiettivo primario di tutelare la salute umana e garantire la produzione e commercializzazione di alimenti "sicuri", politiche attive nei confronti della sicurezza alimentare, attraverso interventi legislativi di diversa natura e mediante campagne di sensibilizzazione dell'opinione pubblica. Nei primi anni Duemila, con il cosiddetto "Pacchetto Igiene", furono definite ed introdotte sempre più diffuse pratiche di autocontrollo, le quali apportarono radicali cambiamenti inerenti, non solo le proprietà del prodotto finito, ma l'analisi dettagliata del processo produttivo in ogni suo stadio, individuando così i

rischi ed attuando misure preventive per tenerli sotto controllo.

Un'altra tappa significativa da mettere in risalto fu l'abbandono dell'idea irrealistica di “zero residui” a vantaggio del concetto, assai più coerente con gli obiettivi di sicurezza, di Limite Massimo Residuo.

Tale percorso non si è ancora completato, ma oggi chi opera nel settore alimentare ha maturato una consapevolezza dell'importanza dell'igiene e della sicurezza alimentare che in passato non esisteva e gli stessi consumatori sono sempre più attenti ed esigenti nella scelta degli alimenti, che devono essere sani e privi di contaminanti. È indispensabile, pertanto, che si diffonda l'idea condivisa di una filiera controllata che sappia tutelare il rapporto di fiducia tra chi produce e chi consuma e che sia, infine, in grado di operare nel rispetto dell'intangibilità delle risorse naturali.

6. Bibliografia

Gianpiera Piras, Validazione di un test rapido per la rilevazione di antibiotici nel latte ovino, Tesi di dottorato Riproduzione, produzione, benessere animale e sicurezza degli alimenti di origine animale, Università degli Studi di Sassari

- Adedeji A.O., Barr B., Gomez-Lucia E., Murphy B. 2013. A polytropic caprine arthritis encephalitis virus promoter isolated from multiple tissues from a sheep with multisystemic lentivirus-associated inflammatory disease. *Viruses* 5, 2005-2018.
- Albenzio M., Santillo A., Caroprese M., Ruggieri D., Ciliberti M., Sevi A. 2012. Immune competence of the mammary gland as affected by somatic cell and pathogenic bacteria in ewes with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 95, 3877-3887.
- Ali Dadkhah M. 2012. Study of subclinical mastitis in dairy ewes of the Sarab city, Iran. *Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences* 2, 384-387.
- Al-Majali A., Jawabreh S.M. 2003. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in Southern Jordan. *Small Ruminant Research* 47, 243-248.
- Almendros P., Alcaide B., Aragoncillo C. 2008. Cephalosporins. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. Instituto de Quimica Organica General, CSIC, Madrid, Spain. Elsevier.
- Althaus R.L., Torres A., Montero A., Balasch S., Molina M.P. 2003. Detection limits of antimicrobials in ewe milk by Delvotest photometric measurements. *Journal of Dairy Science* 86, 457-463.
- Althaus R., Berruga M.I., Montero A., Roca M., Molina M.P. 2009. Evaluation of a Microbiological Multi-Residue System on the detection of antibacterial substances in ewe milk. *Analytica Chimica Acta* 632, 156-162.
- Aminov R.I. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology* 1, 134.

- Amorena B., Baselga R., Albizu I. 1994. Use of liposome immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine* 12, 243-249.
- Andrew S.M. 2000. Effect of fat and protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residue screening tests. *Journal of Dairy Science* 83, 2992-2997.
- Andrew S.M., Moyes K.M., Borm A.A., Fox L.K., Leslie K.E., Hogan J.S. 2009. Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. *Veterinary Microbiology* 134,150-156.
- Andrews A.H. 2013. Some aspects of coccidiosis in sheep and goats. *Small Ruminant Research* 110, 93-95.
- Arlet G., Barrett T.J., Butaye P., Cloeckaert A., Mulvey M.R., White D.G. 2006. Salmonella resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes and Infection* 8, 1945-1954.
- Asso.Na.Pa. 2012. Associazione Nazionale della Pastorizia, Norme tecniche e consistenze. Online http://www.assonapa.it/norme_ecc/Indexnorme.asp, ultimo accesso 1 settembre 2013.
- Asso.Na.Pa. 2013. L'allevamento ovino. Asso.Na.Pa. Roma. Online <http://www.assonapa.it>. ultimo accesso 1 settembre 2013.
- Attaie R., Richter, R.L. 2000. Size distribution of fat globules in goat milk. *Journal Dairy Science* 83, 940–944.
- Bach A.C., Ingenbleek Y., Frey A. 1996. The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *Journal Lipids Research* 37, 708–726.

- Barkema H.W., Schukken Y.H., Zadoks R.N. 2006. The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 89, 1877-1895.
- Bassetti D. 2001. *Chemioterapici antifettivi e loro impiego razionale* sesta edizione. Intramed Communications, Milano.
- Batavani R.A., Mortaz E., Falahian K., Dawoodi M.A. 2003. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran. *Small Ruminant Research* 50, 45-50.
- Belloy L., Decrausaz L., Boujon P., Hachler H., Waldvogel A.S. 2009. Diagnosis by culture and PCR of *Salmonella Abortusovis* infection under clinical conditions in aborting sheep in Switzerland. *Veterinary Microbiology* 138, 373-377.
- Beltrán M.C., Althaus R.L., Berruga M.I., Molina A., Molina M.P. 2013a. Detection of antibiotics in sheep milk by receptor-binding assays. *International Dairy Journal* 34, 184-189.
- Beltrán M.C., Romero T., Althaus R.L., Molina M.P. 2013b. Evaluation of the Charm maximum residue limit β -lactam and tetracycline test for the detection of antibiotics in ewe and goat milk. *Journal of Dairy Science* 96, 2737-2745.
- Bennett G., Hickford J., Sedcole R., Zhou H. 2009. *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* and the epidemiology of footrot. *Anaerobe* 15, 173-176.
- Berendsen B.J.A., Pikkemaat M.G., Stolker L.A.M. 2011. Are antibiotic screening approaches sufficiently adequate? A proficiency test. *Analytica Chimica Acta* 685, 170-175.
- Bergonier D., Berthelot X. 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 79, 1-16.

- Bergonier D., Cremoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X. 2003. Mastitis in dairy small ruminants. *Veterinary Research* 34, 689-716.
- Bhavsar S.K., Thaker A.M. 2012. Antimicrobials in Food Producing Animals. Readings in Advanced Pharmacokinetics – Theory, Methods and Applications. Online <http://www.intechopen.com/> ultimo accesso 18 novembre 2013.
- Bilandžić N., Kolanović B.S., Varenina I., Jurković Z. 2011. Concentrations of veterinary drug residues in milk from individual farms in Croatia. *Mljekarstvo* 61, 260-267.
- Bittante, G. 2011. Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. *Journal of Dairy Science* 94, 5821-5832.
- Bocquier F., Caja G. 2001. Production et composition du lait de brebis: Effets de l'alimentation (production and composition of sheep milk : effects of nutrition). *INRA Production Animal* 14, 129–140.
- Calza P., Marchisio S., Medana C., Baiocchi C. 2010. Fate of antibacterial spiramycin in river waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 1539-1550.
- Cámara M., Gallego-Picó A., Garcinuño R.M., Fernández-Hernando P., Durand-Alegria J.S., Sánchez P.J. 2013. An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk. *Food Chemistry* 14, 829-834.
- Carli S., Ormas P., Re G., Soldani G. 2009. *Farmacologia Veterinaria*. Edizioni Idelson Gnocchi.
- Carta A., Casu Sara, Salaris S. 2009. Current state of genetic improvement in dairy sheep. *Journal Dairy Science* 92, 5814–5833.
- Casu S. 1971. Allevamento ovino da latte in Sardegna: situazione attuale e possibilità di evoluzione. *Options Mediterraneennes* 7, 100-107.

- Cau P. 2008. A proposito di orbace. *Corriere dei piccoli paesi* 1, 1.
- CFSPH 2009. Ovine and Caprine Brucellosis: *Brucella melitensis*. Online http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_melitensis.pdf ultimo accesso 21 ottobre 2009.
- Cháfer-Pericás C., Maquieira A., Puchades R. 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry* 29, 1038-1049.
- Charm S.E., Zomer E. 1995. The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drug residues. Pages 224–233 in Proc. Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. International Dairy Federation Special Issue 9505. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- Chessa B., Pereira F., Arnaud F., Amorim A., Goyache F., Mainland I., Kao R.R., Pemberton J.M., Beraldi D., Stear M.J., Alberti A., Pittau M., Iannuzzi L., Banabazi M.H., Kazwala R.R., Zhang Y., Arranz J.J., Ali B.A., Wang Z., Uzun M., Dione M.M., Olsaker I., Holm L.E., Saarma U., Ahmad S., Marzanov N., Eythorsdottir E., Holland M.J., Ajmone-Marsan P., Bruford M.W., Kantanen J., Spencer T.E., Palmarini M. 2009. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science* 324, 532-536.
- Cipolat-Gotet C., Cecchinato A., De Marchi M., Bittante G. 2013. Factors affecting variation of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process; *Journal Dairy Science* 96, 1-14.
- CODEX alimentarius 2009. Online <http://www.codexalimentarius.net> ultimo accesso 18 novembre 2013.

- Comunian R., Paba A., Dupré I., Daga E. S., Scintu M.F. 2010. Evaluation of a microbiological indicator test for antibiotic detection in ewe and goat milk. *Journal Dairy Science* 93, 5644-5650.
- Contreras A., Paape M.J., DiCarlo A.L., Miller R.H., Rainard P. 1997. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats. *Journal of Dairy Science* 80, 1113-1118.
- Contreras A., Sierra D., Sanchez A., Corrales J.C., Marcoc J.C., Paape M.J., Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68, 145-153.
- Conzuelo F., Gamella M., Campuzano S., Reviejo A. J., Pingarrón J. M. 2012. Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk. *Analytica Chimica Acta* 737, 29-36.
- Corradini C. 1995. *Chimica e tecnologia del latte. Tecniche nuove*, Milano.
- Cremonesi P., Castiglioni B., Malferrari G., Biunno I., Vimercati C., Moroni P., Morandi S., Luzzana M. 2006. Technical note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *Journal of Dairy Science* 89, 163-169.
- Cremonesi P., Pisoni G., Severgnini M., Consolandi C., Moroni P., Raschetti M., Castiglioni B. 2009. Pathogen detection in milk samples by ligation detection reaction-mediated universal array method. *Journal of Dairy Science* 92, 3027-3039.
- CRLs, 2010. Community Reference Laboratories Residues (CRLs). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer) 20/1/2010. Online http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf ultimo accesso 23 luglio 2012.

- Davies J., Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, 417-433.
- Demeler J., Schein E., von Samson-Himmelstjerna G. 2012. Advances in laboratory diagnosis of parasitic infections of sheep. *Veterinary Parasitology* 189, 52-64.
- Demoly P., Romano A. 2005. Update on beta-lactam allergy diagnosis. *Current Allergy and Asthma Reports* 5, 9-14.
- Demon D, Ludwig C, Breyne K., Guede D., Dorner J.C., Froyman R., Meyer E. 2012. The intramammary efficacy of first generation cephalosporins against *Staphylococcus aureus* mastitis in mice. *Veterinary Microbiology* 160, 141-150.
- De Santis E.P.L., Mencarelli A., Nieddu M.P., Farina S., Mazzette R., Sanna S., Viridis S. 2001. Efficacia della somministrazione per via endomammaria di cloxacillina benzatina per il trattamento delle infezioni intramammarie dell'ovino nel corso dell'asciutta. *Large Animals Review* 3, 39-47.
- Direttiva EC 28 2004. Direttiva 2004/28/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004 che modifica la direttiva 2001/82/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali veterinari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 136, 58-84.
- Direttiva EC 82 2001. Direttiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 novembre 2001 recante un codice comunitario relativo ai medicinali veterinari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* L 311, 1-66.
- EC, 2004. Council Regulation (EC) No 21/2004 of 17 December 2003 establishing a system for the identification and registration of ovine and caprine animals and amending Regulation (EC) No 1782/2003 and Directives 92/102/EEC and 64/432/EEC. *Official Journal of the European Union* L5, 8-17.
- Edwards J.F., Dubey J.P. 2013. *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an

- aborted lamb from a chronically infected ewe. *Veterinary Parasitology* 192, 129-136.
- EFSA 2008. Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal*, 765, 1e87.
- Ergin-Kaya S., Filazi A. 2010. Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 16, S31-S35.
- Ergun Y., Aslantaş O., Doğruer G., Kirecci E., Saribay M.K, Ateş C.T., Ulku A., Demir C. 2009. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. *Turk Journal Veterinary Animal Science* 33 , 477-483.
- Erskine R.J., Walker R.D., Bolin C.A., Bartlett P.C., White D.G. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal of Dairy Science* 85, 1111-1118.
- EU 2010. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin *Official Journal of the European Union* L15, 1-72.
- EUCAST 2011. Data from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) MIC distribution website. Online [http:// www.eucast.org/](http://www.eucast.org/) ultimo accesso 15 novembre 2013.
- FAOSTAT. 2011. The Statistics Division of the FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Online <http://www.faostat.fao.org>. FAO, Rome, Italy, ultimo accesso 10 settembre 2013.
- Farina R., Scatozza F. 1998. *Trattato di malattie infettive degli animali*, 2° edizione. UTET, Torino.

- Folch J.M., Coll A., Sanchez A. 1993. Cloning and sequencing of the cDNA encoding goat lactoglobuline. *Journal Animal Science* 7, 28-32.
- Fritz J.W., Zuo Y. 2007. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 105, 1297-1301.
- García-Mayor M.A., Gallego-Picó A., Garcinuño R.M., Fernández-Hernando P., Durand-Alegría J.S. 2012. Matrix solid-phase dispersion method for the determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. *Food Chemistry* 134, 553–558.
- Garin-Bastuji B., Blasco J.M., Marin C., Albert D. 2006. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats old and new tools. *Small Ruminant Research* 62, 63-70.
- Garippa G., Bufano G., Caroli A., Carta A., Cringoli G., De nardo F., Filippini G., Leori S.G., Moniello G., Ronchi B. 2008. Realtà e prospettive dell'allevamento dei piccoli ruminanti in Italia. *Large Animal Review* 14, 40-43.
- Givens M.D., Marley M.S.D. 2008. Infectious causes of embryonic and fetal mortality *Theriogenology* 70, 270-285.
- Gonzalo C., Carriedo J.A., García-Jimeno M.C., Pérez-Bilbao M., De La Fuente M.T. 2010. Factors influencing variation of bulk milk antibiotic residue occurrence, somatic cell count, and total bacterial count in dairy sheep flocks. *Journal of Dairy Science* 93, 1587-1595.
- Goto T., Ito Y., Yamada S., Matsumoto H., Oka H. 2005. High-throughput analysis of tetracycline and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition. *Journal of Chromatography A* 1100, 193-199.
- Grunwald L., Petz M. 2003. Food processing effects on residues: Penicillins in milk and yoghurt. *Analytica Chimica Acta* 483, 73-79.

- Guerreiro O., Velez Z., Alvarenga N., Matos C., Duarte M. 2013. Molecular screening of ovine mastitis in different breeds. *Journal of Dairy Science* 96, 752-760.
- Gupta V.K., Verma D.K., Singh S.V., Vihan V.S. 2007. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis. *Small Ruminant Research* 70, 260-266.
- Gurr M.I. 1995. Nutritional significance of lipids. *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 2 Lipids. Chapman and Hall, London, pp. 349–402.
- Gustavsson E., Degelaen J., Bjurling P., Sternesjö A. 2004. Determination of beta lactams in milk using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2791-2796.
- Haenlein G.F.W., Wendorff W.L. 2006. Sheep milk-production and utilization of sheep milk. In: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK, and Ames, Iowa, USA, pp. 137–194.
- Hosamani M., Scagliarini A., Bhanuprakash V., McInnes C.J., Singh R.K. 2009. Orf: an update on current research and future perspectives. *Anti-infective Therapy* 7, 879-893.
- Huang S.Y., Wua S.M., Xua M.J., Zhoua D.H., Danbab C., Gongb G., Zhu X.Q. 2013. First record of *Chlamydia abortus* seroprevalence in Tibetan sheep in Tibet, China. *Small Ruminant Research* 112, 243- 245.
- Hubschwerlen C. 2007. b-Lactam antibiotics. *Comprehensive Medicinal Chemistry* II 479-518.
- Ibba I. 2005. La ricerca delle sostanze inibenti nel latte ovino. 6° Meeting dei responsabili e tecnici di laboratorio del settore lattiero-caseario Montegrotto

- Terme 1-2 dicembre 2005. Online http://www.aia.it/lsl/download/3-12-09_aras_ibba_inibenti.pps ultimo accesso 18 novembre 2013.
- Idda L., Furesi R., Pulina P. 2010. Economia dell'allevamento ovino da latte. Ed. Franco Angeli, Milano.
- ISO/IDF, 2010. ISO/IDF 2002. Guidelines for the standardized description of immuno- or receptor assays for the detection of antimicrobial residues. IDF Standard N°188:2002. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISTAT 2009. Istituto nazionale Italiano di Statistica, Struttura e produzione delle aziende agricole, Online http://www3.istat.it/dati/dataset/20090120_01/ ultimo accesso 10 ottobre 2013.
- ISTAT 2010. Istituto nazionale Italiano di Statistica, Sistema informativo su agricoltura e zootecnia, Online <http://agri.istat.it/> ultimo accesso 10 ottobre 2013.
- IZS 2013. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Banca Dati Nazionale Anagrafe Zootecnica. Online <http://www.izs.it/IZS/Engine/RAServePG.php/P/256910010304/L/1> ultimo accesso 10 settembre 2013.
- IZSL&T 2013. Centro Studi Sicurezza Alimentare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana Online <http://195.45.99.79/csra/> ultimo accesso 25 novembre 2013.
- Jooyandeh H., Alberoumand A. 2010. Physico-chemical, nutritional, heat treatment effect and dairy products aspect of goat and sheep milk. World Applied Science Journal 11, 1316-1322.
- Kantiani L., Farrè M., Barcelò D. 2009. Analytical methodologies for the detection of b-lactam antibiotics in milk and feed samples. Trends in Analytical Chemistry 28, 729-744.

- Khanal R.C. 2004. Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): a review. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences* 17, 1315–1328.
- Kneebone J., Tsang P.C.W., Townson, D.H. 2010. Rapid antibiotic screening tests detect antibiotic residues in powdered milk products. *Journal of Dairy Science* 93, 3961-3964.
- Król J., Litwińczuk A., Zarajczyk A., Litwińczuk Z. 2008. Alfa-lactoalbumin and beta-lactoglobulin as bioactive compounds of milk protein fraction. *Medycyna Weterynaria* 64, 1375-1379.
- La Rocca C. 2007. I prodotti lattiero-caseari di origine ovina e caprina: esempio di valutazione rischio-beneficio. Istituto Superiore della Sanità. Online <http://www.iss.it/binary/inte/cont/05%20-%20Cinzia%20LA%20ROCCA.1214814476.pdf>, ultimo accesso 15 novembre 2013.
- Las Heras A., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J.F. 1999. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. *Small Ruminant Research* 32, 21-29.
- Le Breton M.H., Savoy-Perroud M.C., Diserens J.M. 2007. Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. *Analytica Chimica Acta* 586, 280-283.
- Ledda A. 1992. Il latte e la caseificazione. *Ovinicoltura UNAPOC*, Roma.
- Lee K.W., Lee H.J., Cho H.Y., Kim Y.J. 2005. Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 135–144.
- Madden J.A.J., Plumier S.F., Tang J., Garaiova I., Plumier N.T., Herbison M. 2005. Effect of probiotics on preventing disruption of the intestinal microflora

- following antibiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled pilot study. *International Immunopharmacology* 5, 1091-1097.
- Maddison J.E., Page S.W. Church D.B. 2008. *Small Animal Clinical Pharmacology* 2nd edition. Elsevier Saunders.
- Maka L., Mackiw E., Scieczynska H., Pawlowska K., Popowska M. 2014. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2012. *Food Control* 36, 199-204.
- Manfredi M.T., Zanzani S., Bruni G., Stradiotto K., Zanatta G., Villa M. 2010. Il controllo degli endoparassiti negli allevamenti caprini in Lombardia: tra strategie convenzionali ed alternative. *Animal Review* 16, 23-27.
- Marchand-Brynaert J., Brulè C. 2008. *Penicillins*. Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium. Elsevier.
- Mavrogianni V.S., Menzies P.I. 2011. Principles of Mastitis Treatment in Sheep and Goat. In *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice* vol 27. Elsevier Saunders.
- McLeod D. 2013. Clinically Important β -Lactam Antibiotics Medicinal Chemistry Presentation Southern Methodist University, online <http://faculty.smu.edu/jbuynak/beta-lactam%20AntibioticsMod1.ppt> ultimo accesso 18 novembre 2013.
- Mehaia M.A. 1995. The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwissenschaft* 50, 260–263.
- Merck 1995. *Il manuale Merck Veterinario*, settima edizione. Edagricole Bologna.
- Mesgari Abasi M., Rashidi M.R., Javadi A., Bannazadeh Amirkhiz M., Mirmahdavi S., Zabihi M. 2009. Levels of tetracycline residues in cattle meat, liver, and kidney from a slaughterhouse in Tabriz, Iran. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 33, 345-349.

- Miller J.E., Kaplan R.M., Pugh D.G. 2012. Sheep and goat medicine. Internal Parasites Chapter 6. Elsevier.
- Milne C.E., Gunn G.J., Entrican G., Longbottom D. 2009. Epidemiological modelling of chlamydial abortion in sheep flocks. *Veterinary Microbiology* 135, 128-133.
- Mitchell J.M., Griffiths M.W., McEwen S.A., McNab W.B., Yee A.J. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: Causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *Journal of Food Protection* 61, 742-756.
- Moeller N., Mueller-Seitz E., Scholz O., Hillen W., Bergwerff A.A., Petz. M. 2007. A new strategy for the analysis of tetracycline residues in food stuffs by a surface plasmon resonance biosensor. *European Food Research Technology* 224, 285-292.
- Molina M.P., Althaus R.L., Balasch S., Torres A., Peris C., Fernandez N. 2003. Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. *Journal of Dairy Science* 86, 1947-1952.
- Montero A., Althaus R.L., Molina A., Berruga I., Molina M.P. 2005. Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse100®) for ewe milk. *Small Ruminant Research* 57, 229-237.
- Morrison J.M., Wright C.M., John G.H. 2012. Identification, isolation and characterization of a novel azoreductase from *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* 18, 229-234.
- Mura M.C., Daga C., Paludo M., Luridiana S., Pazzola M., Bodano S., Dettori M. L., Vacca G. M., Carcangiu V. 2012. Analysis of polymorphism within POU1F1 gene in relation to milk production traits in dairy Sarda sheep breed. *Molecular Biology Reports* 39, 6975–6979.

- Nagel O., Molina P., Althaus R. 2011. Microbial System for Identification of Antibiotic Residues in Milk. *Journal of Food and Drug Analysis* 19, 369-375.
- Nagel O.G., Beltrán M.C., Molina M.P., Althaus R.L. 2012. Novel microbiological system for antibiotic detection in ovine milk. *Small Ruminant Research* 102, 26-31.
- Nebbia C. 2009. Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali. EdiSES, Napoli.
- Neilsen P., Gyrd-Hansen N. 1996. Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 19, 305-311.
- Neogen 2007. Reveal Accuscan™ III User's guide. Neogen Corporation. Release: version 3.5, release date: November 2007.
- Neogen 2011. Betastar® Combo 3.0 product information sheet, Product #BCX002, Neogen Corporation.
- NMC 2006. National Mastitis Council. Online <http://www.nmconline.org/> ultimo accesso 15 novembre 2013.
- Nouws J.F.M., Smulders A., Rappalini M. 1990. A comparative study on irritation and residue aspect of five oxytetracycline formulations administered to calves, pigs and sheep. *Veterinary Quarterly* 12, 129-138.
- Ogola H., Shitandi A., Nanua J. 2007. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *Journal of Veterinary Science* 8, 237-242.
- Park Y.W. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research* 14, 151-161.
- Park Y.W., Chukwu H.I. 1988. Macro-mineral concentrations in milk of two goat breeds at different stages of lactation. *Small Ruminant Research* 1, 157-165.

- Park Y.W., Juarez M., Ramos M., Haenlein G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 88-113.
- Parodi P.W. 2004. Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology* 59, 3-59.
- Pastor-Navarro N., Maquieira A., Puchades R. 2009. Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 907-920.
- Patel J.R., Heldensb J.G.M., Bakonyic T., Rusvaic M. 2012. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control. *Vaccine* 30, 1767-1781.
- Pau S. 2006. Ovinicoltura - la razza Sarda. Edito presso Istituto Tecnico Agrario Statale Bernardo Brau, Nuoro.
- Pazzola M., Dettori M.L., Piras G., Pira E., Manca F., Puggioni O., Noce A., Vacca G. M. 2013. Effect of Long-term Freezing on Renneting Properties of Sarda Sheep Milk. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78, 275-279.
- Pelaez F. 2006. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-Can history repeat? *Biochemical Pharmacology* 71, 981- 990.
- Pengov A., Kirbis A. 2009. Risks of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep. *Analytica Chimica Acta*, 637, 13-17.
- Perry B.D., Randolph T.F. 1999. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology* 84, 145-168.
- Piras C.C. 2012. Antibiotici in Zootecnica: abuso e farmacoresistenza. *Green* 28, 42-50. Online <http://www.incaweb.org/green/> ultimo accesso 18 novembre 2013.
- Pirisi A., Lauret A., Dubeuf J.P. 2007. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research* 68, 167-178.

- Ramos M., Juarez M. 2011. Sheep Milk Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition) Pages 494-502.
- Raynal-Ljutovac K., Gaborit P., Lauret A. 2005. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Ruminant Research* 60, 167-177.
- Raynal-Ljutovac K., Pirisi A., De Cremoux R., Gonzalo C. 2007. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytic, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research* 68,126-144.
- Raynal-Ljutovac K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I., Chilliard Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Ruminant Research* 79, 57–72.
- Regolamento 470 2009. Regolamento (CE) N. 470/2009. Del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009 che stabilisce procedure comunitarie per la determinazione di limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale, abroga il regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio e modifica la direttiva 2001/82/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 726/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 152, 11-22.
- Regolamento CE 1030, 2009. Regolamento (CE) N. 1030/2009 della Commissione del 29 ottobre 2009 recante approvazione di modifiche minori del disciplinare di una denominazione registrata nel registro delle denominazioni di origine protette e delle indicazioni geografiche protette [Pecorino Romano (DOP)]. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 283/43.
- Rinaldi, L. Veneziano V., Cringoli G. 2007. Dairy goat production and the importance of gastrointestinal strongyle parasitism. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101, 745-746.

- Roca M., Villegas L., Kortabitarte M.L., Althaus R. L., Molina M. P. 2010. Effect of heat treatments on stability of β -lactams in milk. *Journal Dairy Science* 94, 1155-1164.
- Rocha J., Chen S., Beja-Pereira A. 2011. Molecular evidence for fat-tailed sheep domestication. *Tropical Animal Health and Production* 43, 1237-1243.
- Roger P.A. 2008. The impact of disease and disease prevention on sheep welfare. *Small Ruminant Research* 76, 104-111.
- Rosar G. 2013. Dalla teoria alla pratica: efficacia dei metodi di screening per le aflatossine *Food&tech* 5, 17-21.
- Ruegg P.. 2013. antimicrobial residues and resistance: understanding and managing drug usage on dairy farms. Presented at Central Veterinary Conference, Kansas City, MO, August; Copyright© 2013, P.L Ruegg, all rights reserved. Online <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/Antimicrobial-residues-and-resistance.pdf> ultimo accesso 18 novembre 2013.
- Runti C. 1969. "Fondamenti di chimica farmaceutica". Edizioni Lint.
- Salter R.S., Douglas D., McRobbie L., Quintana J., Legg D., Schwartz J., et al. 2011. Validation of the Charm 3 SL3 β -Lactam test for the screening raw milk in compliance with the U.S. pasteurized milk ordinance. *Journal of AOAC International* 94, 348-357.
- Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17, 431-437.
- Scolozzi C., Martini M., Abramo F. 2003. A method for identification and characterization of ewe's milk fat globules. *Milchwissensch* 58, 490-493.

- Serieys F., Raguet Y., Goby L., Schmidt H., Friton G. 2005. Comparative efficacy of local and systemic antibiotic treatment in lactating cows with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 88, 93-99.
- Sierra D., Sanchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J.C., Morales C.T., de la Fe C., Guirao I., Gonzalo C. 2009. Detection limits of four antimicrobial residue screening tests for β -lactams in goat's milk. *Journal of Dairy Science* 92, 3585-3591.
- Signorini G., Biagi G., Luchetti E., Nannipieri S., Marzotto G., Roncaia A. 2009. Residues in foodstuffs. Residui negli alimenti di origine animale. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma* 29, 77-90.
- Suraud V., Jacques I., Olivier M., Guilloteau L.A. 2008. Acute infection by conjunctival route with *Brucella melitensis* induces IgG β cells and IFN-g producing cells in peripheral and mucosal lymph nodes in sheep. *Microbes and Infection* 10, 1370-1378.
- Taylor M.A. 2010. Parasitological examinations in sheep health management. *Small Ruminant Research* 92, 120–125.
- Tollersrud T., Norstebo P.E., Engvik J.P., Andersen S.R., Reitan L.J., Lund A. 2002. Antibody responses in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants. *Veterinary Research Communication* 26, 587-600.
- Tortora A., Lai O., Corrente M., De Palo P., Crescenzo G., Muscarella M., Belloli C., Ormas P. 2005. Mammary excretion of enrofloxacin in sheep with mastitis: pharmacokinetic and microbiological aspects. *Atti XIII congresso Femesprum Bari*.
- Trautmann A. 2011. Penicillin allergy: myth and facts. *Fuß & Sprunggelenk* 9, 136-146.

- Traviesa-Alvarez J.M., Costa-Fernández J.M., Pereiro R., Sanz-Medel A. 2007. Direct screening of tetracyclines in water and bovine milk using room temperature phosphorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 589, 51-58.
- Uzal F.A., Songer J.G. 2012. Diagnosis of *Clostridium Perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe* 10, 135-143.
- Valdazo-Gonzalez B., Alvarez-Martinez M., Sandvik T. 2007. Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *The Veterinary Journal* 174, 316-324.
- Vemulapalli R., Contreras A., Sanakkayala N., Sriranganathan N., Boyle S.M., Schurig G.G. 2004. Enhanced efficacy of recombinant *Brucella abortus* RB51 vaccines against *B. melitensis* infection in mice *Veterinary Microbiology* 102, 237-245.
- Viejo Díaz M. 2004. Mecanismo molecular de la acción antifúngica de lactoferrina y caracterización de la secuencia aminoacídica implicada. Repositorio de la Universidad de Oviedo, Memoria Universitaria de Investigación, Tesis, online http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/16910?mode=full&submit_simple=Mostrar+el+registro+complete ultimo accesso 15 novembre 2013.
- Waksman S., Woodruff H. B. 1941. *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* 42, 231-249.
- Ware J.W. 2005. Footrot Control and Eradication. 2nd Edition. Mackinnon Project School of Veterinary Science University of Melbourne Werribee.
- Wilke M.S., Lovering A.L., Strynadka N.C.J. 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 8, 525-533.

- Yamaki M., Berruga M.I., Althaus R.L., Molina M.P., Molina A. 2004. Occurrence of antibiotic residues in milk from Manchega ewe dairy farms. *Journal of Dairy Science* 87, 3132-3137.
- Zadoks R.N., Fitzpatrick J.L. 2009. Changing trends in mastitis. *Irish Veterinary Journal* 62, 59-70.
- Zhao H., Yu S., Liu H., Si W., Wang C., Liu S. 2012. Identification of antigenic epitopes of the SapA protein of *Campylobacter fetus* using a phage display peptide library. *Research in Veterinary Science* 93, 1274-1280.
- Ziv G. 2013. Aspetti pratici di farmacocinetica nella terapia della mastite. Ministero dell'Agricoltura Kimron Veterinary Institute Bcit Dagan, Israele. Online http://www.buiatria.it/volume12_file/Pages%20from%20volume_12-5.pdf ultimo accesso 18 novembre 2013.

Ringraziamenti

Si ringrazia l'azienda agricola Sanna; la Chr. Hansen Italia; il Laboratorio Latte dell'A.R.A. Sardegna di Oristano; tutti i collaboratori della sezione di Endocrinologia, Zootecnica e Benessere animale del Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari.

In particolare esprimo la mia riconoscenza al Professor G. M. Vacca per avermi offerto la possibilità di proseguire la ricerca all'interno del suo gruppo di lavoro e al Dottor M. Pazzola per l'assidua collaborazione, la costante presenza e il grande supporto professionale e morale.