



A.D. MDLXII

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

**Dipartimento di Agraria**

**Laurea Magistrale in Scienze delle Produzioni Zootecniche**

**Indagini sulle concentrazioni di Selenio nel sangue e nel  
latte di pecore di razza Sarda in diversi allevamenti del  
Centro- Nord Sardegna**

Relatore:

**Prof. Gianni Battacone**

Correlatore:

**Dott. Antonio Piras**

Tesi di laurea di:

**Giorgia Serra**

Anno Accademico 2016/2017

*A mia madre, ai miei fratelli e sorelle*

## **Ringraziamenti**

Ringrazio il Prof. Battacone per la disponibilità e l'opportunità che mi ha dato per sviluppare l'argomento alla base della mia tesi per la laurea magistrale.

Ringrazio il p.a. Giovanni Pinna e il dr. Antonio Piras, tecnici della ditta Cargill – Purina, per aver dato la loro straordinaria collaborazione nella realizzazione dei campionamenti e raccolta dati presso le diverse aziende coinvolte nell'indagine. Il ringraziamento lo estendo a tutti gli allevatori che hanno dato la disponibilità e la collaborazione per le attività di campionamento in azienda che è stata la base essenziale per lo sviluppo di questa tesi.

Grazie alla Prof. Nudda e alle Drr. Mellino e Carta per l'aiuto che mi hanno dato nelle fasi di scrittura della tesi.

Un grazie particolare al team del laboratorio di Geopedologia del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Sassari: Mario Deroma, Emanuela Scanu e Linda Canu, per la loro preziosissima collaborazione per le parti analitiche della tesi e per avermi supportato, anche nei momenti di sconforto e difficoltà, con preziosi suggerimenti per le attività pratiche di laboratorio. In questo modo mi hanno fatto acquisire più responsabilità e sicurezza in me e soprattutto mi hanno regalato momenti di gioia passati insieme a ridere e scherzare.

Grazie a tutti gli amici e le persone incontrate in questo percorso, tra cui Tina Urgias, che mi hanno supportato anche solo con una buona parola.

Infine, un grande grazie a mia madre e ai miei fratelli e sorelle per avermi dato la forza di portare a compimento il percorso universitario che, nonostante le non poche difficoltà e sacrifici, rappresenta il traguardo del sogno che coltivavo sin da piccola.

## INDICE

RIASSUNTO .....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUZIONE.....	9
1.1. Caratteristiche chimiche e funzioni biologiche del Selenio .....	9
1.2. Il Selenio nell'alimentazione e l'assorbimento nell'organismo .....	9
1.3. Il ruolo del Selenio nella fisiologia animale .....	11
1.4. Tossicità e carenza nell'organismo .....	11
1.5. Miopatia nutrizionale: la miodistrofia enzootica (WMD) .....	13
1.6 Il Selenio nel suolo.....	15
1.7 Il Selenio nelle piante: assorbimento e metabolismo.....	16
1.8 Specie accumulatrici obbligate, facoltative e non indicatrici di selenio .....	16
1.9 Il Selenio nella fase di gestazione .....	17
1.10. Il Selenio nella lattazione .....	18
2. GLI EFFETTI DELLE CARENZE DI SELENIO NEGLI OVINI .....	18
2.1. Analisi del suolo e alimenti per conoscere la concentrazione.....	19
3. LE MISURE DI PROFILASSI PER I DANNI DA CARENZE NEGLI OVINI .....	20
3.1. Uso di diverse tipologie di integratori.....	21
4. OBIETTIVI DELLA TESI .....	23
5. MATERIALI E METODI.....	24
5.1 Le aziende ovine coinvolte per l'indagine .....	24
5.2 Il piano di campionamento.....	24
5.3 Determinazioni.....	25
5.4 La preparazione dei campioni per l'analisi del contenuto di Selenio .....	25
5.5 La mineralizzazione .....	27
5.6 La determinazione quantitativa del contenuto di Selenio .....	27
5.7 Calcolo del residuo Secco del latte .....	28
5.8 Mineralizzazione dell'integratore utilizzato dall'azienda A e mangime dell'azienda C. ....	28
5.9 Analisi statistica .....	28
6. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	29
6.1. La concentrazione di selenio nel sangue.....	31
6.2. La concentrazione di selenio nel latte .....	33
6.3. Analisi delle relazioni .....	34

7. CONCLUSIONI .....	35
8. FIGURE .....	36
9.BIBLIOGRAFIA .....	38

## **RIASSUNTO**

Il Selenio (Se) è un microelemento essenziale necessario per le normali funzioni degli organismi umani e animali. Il SE, infatti, svolge un ruolo di primaria importanza per la sintesi di selenoproteine che a loro volta sono alla base di diversi processi biochimici nell'organismo e hanno un ruolo determinante nel condizionare la fisiologia della sfera riproduttiva, del sistema immunitario e di quello cardio-circolatorio.

La carenza di Se nelle diete è la principale causa della comparsa di gravi forme patologiche a carico del sistema muscolare dei giovani neonati delle principali specie animali di interesse zootecnico (vitelli, agnelli, puledri, ma anche nel pollame e nei suini). In Sardegna, negli allevamenti di pecore da latte, in particolare in annate in cui le pecore in fase finale di gestazione ed inizio lattazione hanno limitata disponibilità di pascolo, si osserva una importante incidenza delle miopatie a carico degli agnelli in allattamento che comportano gravi perdite in termini di mortalità dei capi e/o dei costi per interventi terapeutici. Queste miopatie sono ricondotte alla carenza di selenio nella dieta delle pecore e sono affrontate in via preventiva con somministrazioni di Se nelle diete degli animali seppure questa integrazione non sia commisurata ad una reale conoscenza della disponibilità di Se nell'organismo animale o negli alimenti impiegati per il razionamento delle greggi.

Pertanto, come scopo della tesi si è scelto di indagare la presenza del Se nel sangue e nel latte di pecore di razza Sarda allevate in aziende ubicate nella Sardegna centro-settentrionale. Per l'indagine sono state interessate sia aziende che sono storicamente interessate dalla comparsa delle miopatie da Se deficienza negli agnelli (CRIT), che aziende che non presentavano il problema (CON). L'indagine ha previsto la quantificazione delle concentrazioni ematiche di Se in pecore di tutti gli allevamenti per un intero anno e la quantificazione del contenuto di Se nel latte di massa degli stessi greggi nel corso della lattazione. Sempre nelle stesse aziende sono stati registrati i piani alimentari e si è quantificata l'ingestione media giornaliera di Se nei diversi

allevamenti durante l'anno considerato. I risultati ottenuti dalla elaborazione dei dati evidenziano come l'ingestione di Se da concentrati sia stata maggiore nelle CRIT ( $p < 0,10$ ) nel periodo novembre-dicembre. Questo risultato si ipotizza sia dovuto al largo impiego che le aziende CRIT fanno di integratori di Se nella dieta per prevenire il rischio di carenza. L'ingestione di Se con foraggi e pascolo è simile fra i due tipi di allevamenti. La concentrazione di Se nel sangue non differiva fra i due gruppi di aziende sia nel periodo della lattazione che di asciutta. La concentrazione di Se nel latte è risultata maggiore ( $p < 0,05$ ) nelle CRIT rispetto alle CON. L'analisi delle regressioni fra l'ingestione di Se da concentrati e le relative concentrazioni nel latte e nel sangue non sono risultate significative, così come non è risultata significativa la relazione fra le concentrazioni di Se nel sangue e nel latte. In conclusione, con questa indagine è stato possibile acquisire i primi dati riguardanti le concentrazioni di Se nel sangue e nel latte di pecore allevate in Sardegna. I risultati ottenuti con questa prima attività di studio non sono in grado di fornire informazioni completamente esaustive sulle relazioni quantitative dei contenuti di Se nelle diete, nel sangue e nel latte degli ovini. Facendo riferimento a questi primi risultati si prospetta l'esigenza di approfondire la ricerca andando ad indagare le diverse forme con cui il Se è presente sia negli alimenti degli ovini in considerazione del fatto che questo aspetto condiziona la reale biodisponibilità del Se per l'organismo animale. Inoltre, in considerazione di quanto è stato possibile osservare sulla dinamica delle concentrazioni ematiche del Se nelle pecore si suggerisce un ulteriore approfondimento della ricerca per chiarire i rapporti quantitativi e qualitativi della presenza di questo elemento nel torrente ematico che alimenta lo sviluppo fetale e quindi il passaggio al latte che costituisce l'alimento base per gli agnelli nelle prime settimane di vita.

## ABSTRACT

Selenium (Se) is an essential microelement necessary for the regular physiology of human and animal organisms. Se have a relevant role for production of selenoproteins included in many activities like reproduction and immunity. Its deficiency in food and feed causes a lot of diseases. In high concentrations, Se is toxic for humans, animals and plants. Se deficiency in the body results in fatal myopathy in young animal like in calves, lambs, foals, poultry and pigs. In Sardinia the main negatives aspects due to a lack of Se in livestock is particularly relevant for dairy sheep farms.

The myopathy appears during the late gestation and at first period of lactation in situations of low pasture, causing the death of lambs and economic expenses to buy selenium supplements.

The purpose of this thesis is to study the relationship of concentrations of Se in Sarda dairy sheep blood and milk in farms, where this problem has always been present (CRIT) and farms where there is absent (CON). A survey was carried out covering a year in farms of center-north Sardinia.

The results show an ingestion of Se from higher concentrations in CRIT ( $P < 0.10$ ) in the period November-December due to an integration of the element in the diet. Ingestion of forage and pasture is similar. The Se concentration in the blood there are not differences ( $P > 0,05$ ) during lactation and dry. The concentration of Se in milk is higher in CRIT than CON. The relationships between the ingestion of Se from concentrates with that of milk and blood is not different, the same result between Se in blood and milk. In conclusion it is necessary to promote another studies to understand the principals chemical forms of selenium in feed, which influence its presence in blood; the correlation between selenium blood concentration and the development of fetus during the gestation and its relationship with selenium milk concentration during lactation.



## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. Caratteristiche chimiche e funzioni biologiche del Selenio

Il selenio (Se) è l'elemento chimico di numero atomico 34. È un microelemento che svolge un ruolo cruciale per la crescita e il mantenimento di ogni organismo vivente poiché entra a far parte di numerosi processi biologici, come ad esempio la costituzione di complessi proteici, chiamati selenoproteine e quelli di natura enzimatica (Schomburg, 2011). Tuttavia, benché esso sia un elemento alla base della vita, occorre tenere in considerazione che è piuttosto labile la differenza fra le quantità minime che l'animale deve assumere con gli alimenti per evitare fenomeni di carenza e le dosi limite di assunzione a cui che possono fare seguito la comparsa di fenomeni di tossicità da eccesso (Mazurek et al, 2012)

### 1.2. Il Selenio nell'alimentazione e l'assorbimento nell'organismo

L'importanza del Selenio come elemento alimentare essenziale è stato messo ben in evidenza a partire dai primi anni '50 e ne è stato possibile definire come la quantità ingerita attraverso gli alimenti sia innanzi tutto dipendente dalla sua disponibilità nel terreno e dalla forma chimica in cui è presente nei tessuti vegetali. Questo aspetto ha notevoli ripercussioni in numerose zone del mondo dove il suolo risulta particolarmente carente o eccessivamente ricco di Se con conseguenti adozioni di misure orientate per arginare il problema di carenza e/o tossicità di Se, sia per l'uomo che per gli altri animali ed in particolare per le specie di interesse zootecnico.

Il Selenio nell'organismo animale si trova principalmente immagazzinato nel muscolo cardiaco, fegato, milza e reni ed è presente come selenocisteina dove la quantità è da quattro a cinque volte maggiore rispetto a quella contenuta nei muscoli scheletrici (Juniper et al, 2009).

L'entità dell'assorbimento a livello intestinale è varia a seconda della specie: nei monogastrici è superiore rispetto ai ruminanti, questo è probabilmente da attribuire al fatto che a livello ruminale le forme chimiche come il selenito vengono convertite in forma insolubile e quindi non disponibile per l'assorbimento enterico. In animali monogastrici, l'assorbimento attivo a livello intestinale del selenio riguarda sia la selenometionina e che selenocisteina, ed è elevata la capacità di assorbimento (90-95%) per il selenito, mentre è inferiore (circa il 10%) per il selenato. Nei ruminanti, l'assorbimento relativo varia tra il 29-50% per il selenato. Un livello più basso di assorbimento nei ruminanti è dovuto alla presenza dell'attività microbica nel rumine che riduce i seleniti e selenati in altre forme come seleniuri e selenio elementare che lo rendono non biodisponibile. Alcuni microrganismi ruminali lo riducono in modo più efficiente, mentre altri lo incorporano in modo efficace in amminoacidi contenenti selenio. Il loro utilizzo durante la formazione di proteine può essere inibito dalla metionina e dalla cisteina naturali.

Nei casi di carenza di Se, la sua somministrazione per via parenterale risulta molto efficiente, come quella di assorbimento per via polmonare, poiché è reso pressoché immediatamente disponibile per l'organismo.

Le modalità di escrezione del Se sono soprattutto attraverso le vie urinarie e polmonari, invece la sua presenza nelle feci è considerato un indicatore di basso assorbimento. In fase di gestazione, il Se viene trasferito dalla madre al feto attraverso la placenta e durante l'allattamento attraverso il latte, la cui quantità varia a seconda dell'apporto fornito con la dieta. I prodotti di escrezione del Se compaiono anche nel sudore, nel latte e nell'aria espirata, la quale si presenta con un odore di aglio data la presenza di dimetilselenuro, quando la dose assunta supera 1 mg/kg. Vista la sua capacità di legarsi con metalli tossici, il selenio ingerito può non essere assimilato, quando si va a

legare con metalli come mercurio, tallio, cadmio e argento, andando a svolgere un'azione protettiva per l'organismo.

### 1.3. Il ruolo del Selenio nella fisiologia animale

Il Se ricopre un importante ruolo nell'ambito della riproduzione, influenzando principalmente la fertilità. Le cellule dello sperma maschile contengono grandi quantità di Se che si vanno riducendo all'aumentare della frequenza dell'impiego del riproduttore. Un basso contenuto di Se comporta una riduzione della motilità degli spermatozoi e un aumento della formazione di perossidi durante i processi biochimici che intervengono durante la spermatogenesi (Martins et al, 2014).

Il Se è indispensabile anche per la femmina durante la gestazione, poiché influenza una serie di fattori che portano al successo della gravidanza (Wu et al, 2011).

Il Se insieme ad altri microelementi tra cui lo zinco e il cobalto, ha un ruolo fondamentale nel potenziamento della risposta immunitaria dell'animale (Kendall et al, 2001). L'azione immunodepressiva è legata soprattutto alla sua carenza, poiché altera la capacità fagocitaria e l'attività dei neutrofili, a causa degli squilibri enzimatici che essa provoca nelle cellule (Kendall et al, 2012).

### 1.4. Tossicità e carenza nell'organismo

Il Se è un elemento essenziale per i mammiferi che tuttavia nelle condizioni di eccesso può portare al manifestarsi di gravi patologie.

Gli effetti tossici causati dal Se dipendono molto dalle forme chimiche, organiche e inorganiche, in cui è presente. Infatti, la forma chimica del Se ne determina la sua biodisponibilità, venendo trattenuto per periodi più o meno lunghi nei tessuti animali.

Nel 1964 gli studiosi Rosenfeld e Beath hanno classificato tre forme distinte di avvelenamento del selenio in bestiame (National Research Council ,1983.):

- *tossicità acuta*: l'avvelenamento è causato dall'ingestione di grande quantità di piante selenifere in un breve periodo di tempo. Il selenio nella dieta ( $> 5$  ppm) può produrre effetti clinici lievi dopo un periodo di tempo prolungato ( $\geq 30$  giorni). Segni clinici severi in seguito ad un'esposizione prolungata, dovrebbero manifestarsi con concentrazioni di 10-15 ppm. In caso di tossicosi acuta, la concentrazione di Se nel siero e nel sangue è  $> 3-4$  ppm, mentre nel fegato il range è  $>3-5$  ppm. La sintomatologia comprende disturbi respiratori, postura e movimento anormali, diarrea, seguiti dalla morte entro alcune ore. È stato dimostrato tuttavia, che la forma acuta di avvelenamento non è molto comune tra gli animali al pascolo, perché gli stessi evitano le piante selenifere, tranne che in condizioni di scarsa disponibilità di scelta delle essenze vegetali bestiame (National Research Council ,1983)

- *tossicità sub-acuta*: forma conosciuta come “barcollamento cieco” dove i livelli di Se nel siero sono  $> 1-2$  ppm (Hall, 2018). Si è visto che questa situazione si verifica negli animali che consumano una quantità limitata di piante che hanno immagazzinato selenio per un periodo di media durata (alcune settimane o mesi). Tuttavia questa malattia non è causata dalla somministrazione di composti puri di selenio, ma come è possibile riprodurre sperimentalmente, attraverso estratti acquosi delle piante selenifere (alcaloidi o altre sostanze tossiche), che interagiscono fra loro, collaborano per la manifestazione della sindrome. Gli animali colpiti manifestano un generale disorientamento, problemi di postura e andatura, fino a raggiungere la morte a causa di problemi respiratori (National Research Council ,1983)

- *tossicità cronica*: è il manifestarsi della” malattia degli alcali”. Gli animali consumano cereali (contenenti da 5 a 40 mg di Se/kg) ed essenze selenifere per un periodo di diverse settimane o mesi. La sintomatologia prevede: cirrosi epatica, zoppia, malformazioni agli zoccoli, perdita di peli e diminuzione del peso (National Research Council ,1983).

Al contrario, dosi insufficienti di Se nella dieta comportano la manifestazione di diversi disturbi fisiologici, molto più frequenti rispetto ai casi di tossicità,

sia a per l'uomo che le altre specie animali. Da un punto di vista umano, esempi significativi causati da una carenza sono: la malattia di Kashin-Beck, diffusa nel Tibet, che colpisce le ossa a causa proprio di gravi carenze di selenio nella dieta; la malattia di Keshan, che manifesta problemi cardiaci in età giovanile, diffusa in Cina in pazienti carenti di selenio in correlazione con la presenza dell'*enterovirus Coxsackie B*, favorito dalla ossidazione delle membrane cellulari causata dalla presenza dei radicali liberi. Mentre in zootecnia si manifesta attraverso la WMD.

#### 1.5. Miopatia nutrizionale: la miodistrofia enzootica (WMD)

In molti animali, tra i quali gli agnelli, vitelli e puledri, la dieta carente di Se comporta l'insorgenza di miopatie nutrizionali, presenti soprattutto nelle aree in cui gli allevamenti sono basati sull'alimentazione in stalla. Nel suino questa patologia è spesso associata ad altre come la Mulberry Heart Disease e l'epatosi dietetica; mentre la diatesi essudativa e degenerazione pancreatica riguarda il pollame.

Il contenuto di Se nei foraggi dipende dal pH del terreno (maggiore se il  $\text{pH} > 7$ ) e la quantità di Se nei tessuti animali dipende dalla dieta (Sfacteria et al., 2009).

Le miopatie nutrizionali sono caratterizzate dall'intervento di fattori dietetico-carenziali (vitamina E e Se) e dall'insorgenza di lesioni degenerative del tessuto muscolare scheletrico e/o cardiaco (Sfacteria et al. 2009).

In presenza di una inadeguata concentrazione di vitamina E e Se, le membrane cellulari vengono danneggiate dai radicali liberi e perdono la capacità di mantenere i gradienti di concentrazione ionica intra-extracellulare, in particolare quella degli ioni Calcio. Questo determina un'alterazione ionica intracellulare con mineralizzazione e lesioni a carico del tessuto muscolare (Sfacteria et al. 2009). Il flusso degli ioni Calcio dal comparto extracellulare verso il citosol, dove la concentrazione di questo varia da 1/4 ad 1/2 rispetto al compartimento extracellulare, provoca un grande aumento della richiesta di energia per rimuovere il Calcio dai miofilamenti calcio-sensibili e dai

mitocondri. Tutto ciò determina un accumulo eccessivo del contenuto di Ca (cinquanta volte il normale) e una conseguente riduzione della capacità di produrre energia. A seguire si hanno una serie di eventi che provocano la degenerazione cellulare, dovuta ad ipercontrazione delle miofibrille e degenerazione delle miofibre. (Sfacteria et al. 2009).

Da un punto di vista clinico e sintomatologico, si conoscono tre forme di questa patologia:

- *forma iperacuta*, che può manifestarsi in seguito ad un esercizio prolungato e/o improvviso, come il pascolamento, o situazioni di stress eccessive causate da pratiche d'allevamento "stressanti", come le vaccinazioni o la cattura. In questi casi, infatti, i fattori stressanti diventano la causa scatenante in presenza di miopatia nutrizionale subclinica.

- *forma cardio-respiratoria*, in cui si manifestano gravi difficoltà respiratorie caratterizzate da dispnea e da tachipnea. L'animale si presenta in un marcato stato di depressione, in decubito laterale e incapace di raggiungere la stazione eretta. La temperatura rettale può o meno variare. La frequenza cardiaca è di 150-200 bpm, con ritmo irregolare. In questo caso sono inutili gli interventi terapeutici, poiché il decesso giunge in 6-12 ore (Sfacteria et al. 2009).

- *forma locomotoria*, in cui i soggetti interessati presentano un'andatura rigida, barcollamento, difficoltà a stare in posizione eretta. Si può avere un aumento della frequenza cardiaca. Le difficoltà respiratorie sono dovute alle lesioni dei muscoli respiratori (diaframmatici e intercostali).

La sintomatologia di questa forma è simile alla forma clinica. Le lesioni possono verificarsi già due settimane prima del parto e, in questo caso, i muscoli colpiti sono soprattutto quelli della lingua e del collo (muscoli impiegati nella suzione), mentre negli animali meno giovani sono interessati i muscoli della spalla, coscia, oltre a quelli della lingua ed ai respiratori. Tutti i muscoli colpiti si presentano come pallidi, edematosi e calcificati; sono interessanti anche quelli intercostali, del diaframma e del cuore. A carico di quest'ultimo si possono avere lesioni sull'endocardio del ventricolo nei vitelli e agnelli, presentandosi come strie bianco-grigiastre o come chiazze diffuse a

marginari indefiniti ed irregolari, opache data la presenza di fenomeni di calcificazione distrofica (Sfacteria et al. 2009).

## 1.6 Il Selenio nel suolo

Il Se è un elemento non metallico calcofilo che forma diversi minerali rari, ma è soprattutto presente come elemento accessorio in sostituzione dello zolfo nei minerali solfuri comuni, come pirite o sfalerite (Pérez-Sirvent et al, 2010). La distribuzione delle sue diverse forme chimiche nel suolo dipende principalmente dai seguenti fattori: lo stato di ossidazione, il grado di aerazione, la presenza di sostanza organica e argilla, l'attività microbiologica. Il Se ha una duplice origine: organica, derivante dalla decomposizione delle piante selenifere e minerale nelle seguenti forme: seleniuro ( $\text{Se}^{2-}$ ), selenio elementare ( $\text{Se}^0$ ), selenito ( $\text{HSeO}_3^-$ ) maggiormente presente in regioni umide con pH acido e adsorbito dall'argilla e sesquiossidi; il selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) predomina in ambienti alcalini.

La concentrazione di Se nel suolo è influenzata fortemente dalla composizione mineralogica della roccia madre e sui processi di invecchiamento che hanno portato alla formazione del suolo: terreni di recente formazione (sabbie, granito, pomice) ne sono poveri, al contrario di quelli sedimentari (Shand et al., 1984).

Il contenuto di Se nel suolo è piuttosto variabile (range tra 0,2 and 0,4 ppm) mentre la soglia limite al di sotto del quale si identifica il suolo come carente è 0,05 ppm (Auvardia, 2003).

La componente microbica presente nel suolo ha un importante ruolo nel rendere disponibile il Se dislocandolo dalla frazione organica. Tuttavia si è anche visto che in suoli ricchi di carbonio, il selenato viene trasformato in forme meno mobili. I microrganismi sono capaci anche di contribuire all'esaurimento dell'elemento nel suolo, andando a produrre sostanze volatili come il dimetil-seleniuro.

## 1.7 Il Selenio nelle piante: assorbimento e metabolismo

Il Se è un elemento fondamentale anche per gli organismi vegetali. A basse concentrazioni infatti funge da antiossidante, protegge le cellule dai raggi UV e promuove l'assorbimento e l'assimilazione dell'azoto e la regolazione idrica della pianta. L'accumulo di Se nelle piante, non riflette necessariamente il livello presente nel suolo, infatti questo dipende dalla forma chimica e da altri fattori, come: il pH (la concentrazione di Se aumenta in condizioni di alcalinità); la presenza di carbonato di Ca e dalla concentrazione di questo, dalla capacità dell'organismo vegetale di assorbirlo anche contro gradiente (Yanarda et al, 1998). L'assorbimento del Se da parte delle piante viene inibito dalla presenza dello ione solfato, mentre viene favorito da quello fosfato in dipendenza però dalla forma chimica di entrambi.

La preferenza delle piante nell'assorbire quantità differenti di Se dipende dalla specie, infatti non tutte le piante sono accumulatrici di Se. Quelle *Se-accumulatrici*, assorbono più Se che Zolfo. La traslocazione dalle radici alle foglie è condizionato in maniera importante dalla forma chimica con cui viene assorbito: il selenato viene più facilmente assorbito rispetto al selenito e alle forme organiche come la SeMet. Dalle radici viene trasportato da trasportatori proteici che presentano affinità anche con lo Zolfo oltre che con il Se. La competizione per questi siti di trasporto fra i due elementi fa sì che nei casi in cui ci sia una elevata presenza di Zolfo ne venga condizionato negativamente l'accumulo di Se nei tessuti vegetali. A livello del tessuto fogliare il Se perviene ai cloroplasti, dove è metabolizzato attraverso la via di assimilazione riduttiva del solfato (Terry et al, 2000).

## 1.8 Specie accumulatrici obbligate, facoltative e non indicatrici di selenio

Le essenze botaniche, che sono anche qualificate come *indicatori obbligati*, richiedono Se per il loro sviluppo e ne contengono concentrazioni piuttosto



elevate (spesso > 1.000-10.000 ppm). Questo gruppo di specie vegetali include: *Astragalo*, *Stanleya*, *Machaeranthera*, *Oonopsis*, e *Xylorhiza*. Le piante *indicatrici facoltative* assorbono e tollerano quantità che vanno dalla traccia a poche migliaia di ppm, ma non richiedono il Se per la crescita. Le *indicatrici facoltative* includono: *Aster*, *Castilleja*, *Grindelia*, *Atriplex*, *Gatierreaia* e *Comandra*. Le *piante non accumulatrici*, quale la maggior parte delle specie erbacee, assorbono passivamente quantità molto più basse di Se dal suolo, con concentrazioni che vanno da alcune tracce a qualche centinaia di ppm; contengono principalmente selenometionina, mentre le piante *indicatrici* contengono più selenato e metilselenocisteina. (Terry et al, 2000).

### 1.9 Il Selenio nella fase di gestazione

Nei mammiferi gestanti il Se ha un ruolo particolarmente importante. Wu et al. (2011) con uno studio condotto con capre da lana alimentando gli animali con un integratore di Se ha osservato l'aumento: dello sviluppo follicolare, della concentrazione dell'ormone IGF-1, e della concentrazione di Se nel siero, e nella pelle del feto. Durante la gestazione, il Se che passa dall'organismo materno a quello fetale, attraverso la placenta, influenza positivamente la produzione di complessi enzimatici con attività antiossidanti (GSH-Px e selenoproteina P) nel corso dello sviluppo embrionale. Il GSH-Px influenza anche la produzione e l'attività delle citochine pro-infiammatorie. L'influenza del Se per la sintesi dell'ormone IGF-1 contribuisce in maniera importante per la proliferazione cellulare a livello ovarico con azione particolarmente evidente a vantaggio dello sviluppo del follicolo. Negli ovini questo aspetto è dipendente anche dall'alimentazione. Tuttavia quantità eccessive di Se ostacolano lo sviluppo embrionale (embriotossico), poiché riduce la disponibilità di energia e ossigeno, presentando anche un effetto teratogeno, con effetti negativi sullo sviluppo osseo e della cartilagine, può anche essere causa di aborti e riduzione della crescita del feto.

## 1.10. Il Selenio nella lattazione

Livelli adeguati di Se durante la fase di lattazione influenzano lo stato di salute generale dell'animale, mantenendo l'integrità del tessuto mammario, grazie alla presenza di enzimi che prevengono l'ossidazione e quindi l'invecchiamento stesso delle cellule, ostacolando allo stesso tempo l'insorgenza di processi infiammatori, quali le mastiti che compromettono la carriera produttiva quantitativamente e qualitativamente e causano un aumento dei costi aziendali.

Un'integrazione a base di Se organico contribuisce all'aumento dell'elemento nel latte, poiché è una fonte ricca di SeMet che viene incorporata in maniera del tutto simile alla metionina durante il processo di produzione delle proteine (Gong et al, 2014).

## 2. GLI EFFETTI DELLE CARENZE DI SELENIO NEGLI OVINI

Negli allevamenti ovini, la carenza di Se qualora sia tale da provocare effetti negativi a carico dell'organismo animale ha ripercussioni particolarmente sfavorevoli sulla redditività dell'allevamento. Queste evenienze negative a carico dei greggi di ovini da latte interessano in maniera piuttosto rilevante gli agnelli nella fase di allattamento o dei giorni immediatamente successivi allo svezzamento. I danni economici sono riconducibili ai minori redditi conseguenti alla maggiore mortalità degli agnelli in fase di allattamento e svezzamento e quelli di maggiori oneri per gli interventi farmaco-veterinari nei casi in cui si intervenga con trattamento diretto sugli agnelli.

Il danno assume una ulteriore rilevanza se gli agnelli colpiti dalla miopatia sono quelli destinati a costituire la rimonta aziendale. In questo caso viene meno anche la possibilità di scegliere le migliori agnelle per ricostituire il gregge e magari l'allevatore si trova costretto ad acquistare agnelle da rimonta per mantenere gli standard produttivi dell'allevamento.

Nelle situazioni in cui la carenza di Se nelle diete del gregge è piuttosto frequente che si ripeta negli anni, i piani alimentari delle pecore in gestazione

prevedono l'impiego di prodotti commerciali che hanno la funzione di fornire diversi microelementi che possono essere carenti negli alimenti impiegati. Peraltro, il Se contenuto in questi integratori alimentari dovrebbe avere anche una funzione utile anche in considerazione del suo ruolo nei meccanismi fisiologici che regolano lo sviluppo uterino e la produzione dell'ormone della crescita del feto (Wu et al., 2011).

## 2.1. Analisi del suolo e alimenti per conoscere la concentrazione

La dotazione di Se dei suoli su cui insistono le produzioni foraggere è considerato come un elemento base per definire il rischio di assunzione eccessiva o deficitaria di questo importante elemento. Pertanto la quantificazione della presenza del Se nel suolo è ritenuto uno dei fattori da considerare nella definizione del rischio per gli animali alimentati prevalentemente al pascolo. Il passaggio del Se dal suolo alla dieta assunta dagli animali è, in termini generali, riconducibile alla valutazione quantitativa e qualitativa della presenza dell'elemento nel materiale adeso alle piante, o parti di piante, assunte con il pascolamento e alla presenza dello stesso elemento, sia in forma organica che inorganica presente nei tessuti vegetali delle foraggere.

Diversi studi hanno identificato regioni della Terra come carenti di Se, ed in questa categoria sono indicate le aree il cui contenuto di Se nel suolo sia compreso fra 0,1 a 0,6 mg/kg (Gupta e Gupta, 2000). Questo comporta che in molte aree del mondo i foraggi non siano in grado di garantire un adeguato apporto di Se per il bestiame allevato. In altre aree le concentrazioni di Se nei pascoli sono piuttosto elevate e possono rappresentare un fattore di rischio di tossicità per gli animali (Herdt et al., 2000). Il contenuto di Se del suolo entra fra gli elementi di conoscenza di cui è opportuno disporre per intervenire con eventuali piani alimentari che ne mitigano gli effetti di carenza o eccesso negli animali allevati.

Diversi studi hanno evidenziato come il contenuto di Se di foraggi può essere migliorato intervenendo la fertilizzazione del suolo (Gupta e MacLeod, 1994). Walburger et al. (2008) in un esperimento condotto con piani di fertilizzazione usando concime di Se e il mix di sali minerali arricchiti con Se hanno osservato che questi fertilizzanti possono essere un valido strumento per superare le carenze di Se nei pascoli per ruminanti.

### 3. LE MISURE DI PROFILASSI PER I DANNI DA CARENZE NEGLI OVINI

Per arginare i danni causati dalla carenza del Se nella dieta sono stati individuati diversi approcci che sono classificabili come interventi di vera e propria profilassi.

Poiché gli effetti della carenza di Se colpisce in maniera estremamente più marcata gli ovini giovani, in particolare durante la fase di allattamento, l'attenzione dei ricercatori si è concentrata in maniera importante sullo studio della relazione fra alimentazione delle pecore lattanti e l'assunzione di Se da parte degli agnelli. Le fasi fisiologiche su cui si è posta l'attenzione per mitigare gli effetti negativi da carenza di Se è la gestazione, il parto e di allattamento. Ogni approccio di intervento è opportuno sia supportato da osservazioni, e misurazioni, utili per stimare il reale apporto dell'elemento nel piano di razione degli animali.

Wichtel (1998) riporta una serie di suggerimenti funzionali per ben calibrare l'intervento di somministrazione con integratori di Se in ruminanti alimentati prevalentemente al pascolo. Questo autore osserva come la base dei protocolli di intervento debba essere una attenta analisi della situazione di ciascuna azienda con specifico riferimento agli indicatori che si vogliono usare per quantificare il reale stato di apporto di Se nella dieta. Tra i più efficaci metodi utili per la valutazione della deficienza di Se nell'organismo vi sono la sua quantificazione come concentrazione ematica o la misurazione dell'attività della glutathione peroxidase nel sangue. Tuttavia, l'utilità di queste rilevazioni è vincolata alla disponibilità di dati di riferimento che sono peraltro

estremamente variabili in funzione della specie animale considerata, dello stadio fisiologico degli animali e delle caratteristiche del suolo e dei pascoli in uso. Il range che definisce una adeguata presenza del Se nel sangue è indicato in 0,12-0,15 mg/litro per gli ovini adulti (Aitken, 2001) con valori che variano 0,12-0,50 mg/litro in funzione delle diverse condizioni dell'ambiente di allevamento e di produzione dei pascoli e foraggi usati (Menzies et al., 2004). Stewart et al. (2011) suggeriscono la somministrazione di Se alle pecore durante la gestazione e inizio dell'allattamento come metodo efficace per soddisfare i requisiti di Se negli agnelli appena nati anche in considerazione del fatto che il Se attraversa efficientemente la barriera placentare nei tessuti fetali ed entra nel colostro e nel latte.

### 3.1. Uso di diverse tipologie di integratori

In campo zootecnico sono impiegate diverse forme di integratori di Se nelle diete. Le forme più comunemente usate per gli ovini sono: Na-selenito, Na-selenato o Se-lievito in concentrazioni limite di 0,3 mg di Se/kg di dieta o comunque in quantità non superiore a 0,7 mg di Se/d/pecora. In diversi studi è stata valutata l'efficienza del diverso tipo di integratore di Se che si distinguono se in forma inorganica o organica.

Le forme inorganiche in uso sono il selenito e il selenato di sodio, che risultano particolarmente solubili e sono ben assorbite dai monogastrici. Per i ruminanti, e quindi anche per gli ovini adulti, l'assorbimento del Se in queste forme è piuttosto basso poiché una quota importante dell'ingerito viene in solubilizzata a livello ruminale. Tra le forme di Se organico si considerano le forme chelate e i lieviti arricchiti in Se. In forma di chelato il Se è legato, principalmente, con la Metionina per dare luogo alla seleniometionina. Nel caso dei lieviti fatti crescere in terreni ricchi di Se, questo elemento viene incorporato nelle proteine, principalmente in forma di seleniometionina, (SeMet), ed in misura minore come selenio cisteina (SeCis). Nei ruminanti, le integrazioni di Se in forma organica sono ritenute come quelle che

garantiscono il maggiore assorbimento a livello dell'intestino se confrontati con le forme inorganiche come Na-selenito e Na-selenato ( Hall et al, 2011).

Nelle specie ruminanti la sua biodisponibilità del Se della dieta è data principalmente da due fattori: il Se inorganico che è in parte ridotto a Se elementare nel rumine (viene convertito in selenuro di diidrogeno per poter essere utilizzato nella sintesi proteica o escreto); la SeMet può essere incorporata in proteine al posto della Met, dove successivamente il Se viene o eliminato o convertito in SeCys. Mentre, il Se inorganico può essere incorporato solo come SeCis. Questo comporta che le perdite urinarie di Se sono maggiori quando l'integrazione avviene con la forma inorganica (Hall, et al, 2015). L'uso di Se organico, per l'integrazione della dieta di pecore in gestazione, quando somministrato come lieviti selenizzati, assicura una maggiore quantità di immunoglobuline nel colostro e la nascita di agnelli con minori probabilità di andare incontro al verificarsi della MWD (Stewart et al, 2015). Per quanto riguarda gli integratori di Se con lieviti, si osservano differenze importanti in funzione della specie microbica utilizzata.

In tutti i casi l'impiego corretto delle integrazioni, anche nei casi di evidenti criticità per la carenza di Se nella diete degli animali, è assolutamente necessario disporre di informazioni specifiche del sistema di allevamento. Gli elementi conoscitivi di rilievo per predisporre un adeguato piano di intervento deve considerare i fattori ambientali quali: la dotazione di Se nel suolo; la presenza del Se nella dieta e il metabolismo del Se nel corso delle diverse fasi fisiologiche degli animali.

#### 4. OBIETTIVI DELLA TESI

L'obiettivo della parte sperimentale della tesi è la conduzione di una indagine mirata per valutare le concentrazioni di Selenio nel sangue e nel latte di ovini allevati in diverse aziende in Sardegna. Inoltre, si è considerata l'ipotesi di verificare le relazioni fra concentrazioni di Selenio nei diversi costituenti le razioni e le relative concentrazioni nel sangue e nel latte in aziende che storicamente sono interessate da fenomeni riconducibili a carenze di Selenio e altre aziende che non sembrano interessate da questa criticità. Pertanto, con questo studio si vuole contribuire alla acquisizione di informazioni che possono essere utili per definire meglio i piani alimentari degli ovini da latte. Queste esigenze di conoscenza sono di particolare interesse per le pecore in gestazione ed inizio di lattazione quando la carenza di Selenio della dieta rischia di dare effetti negativi a carico degli agnelli da latte con la comparsa di miodistrofie.

Pertanto, gli obiettivi specifici della ricerca sono stati:

- La valutazione del contenuto di Selenio nei suoli e negli alimenti impiegati nelle diverse aziende;
- La valutazione della concentrazione di Selenio nel sangue di pecore da latte nel corso dell'anno;
- La valutazione del contenuto di Selenio nel latte prodotto dalle aziende nel corso dell'intera lattazione.

L'indagine è stata condotta con la collaborazione della ditta Cargill e con il suo staff tecnico che opera in Sardegna per il supporto tecnico agli allevamenti di ovini da latte.

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 Le aziende ovine coinvolte per l'indagine

Per l'indagine sono state individuate, complessivamente, sette aziende che operano in diverse zone del centro-nord Sardegna ed ospitano l'allevamento di ovini da latte di razza Sarde. La fase di acquisizione di dati e campioni dell'indagine ha avuto inizio nel mese di febbraio 2016 ed è terminata nel mese di marzo del 2017.

In quattro delle suddette aziende si registrava uno storico rischio di comparsa di miodistrofie a carico degli agnelli che è comunemente attribuito a forme di carenze importanti di Selenio nell'alimentazione delle greggi. L'ubicazione geografica di queste quattro aziende, indicato come "critiche" è la seguente:

- azienda A sita in agro di Ozieri;
- azienda B sita nell'agro di Ittireddu;
- azienda C sita a Fiume Santo;
- azienda D sita nell'agro di Ottana;

Sono state scelte, e coinvolte nell'indagine, altre tre aziende per i quali non si registrava la problematica di miodistrofie a carico degli agnelli. Queste aziende, classificate "controllo" hanno ubicazione a:

- azienda E sita nella zona di Chilivani;
- azienda F sita nell'agro di Ozieri;
- azienda G sita nell'agro di Sassari in regione Bancali.

### 5.2 Il piano di campionamento

Per ciascuna azienda sono stati monitorati i piani alimentari impiegati per l'intero anno con registrazione del tipo e delle quantità di alimenti usati. Tutti gli alimenti sono stati campionati e analizzati per il contenuto di Selenio.



In ciascuno dei sette allevamenti sono stati individuati cinque pecore sulle quali si è intervenuti con il prelievo ematico con frequenza di circa sei settimane per un intero anno. Il campione di sangue veniva prelevato dalla vena giugulare e raccolto in provetta priva di anticoagulante (Figura 7-8). I campioni di sangue sono stati conservati in congelatore a circa -20°C, fino al momento delle analisi.

In concomitanza con il prelievo del sangue, in ogni azienda si è provveduto al campionamento del latte prodotto dall'intero gregge. I campioni di latte sono stati sottoposti a congelamento e conservati a -20°C fino al loro impiego per le determinazioni analitiche.

Un campione, rappresentativo, dei suoli presenti nelle diverse aziende è stato prelevato e conservato per le determinazioni analitiche.

### 5.3 Determinazioni

*Stima delle ingestioni di Selenio:* presso i laboratori della ditta Cargill-Purina, sono stati determinati i contenuti di Selenio nei campioni di foraggi e concentrati impiegati nelle diverse aziende. Le informazioni sui piani alimentari aziendali nei diversi periodi dell'anno interessato dall'indagine hanno consentito di stimare le ingestioni alimentari medie per capo ovino. Per la stima delle quantità di sostanza secca assunta dagli animali si è fatto ricorso alla stima dell'ingestione media secondo quanto riportato da Pulina et al., 2001 a cui è stata detratta la quantità di sostanza secca ingerita con i concentrati e i fieni. L'ingestione media di Selenio con la razione è stata calcolata usando i valori delle concentrazioni di Selenio nei diversi alimenti ponderati per le quantità di ciascun alimento ingerito giornalmente, in media, da ogni pecora.

### 5.4 La preparazione dei campioni per l'analisi del contenuto di Selenio

Suoli: per poter essere mineralizzati, i 17 campioni di suolo sono stati setacciati con un setaccio da 2 mm. In seguito all'eliminazione dell'umidità ciascun campione è stato macinato con un macinino (Retsch) (Figura 9). Dopo

la macinazione, 1 g di campione è stato mineralizzato secondo il metodo *EPA 3051*, come da protocollo. Il mineralizzato così ottenuto viene sottoposto a filtrazione con filtri Whatmann 42 e portati a volume in matracci da 50 ml (Figura 10). La soluzione ottenuta viene diluita ulteriormente 1/10 per poter essere analizzata. L'efficienza della mineralizzazione è stata monitorata con l'utilizzo di campione di suolo certificato (*Leco Soil*) sottoposto agli stessi trattamenti dei campioni.

Sangue: Per ogni azienda, e per ogni data di campionamento, sono stati scelti tre dei cinque capi interessati dal prelievo. Le provette di sangue conservate a -20°C sono state sottoposte a scongelamento lento, ponendole in frigorifero per almeno una notte a circa 4°C, per proseguire con le altre operazioni la mattina successiva. Anche in questo caso una quantità nota di sangue intero (0,5 ml) è stata esattamente pesata e posta nel vessel di mineralizzazione con successiva aggiunta dei diversi reagenti per la mineralizzazione secondo il metodo *EPA Blood* (Figura 13). Come per il terreno, i campioni così trattati sono stati portati a volume in matracci da 50 ml e in seguito filtrati e diluiti ¼ per essere sottoposti ad analisi. Anche in questo caso la mineralizzazione è stata monitorata con l'utilizzo di standard certificati di sangue (ERM-BD 151) sottoposti al medesimo trattamento dei campioni.

Latte: I campioni congelati di latte massale (n. 54) sono stati sottoposti a scongelamento lento, ponendo i contenitori per almeno una notte a circa 4°C, per proseguire con le altre operazioni la mattina successiva. Si è proseguito sistemando la provetta del latte a bagnomaria e lo si è tenuto così per circa mezz'ora dal momento in cui il latte aveva raggiunto i 42°C di temperatura (Figura 11). Successivamente i campioni di latte sono stati riportati a temperatura ambiente di circa 20°C lasciandoli a bagnomaria sotto acqua corrente. A seguire, 0,5 ml di latte sono stati esattamente pesati e, con l'uso di una pipetta, disposti nel vessel per le successive operazioni di mineralizzazione secondo il metodo *EPA Bovine Milk*. Anche per il latte si è provveduto ad una doppia diluizione 1/50 e successivamente ¼ prima di sottoporli ad analisi. Anche in questo caso tutta la fase di preparazione dei

campioni è stata monitorata con l'utilizzo di standard certificati di latte (IAEA-A-13) sottoposti ai medesimi trattamenti dei campioni.

### 5.5 La mineralizzazione

Le analisi sulle varie matrici sono state eseguite con l'utilizzo dello strumento *Milestone Ethos Easy SK 15* (Figura 12), il quale presenta due generatori a microonde di 950 Watt ciascuno, per un totale di 1900 Watt; un diffusore piramidale che assicura una distribuzione ottimale delle microonde permettendo una mineralizzazione anche dei campioni più difficili. E' dotato di un software che permette di controllare tramite sensori pressioni e temperatura dentro i contenitori. Inoltre attraverso una serie di metodi U.S. EPA è in grado di mineralizzare qualsiasi matrice, tramite l'azione di temperatura, pressione, opportuna miscela di acidi e delle microonde regolate in base al peso del campione. L'eventuale perdita di analita viene controllata e verificata da appositi CRM.

### 5.6 La determinazione quantitativa del contenuto di Selenio

Le soluzioni, appositamente diluite, ottenute dalla mineralizzazione dei campioni (di suolo, sangue e latte) sono state analizzate con strumentazione ICP-MS (*PerkinElmerSCIEX mod. NexION<sup>TM</sup> 300 ICP-MS System*) per la quantificazione della concentrazione di Selenio.

Lo strumento NexION<sup>TM</sup> (Figura 14) è uno spettrometro di massa al plasma ad accoppiamento induttivo che esegue le analisi elementari di campioni di diversa natura. Il sistema è costituito da uno strumento ICP-MS da banco, da una pompa di diffusione e di ricircolo e da un sistema di acquisizione dati con un software di analisi. La lettura degli elementi può avvenire in due modi: attraverso la modalità Dynamic Reaction Cell<sup>TM</sup> per la rilevazione d'analisi più bassi ad oggi possibili, oppure nel modo più semplice in modalità a discriminazione di energia cinetica (KED) per le analisi rapide.

Il campione viene convertito dalla fase liquida a quella aerosol attraverso un nebulizzatore, costituito da un gas nebulizzatore, ovvero l'argon. Attraverso la formazione di un campo elettromagnetico, si vanno a dissolvere le gocce di

aerosol, vaporizzandole, atomizzandole e portando alla formazione di ioni. Gli ioni vengono separati dallo spettrometro in base al rapporto massa/carica e viene prodotto un segnale in base alla concentrazione.

#### 5.7 Calcolo del residuo Secco del latte

Il residuo secco è stato calcolato pesando il tin foil, messo in essiccatore per un paio di ore in modo tale da sottrarre l'umidità e nuovamente ripesato per ottenere la tara definitiva. Con una pipetta Eppendorf, è stato prelevato 0,5 ml di latte e pesato. I tin foils sono stati messi in stufa prima a 105°C per delle ore. Dopo raffreddati in essiccatore, sono stati nuovamente pesati.

#### 5.8 Mineralizzazione dell'integratore utilizzato dall'azienda A e mangime dell'azienda C.

Dopo esser stato macinato con un frullatore in maniera grossolana, il mangime è stato ulteriormente ridotto di dimensioni con l'uso di un macinino (modello Retsch ZM 200), come lo stesso integratore. Per essere mineralizzati, si sono pesati 0,500 g di prodotto ripetuti in doppio, posti nei vessel e si è proceduto secondo la metodica EPA *Maize*. Anche per questi campioni si è provveduto ad una doppia diluizione 1/50 e successivamente 1/10 prima di sottoporli ad analisi. Anche in questo caso tutta la fase di preparazione dei campioni è stata monitorata con l'utilizzo di standard certificati (1568 A Rice Flour) sottoposti ai medesimi trattamenti dei campioni.

#### 5.9 Analisi statistica

I dati delle concentrazioni di Selenio nel latte, nel sangue, e le corrispondenti ingestioni giornaliere medie di Selenio per capo, per le diverse aziende, sono stati sottoposti ad analisi della varianza considerando gli effetti del tipo di azienda (controllo o critica), del tempo di rilievo e la loro interazione. Poiché non è risultato significativo l'effetto del tipo di azienda sulle concentrazioni di Selenio nel sangue, i dati sono stati rianalizzati con un modello che considerava l'effetto dell'azienda, del tempo di rilievo e la loro interazione.

L'analisi delle regressioni hanno riguardato le variabili:

- quantità giornaliera di Selenio ingerita con gli alimenti e concentrazione di selenio nel sangue;
- concentrazioni del Selenio nel sangue e concentrazioni di selenio nel latte.

## 6. RISULTATI E DISCUSSIONE

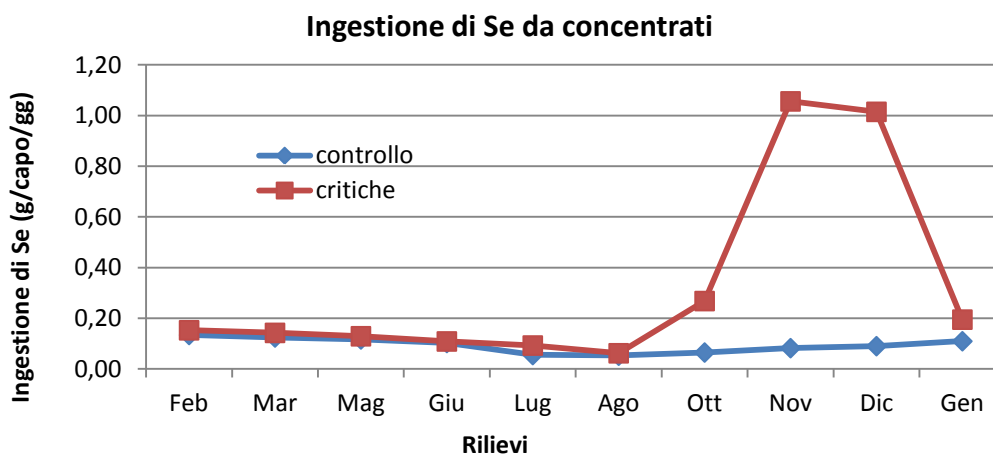
La stima della ingestione di Se attraverso il concentrato e i foraggi è riportata in tabella 1.

**Tabella 1.** Valori medi delle ingestioni stimate di Se da concentrati, pascolo più foraggi, e totali nella dieta nelle aziende di controllo e critiche nel corso dell'anno.

	CONTROLLO		CRITICHE		P value
	media	ds	media	ds	
<b>Se da Concentrati</b> (g/capo/gg)	0.095	0.040	0.323	0.634	0.07
<b>Se da Pascolo +Foraggi</b> (g/capo/gg)	0.162	0.220	0.136	0.145	ns
<b>Se dalla dieta</b> (g/capo/gg)	0.253	0.233	0.450	0.629	ns

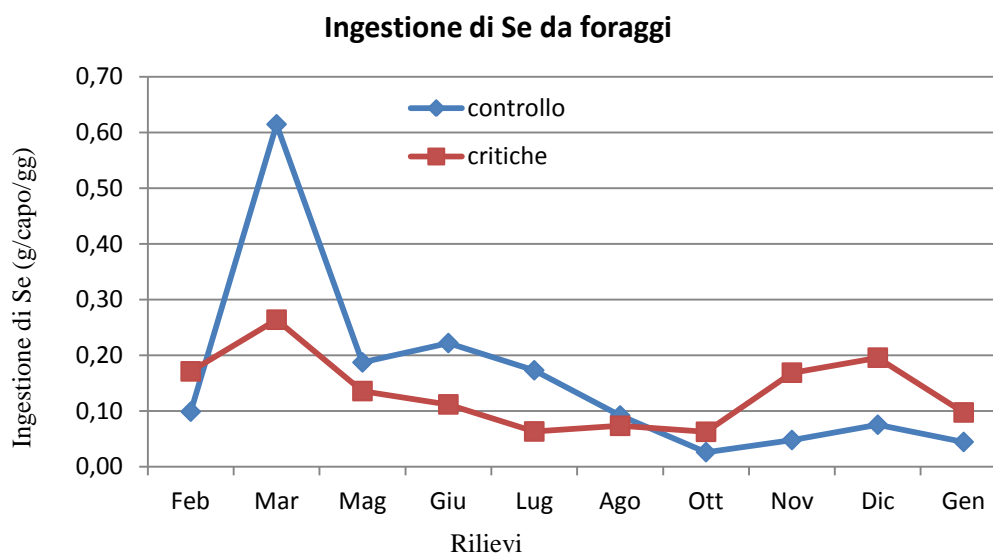
I dati evidenziano che l'Ingestione di Se da concentrato è risultata tendenzialmente superiore ( $P < 0.10$ ) nel gruppo di aziende critiche rispetto al gruppo di aziende controllo. Non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda l'ingestione di Se da pascolo più foraggio e l'ingestione totale di Se. L'evoluzione temporale dell'ingestione da concentrato (Figura 1) mostra un andamento analogo in entrambi i gruppi nel periodo compreso tra Gennaio e Agosto mentre nei mesi successivi Novembre e Dicembre è evidenziato un repentino aumento nelle aziende critiche.

L'incremento di ingestione di Se da concentrati da parte delle aziende critiche è dovuto all'integrazione del microelemento da parte delle aziende che in quel periodo manifestano le patologie dovute alla mancanza di Se.



**Figura 1.** L'evoluzione temporale dell'ingestione di Se da concentrati nelle aziende di controllo e nelle aziende critiche nel corso dell'anno.

L'evoluzione temporale della ingestione di Se dai foraggi (figura 2) evidenzia una ingestione del microelemento superiore nelle aziende controllo nei periodi da Febbraio ad Agosto evidenziando un maggiore apporto derivato prevalentemente dall'erba del pascolo nel mese di Marzo in corrispondenza della massima disponibilità quanti-qualitativa dell'erba del pascolo.



**Figura 2.** L'evoluzione temporale dell'ingestione di Se da foraggi nelle aziende di controllo e nelle aziende critiche nel corso dell'anno.

## 6.1. La concentrazione di selenio nel sangue

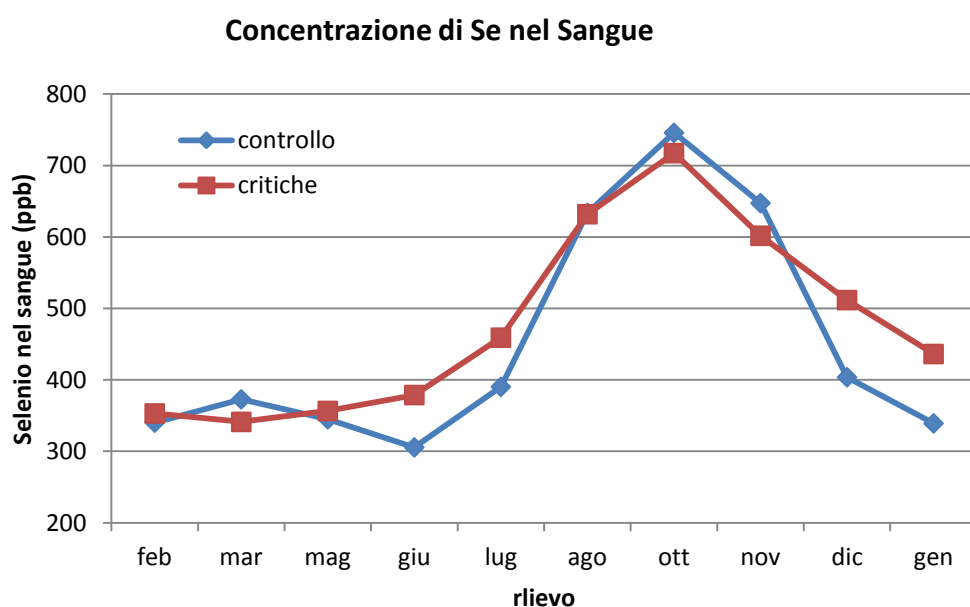
La concentrazione di Se nel sangue nei due gruppi di aziende è riportato in tabella 2. Come si evince dalla tabella non sono state trovate differenze statisticamente significative nella concentrazione di Se nel sangue tra il gruppo di controllo e il gruppo critico.

**Tabella 2.** Valori medi della concentrazione di Se nel sangue nel gruppo di controllo e nel gruppo critico

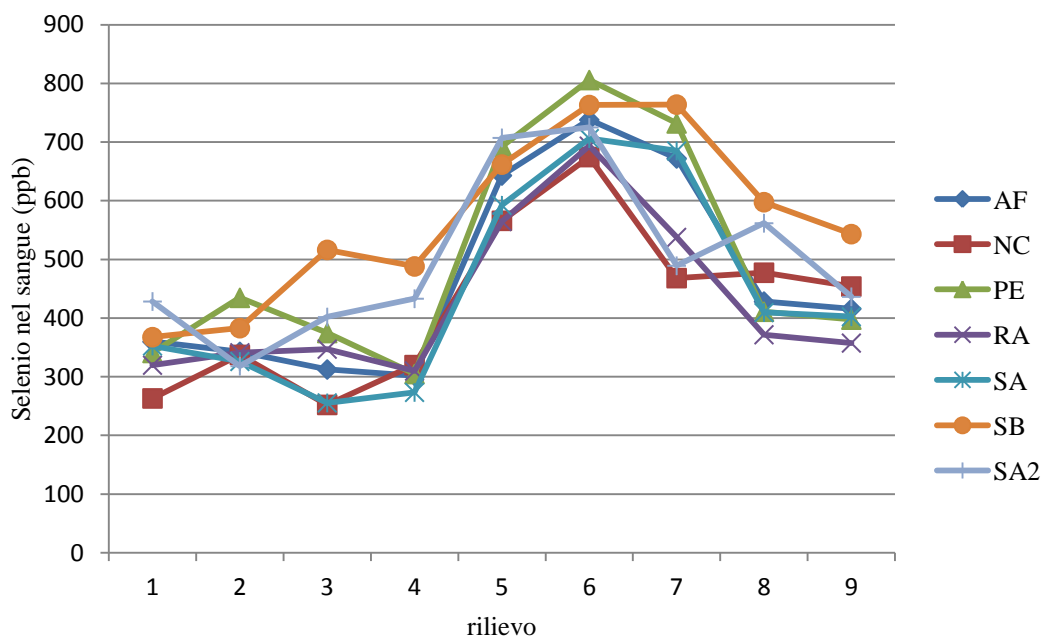
<i>aziende</i>	<b>Concentrazione Se (ppb)</b>
<b>CONTROLLO</b>	461,11±160,96
<b>CRITICHE</b>	478,75±148,11

I risultati non evidenziano differenze significative nella concentrazione di Se tra il gruppo di aziende controllo e critiche ( $P>0.05$ ). Interazione tra le aziende e i rilievi non è risultata significativa.

L'evoluzione temporale della concentrazione di Se nel sangue ha evidenziato un andamento analogo tra i due gruppi per tutta la durata del periodo sia di lattazione che di asciutta (Figura 3).



**Figura 3.** Evoluzione della concentrazione di Se nel sangue nelle aziende di controllo e nelle aziende critiche nel corso dell'anno



**Figura 4.** Concentrazione di Se nel sangue delle pecore scelte in tutte le aziende incluse nell'indagine

L'evoluzione delle concentrazioni di Se nel sangue delle pecore campione (Figura 4) separatamente per ciascuna azienda oggetto di indagine, evidenzia come le maggiori concentrazioni ematiche del microelemento, si riscontrano nelle aziende che fanno largo impiego di integratori a base di Se nel periodo preparato, e che sono anche quelle in cui si riscontra con maggiore frequenza il manifestarsi della sintomatologia da carenza sugli agnelli.

Questo risultato, alquanto inatteso, evidenzia la necessità di approfondire le informazioni circa la biodisponibilità del Se nell'integratore somministrato agli animali e di individuare il momento ottimale di somministrazione alle madri al fine di favorire l'utilizzazione metabolica del feto in grado di contrastare la comparsa di sintomatologia da carenza.

D'altra parte non è da escludere che l'impiego di dosi eccessive di integratore potrebbero causare forme di intossicazione che potrebbero manifestare sintomatologia simile ai fenomeni di carenza.



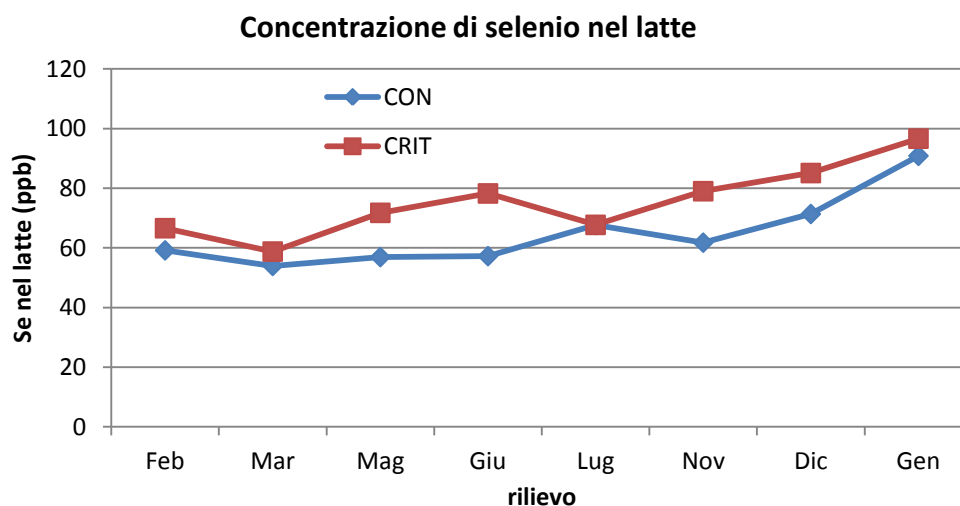
## 6.2. La concentrazione di selenio nel latte

La concentrazione di Se nel latte è riportata in Tabella 3. I risultati evidenziano una concentrazione di Se significativamente superiore nel gruppo critico rispetto al gruppo controllo. Mentre l'interazione Aziende x Rilievi non è risultata significativa.

**Tabella 3.** Valori medi del contenuto di Selenio nel latte nelle aziende di controllo e critiche per la sintomatologia da carenza di Se

	aziende		P value		
	Controllo	Critiche	Aziende	Rilievi	A x R
<b>Concentrazione Se (ppb)</b>	64.89±17.94	76.19±17.24	<0.05	<0.01	ns

L'andamento temporale di Se nel latte evidenzia come la concentrazione del minerale sia costantemente superiore nelle aziende critiche rispetto al controllo. Questo sottolinea la presenza del microelemento all'interno della dieta sia nei periodi dove è massima la disponibilità quanti-qualitativa dell'erba sia negli altri periodi dell'anno.



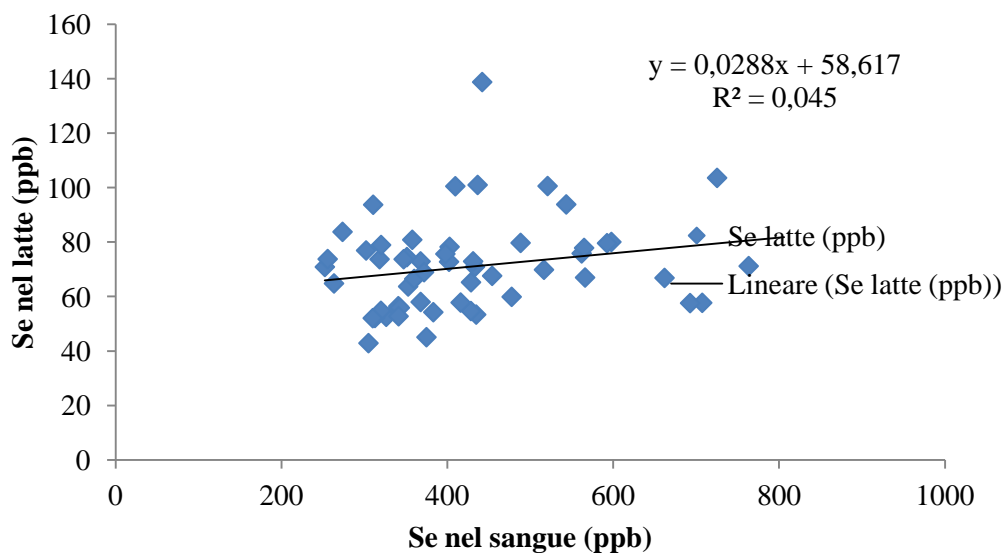
**Figura 5.** Concentrazione di Se nel sangue nelle aziende di controllo e nelle aziende critiche nel corso dell'anno.

### 6.3. Analisi delle relazioni

L'analisi delle correlazioni tra ingestione di Se e concentrazione nel latte e nel sangue è riportata in tabella 4. Le correlazioni tra ingestione di Se da concentrato e Se nel latte e nel sangue non sono risultate significativamente diverse da zero. La relazione tra Ingestione di Se con pascolo/foraggi e Se nel sangue è risultata di entità media-bassa ( $P < 0.05$ ).

**Tabella 4.** Valori delle correlazioni di Pearson tra la quantità di Se ingerita e quella presente nel sangue e nel latte. al di sopra della diagonale sono presenti i valori di P value relativi al test di significatività delle correlazioni. Al di sotto i valori di R2 delle correlazioni

	Se totale da c	Se P+F	Se ing tot	Se latte	Se sangue
Se totale da c		0,438	0,01	0,136	0,912
Se P +F	-0,096		0,034	0,12	0,014
Se ing tot	0,937	0,258		0,363	0,428
Se_latte	0,204	-0,212	0,125		0,146
Se_sangue	0,014	-0,3	-0,098	0,2	



**Figura 6.** Regressione lineare fra concentrazione di Se nel latte massale e medie delle concentrazioni di Se ematico nelle pecore delle diverse aziende nel corso dell'anno di osservazione..

Nessuna relazione è stata riscontrata tra Se nel latte e Se nel sangue. L'andamento delle concentrazioni di Se nel sangue e nel latte e le Ingestioni con la dieta nelle aziende CRIT, suggerisce un accumulo di Se nei tessuti tra cui quello della ghiandola mammaria e un graduale rilascio durante la lattazione, molto più marcato nel caso di somministrazione più elevata di Se nella dieta.

## 7. CONCLUSIONI

In conclusione i risultati di questa prova hanno evidenziato:

Una differente ingestione di Se da concentrati e da foraggi tra le aziende di controllo e quelle classificate come critiche.

Una maggiore somministrazione di Se con i concentrati nelle aziende critiche rispetto al controllo nella fase parto.

Nessuna relazione tra concentrazione di Se nel latte e quella nel sangue.

Nessuna correlazione tra la quantità di Se ingerito e le concentrazioni di Se sia nel sangue che nel latte. Questo evidenzia come le misurazioni di Se nel latte e/o nel sangue non siano sufficienti a stimare le ingestioni di Se negli animali.

Ulteriori studi sono necessari : per valutare la forma di Se, inorganico o organico, utilizzato nelle differenti aziende ovine per contrastare le dismetabolie da carenza; per approfondire il metabolismo del selenio nelle sue differenti forme in relazione al periodo di somministrazione, a cui corrispondono differenti fasi fisiologiche dell'animale.

## 8. FIGURE



Figura 7. Prelievo del sangue



Figura 8. Prelievo del sangue

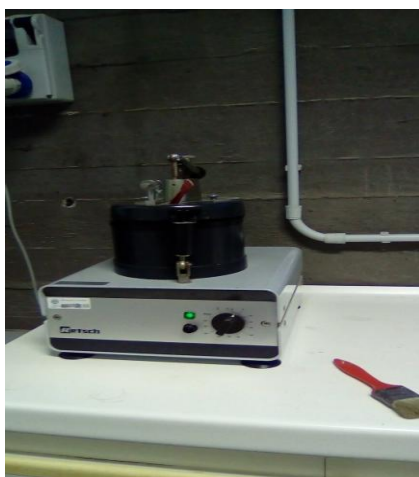


Figura 9. Macinazione dei suoli



Figura 10. Filtrazione mineralizzati



Figura 11. Latte a bagnomaria



Figura 12. Il mineralizzatore



Foto 13: Preparazione campioni sangue

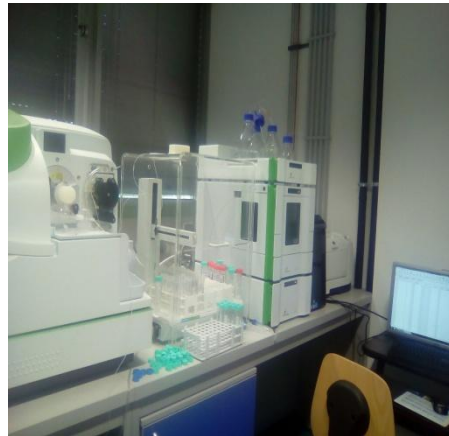


Foto 14: apparecchio ICP-MS

## 9.BIBLIOGRAFIA

Aitken P, 2001, Se toxicity, Practice, 23, 286-289

Avondo M. e Bordonaro S., 2001. L'ingestione alimentare. In: Pulina G. (ed). L'alimentazione degli ovini da latte. Avenue media, Bologna, Italia, pp 95-111

Åuvardiã, 2003 SELENIUM IN SOIL. Disponibile su: [www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-4906/2003/0352-49060304023C](http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-4906/2003/0352-49060304023C).

Carenze di selenio e/o vitamina E nei grossi animali. Università degli Studi di Napoli "Federico II". Facoltà di medicina Veterinaria. Dipartimento di scienze cliniche veterinarie. Sezione di clinica medica.

Foucras G., Schelcher F., Valarcher J. F., Espinasse J., 1996. La distrofia muscolare nei ruminanti. Summa, 13(2): 65-71.

Gong J., Ni L., Wang D., Shi B., Yan S., 2014. Effect of dietary organic selenium on milk selenium concentration and antioxidant and immune status in midlactation dairy cows. Livestock Science, Volume 170

Gupta U.C., MacLeod J.A. (1994). Effect of various sources of selenium fertilization on the selenium concentration of feed crops. Canadian Journal of Soil Science 74, 285–290 Effect of various sources of selenium fertilization on the selenium concentration of feed crops. Canadian Journal of Soil Science 74, 285–290

Gupta U.C., Gupta S.C. (2000). Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans, Implications for management, Comm soil sci & Plant Anal, 31, 1741-807

Hall J.A., Van Saun R. J., Bobe G., Stewart W. C., Vorachek W. R., Mosher W. D., Nichols T., Forsberg N. E., Pirelli G. J., 2011. Organic and inorganic selenium: I. Oral bioavailability in ewes

Hall J.A. et al, 2015 Organic and inorganic selenium: I. Oral bioavailability in ewes

Hall J. O., DVM, PhD, DABVT, 2018. Overview of Selenium Professor and Head of Diagnostic Toxicology, Utah State University. Disponibile su:  
<https://www.msdsvetmanual.com/toxicology/selenium-toxicosis/overview-of-selenium-toxicosis>

Herdt T.H.DVM, MSRumbeiha W. PhD, Emmett Braselton E. PhD, 2000. The Use of Blood Analyses to Evaluate Mineral Status in Livestock. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. Volume 16, Issue 3, November 2000, Pages 423-444. Disponibile su:  
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30078-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30078-5)

Juniper D.T., Phipps R.H., Ramos-Morales E., Bertin G., 2009. Effect of high dose selenium enriched yeast diets on the distribution of total selenium and selenium species within lamb tissues. Livestock Science, Volume 122

Kendall N. R., Mackenzie A.M., Telfer S.B., 2001. *Effect of a copper, cobalt and selenium soluble glass bolus given to grazing sheep*. Livestock Production Science, Volume 68, Issue 1, February 2001, Pages 31-39

Kendall N.R., A.M. Mackenzie, S.B. Telfer ,2012 The trace element and humoral immune response of lambs administered a zinc, cobalt and *selenium* soluble glass bolus *Livestock Science*, Volume 148, Issues 1–2, September 2012, Pages 81-86

Martins S.M.M.K., De Andrade A.F.C., Zaffalon F.G., Parazzi L.J., Arruda R.P., 2014. Organic selenium increases PHGPx, but does not affect quality sperm in raw boar semen *Livestock Science*, Volume 164, June 2014

Mazurek A. C. e Grażyna Wałkuska, 2012. ENVIRONMENTAL CONDITIONS CAUSING SELENIUM DEFICIENCY IN SHEEP

Disponibile su:

[https://www.researchgate.net/publication/272894181\\_Environmental\\_conditio](https://www.researchgate.net/publication/272894181_Environmental_conditio)

ns\_causing\_selenium\_deficiency\_in\_sheepArticle in Journal of  
Elementology 19(1/2014) · Settembre 2012

Menzies P, Langs L, Boermans H, Martin J, McNally J, 2004, Myopathy and  
hepatic lipolidosis in weaned lambs due to vitamin E deficiency, Can Vet J,  
45, 244-247

Selenium in Nutrition. National Research Council (US) Subcommittee on  
Selenium. Washington (DC): National Academies Press (US); 1983

Diisponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK216727/>

Pérez-Sirvent C., Martínez-Sánchez M.J., García-Lorenzo M.L., Molina J.,  
Tudela M.L. , Mantilla W., Bech J., 2010. Selenium content in soils from  
Murcia Region (SE, Spain)

Ruolo delle selenoproteine - Thyroid Collection; Disponibile su:  
[www.thyroidcollection.net/cont/il-selenio/211/ruolo-delle-selenoproteine.asp](http://www.thyroidcollection.net/cont/il-selenio/211/ruolo-delle-selenoproteine.asp)  
(scaricato il 18 marzo 2018)

Selenio. Disponibile su: <https://it.wikipedia.org/wiki/Selenio> . (scaricato il 19  
maggio 2018)

Schomburg L., 2012. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland:  
interactions in health and disease. Nat. Rev. Endocrinol. 8, 160-171 (2012)).

Sfacteria A. et al., 2009 Miodistrofia enzootica degli agnelli: Indagini clinico-  
patologiche in un allevamento siciliano. Large Animal Review 2009; 15: 211-  
214 211

Selenio . My Personal Trainer. Disponibile su: [www.my-personaltrainer.it](http://www.my-personaltrainer.it)  
(scaricato il 18 marzo 2018)

Selenocisteina - PianetaChimica; Disponibile su:  
[www.pianetachimica.it/mol\\_mese/mol\\_mese\\_2008/08.../Selenocisteina\\_1.htm](http://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2008/08.../Selenocisteina_1.htm)  
(scaricato il 18 marzo 2018)



Shand C.A., Eriksson J., Dahlin A.S., Lumsdon De Temmerman D.G. et al., 1984 Selenium concentrations in national inventory soils from Scotland and Sweden and their relationship with geochemical factors

Stewart W.C., Bobe G., Vorachek W.R., Pirelli G.J., Mosher W.D, Nichols T., Van Saun R.J., Forsberg N.E., Hall J.A., 2011. Organic and inorganic selenium: II. Transfer efficiency from ewes to lambs<sup>1</sup>

Terry N., Zayed A.M., de Souza M.P., Tarun A.S., 2000. Selenium in higher plants .

Disponibile su: [http://www.plantstress.com/articles/toxicity\\_i/selenium.pdf](http://www.plantstress.com/articles/toxicity_i/selenium.pdf)

YANARDA R. e ORAK H., 1998 Selenium Content of Milk and Milk Products of Turkey

Vitamina E (tocoferolo). La Leva di Archimede. Disponibile su:

[www.laleva.cc/almanacco/vitamina\\_E.html](http://www.laleva.cc/almanacco/vitamina_E.html) (scaricato il 18 marzo 2018)

Walburger K. J., DelCurto T., Pulsipher G. D., Hathaway R. L., Pirelli G. J. (2008). The effect of fertilizing forage with sodium selenate on selenium concentration of hay, drain water and serum selenium concentrations in beef heifers and calves. *Can. J. Anim. Sci.*, 88 (2008), 79-83

Wichtel JJ. 1998. A review of selenium deficiency in grazing ruminants. Part 2: Towards a more rational approach to diagnosis and prevention. *New Zealand Veterinary Journal*, Volume 46, Issue 2: 54-58.

Wu X., Yang Z., Yue W., Shi L., 2011. Improved fetal hair follicle development by maternal supplement of selenium at nano size size (Nano-Se) *Livestock Science*, Volume 142, Issues 1–3, December 2011, Pages 270-275