

CINETICA DELLA RISPOSTA ANTICORPALE IN PECORE SPERIMENTALMENTE INFETTATE CON *BRUCELLA MELITENSIS* BIOVARIANTE 3

M. Tittarelli, M. Di Ventura, F. De Massis, A. Petrini, A. Giovannini, D. Nannini & V. Caporale
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise «G. Caporale», Teramo - Italia

RIASSUNTO

*Gli autori hanno valutato la cinetica della risposta anticorpale in 46 pecore provenienti da un allevamento ufficialmente indenne da brucellosi ovicaprina, infettate sperimentalmente con *Brucella melitensis* biovar 3 e seguite nel corso di tre cicli riproduttivi consecutivi. Nel presente studio sono analizzati i risultati della prova di sieroagglutinazione rapida con antigene Rosa Bengala (SAR) e della prova di fissazione del complemento (FDC).*

I risultati degli esami eseguiti nel corso del 2° e del 3° ciclo riproduttivo mostrano un picco anticorpale al parto, seguito da un calo nei mesi successivi. Il picco anticorpale al parto del 3° ciclo riproduttivo è significativamente inferiore rispetto al picco del 2°. Il calo anticorpale osservato dopo il parto del 3° ciclo riproduttivo è significativamente superiore a quello osservato dopo il parto del 2° ciclo riproduttivo. A quasi 3 anni dall'infezione sperimentale, tuttavia, l'infezione può essere ancora svelata a livello di gregge.

PAROLE CHIAVE

Brucella melitensis biovar 3 - Fissazione del Complemento - Ovini - Siero Agglutinazione Rapida

Introduzione

Studi sulla cinetica anticorpale alla SAR e alla FDC in pecore sperimentalmente infettate con *Brucella melitensis* sono già stati condotti in precedenza (1, 3, 4, 6). Tuttavia, la cinetica a lungo termine dei titoli anticorpali in pecore infette da brucellosi rimane poco conosciuta, così come il possibile effetto dello stato fisiologico degli animali infetti sulle prestazioni degli esami sierologici.

Nessun autore, infatti, ha considerato più cicli riproduttivi consecutivi.

Il presente studio, pertanto, è stato condotto al fine di valutare, in pecore infettate sperimentalmente con *Brucella melitensis* biovar 3, la cinetica anticorpale a lungo termine, nonché le prestazioni degli esami SAR e FDC in relazione allo stato fisiologico degli animali infetti, nell'arco di tre cicli riproduttivi consecutivi.

Materiali e metodi

Animali

Quarantasei pecore di razza fabrianese e meticce di età compresa tra 1 e 5 anni provenienti da allevamenti ufficialmente indenni da brucellosi ovicaprina sono state inseminate naturalmente a seguito di sincronizzazione dell'estro. In 25 delle 46 pecore è stata diagnosticata gravidanza e 24 di esse hanno abortito tra le 4 e le 6 settimane post inoculazione sperimentale (p.i.), mentre una sola pecora ha partorito normalmente.

Tre animali sono morti per cause naturali tra 1 e 2 mesi p.i.. Le pecore rimanenti sono state inseminate naturalmente a seguito di sincronizzazione dell'estro 8 mesi p.i.. In 26 pecore è stata diagnosticata gravidanza e tutte hanno partorito normalmente tra le 56 e le 58 settimane p.i..

Sette pecore sono morte per cause naturali nel corso dei 3

KINETICS OF THE ANTIBODY RESPONSE IN EWES EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *BRUCELLA MELITENSIS* BIOVAR 3

Summary

The authors evaluated the kinetics of antibody response in 46 ewes coming from officially brucellosis free flocks that were experimentally infected with *Brucella melitensis* biovar 3, and monitored through three subsequent reproductive cycles. In this study, results of Rose Bengal Test (RBT) and Complement Fixation Test (CFT) were considered. Test results of 2nd and 3rd reproductive cycle show a peak in the antibody production at parturition, followed by a drop in the following months. The peak at parturition is significantly lower in the 3rd reproductive cycle compared to the 2nd. The drop in antibody production observed after parturition of the 3rd reproductive cycle is significantly higher than that observed after parturition of the 2nd reproductive cycle. Nevertheless, the infection can still be revealed at flock level after three years post infection.

mesi successivi al parto, una pecora è morta dopo 8 mesi. Ventidue mesi p.i. le pecore rimanenti sono state inseminate naturalmente a seguito di sincronizzazione dell'estro. In 22 pecore è stata diagnosticata gravidanza e tutte hanno partorito normalmente tra le 120 e le 126 settimane p.i.. L'intero esperimento è durato 151 settimane. Nel presente studio sono state considerate 32 pecore che hanno partorito almeno una volta nel corso del 2° e/o del 3° ciclo riproduttivo.

Infezione sperimentale

Per l'infezione sperimentale è stato usato un ceppo di campo di *B. melitensis* biovariante 3 isolato da un feto ovino abortito. Il ceppo è stato inoculato per via sottocutanea in 2 cavie ed è stato reisolato a 21 giorni p.i. in 10 ml di terreno di Farrell (2) a partire da un omogenato delle milze degli animali inoculati. Dopo 48 ore d'incubazione a +37° C il ceppo cresciuto nel terreno è stato titolato.

Gli animali sono stati infettati sperimentalmente per via endocongiuntivale durante il terzo mese di gestazione del primo ciclo riproduttivo. Nella congiuntiva di entrambi gli occhi sono stati inoculati complessivamente 5×10^8 Unità Formanti Colonia (UFC) in 100 μ l (50 μ l per ciascuna).

Campioni raccolti

Tutti gli animali sono stati testati per la presenza di anticorpi anti-*Brucella* prima dell'infezione, successivamente a cadenza settimanale per due mesi p.i., quindi periodicamente fino a 151 settimane p.i.. Da ciascun animale sono stati prelevati 3 ml di sangue dalla vena giugulare. Complessivamente sono stati raccolti e analizzati 1225 campioni di siero.

Esami sierologici

Tutti i sieri sono stati esaminati per la presenza di anticorpi anti-*Brucella* mediante SAR e FDC. Entrambe le prove sono state eseguite usando l'antigene *Brucella abortus* biovariante 1 ceppo 99 (VLA. Weybridge, UK), preparato e standardizzato secondo la metodica descritta nella quinta edizione Manuale dei Test Diagnostici e i Vaccini per animali terrestri dell'OIE (5). I titoli alla FDC sono stati espressi come Unità Internazionali Fissanti il Complemento (U.I.). Sono stati considerati come positivi tutti i titoli alla FDC superiori a zero.

Analisi statistica

Per ciascun prelievo, la stima della percentuale di animali positivi sugli esaminati ed i relativi intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati per mezzo della distribuzione di probabilità Beta (7). I titoli alla FDC del 2° e del 3° ciclo riproduttivo sono stati confrontati tramite il test non parametrico di Wilcoxon. All'interno di ciascun ciclo riproduttivo, è stata valutata la differenza tra le distribuzioni dei titoli alla FDC nei diversi prelievi tramite l'analisi non parametrica della varianza di Friedman. La differenza tra i singoli prelievi è stata valutata mediante il test di Wilcoxon e gli intervalli di confidenza del Bonferroni.

Risultati

Tutti i sieri raccolti prima dell'infezione sperimentale hanno dato risultato negativo a SAR e FDC. Tutte le pecore infettate sperimentalmente hanno prodotto anticorpi alla SAR e alla FDC. La cinetica della risposta anticorpale a SAR e FDC è mostrata rispettivamente nelle Figure 1 e

Keywords

Brucella melitensis biovar 3 - Complement Fixation Test - Rose Bengal Test - Sheep.

Introduction

Studies on RBT and CFT antibody kinetics in sheep experimentally infected with *B. melitensis* have already been performed in the past (1, 3, 4, 6). However, little is known about the long-term kinetics of antibody titers, as well as the possible effects of physiologic state of infected animals on the performance of serological tests.

In fact, other authors have never considered various subsequent reproductive cycles. This study, therefore, has been carried out to evaluate, in experimentally infected ewes, the long-term antibody kinetics, as well as the performances of serological tests in relation to the physiologic state of infected animals, during three subsequent reproductive cycles.

Materials and methods

Animals

Forty-six Fabrianese and crossbreed sheep aged 1 to 5 years from Brucellosis officially free flocks were naturally inseminated after oestrus synchronization. Twenty-five out of the 46 sheep became pregnant and 24 aborted between 4 and 6 weeks post experimental infection (p.i.), while only one sheep had normal parturition. Three animals died between 1 and 2 months p.i.. The remaining sheep were naturally inseminated, after oestrus synchronization, 8 months p.i.. Twenty six sheep became pregnant and all had normal parturition between weeks 56 and 58 p.i.. Seven sheep died within 3 months after parturition, one sheep died after 8 months. Twenty two months p.i., the remaining sheep were naturally inseminated after oestrus synchronization. Twenty two sheep became pregnant and all had normal parturition between weeks 120 and 126 p.i.. The whole experiment lasted 151 weeks. This study considered 32 ewes that had at least one parturition during the 2nd and/or the 3rd reproductive cycle.

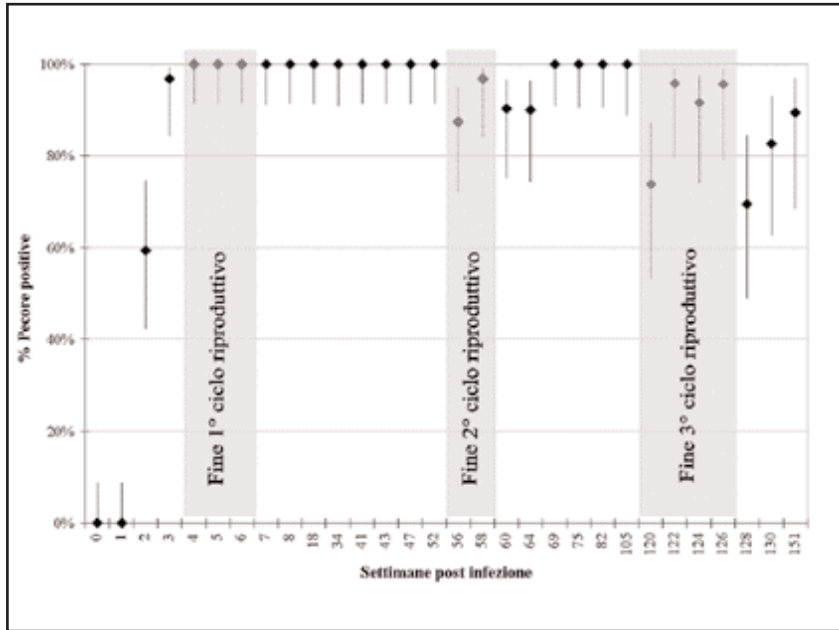


Figura 1: Percentuale di pecore risultate positive alla SAR e intervalli di confidenza al 95% durante l'intero esperimento.

Figure 1: RBT: percent of positive sheep and 95% confidence intervals.

2. Mediana, valore massimo, valore minimo, 25° e 75° percentile dei titoli anticorpali alla FDC al 2° e al 3° ciclo riproduttivo sono mostrati in Figura 3. Per il 2° ciclo riproduttivo sono stati presi in considerazione i titoli al parto, ai 120 e 30 giorni precedenti e ai 30 e 120 giorni seguenti. Per il 3° ciclo riproduttivo sono stati presi

in considerazione i titoli al parto, ai 120 giorni precedenti e ai 30 e 90 giorni seguenti. Statistiche descrittive dei risultati dei sopracitati prelievi sono mostrate rispettivamente nelle Tabelle 1 e 2. I risultati del test di Friedman e Wilcoxon tra il 2° e il 3° ciclo riproduttivo, per gli stessi prelievi, sono mostrati rispettivamente nelle Tabelle 3 e 4, mentre i

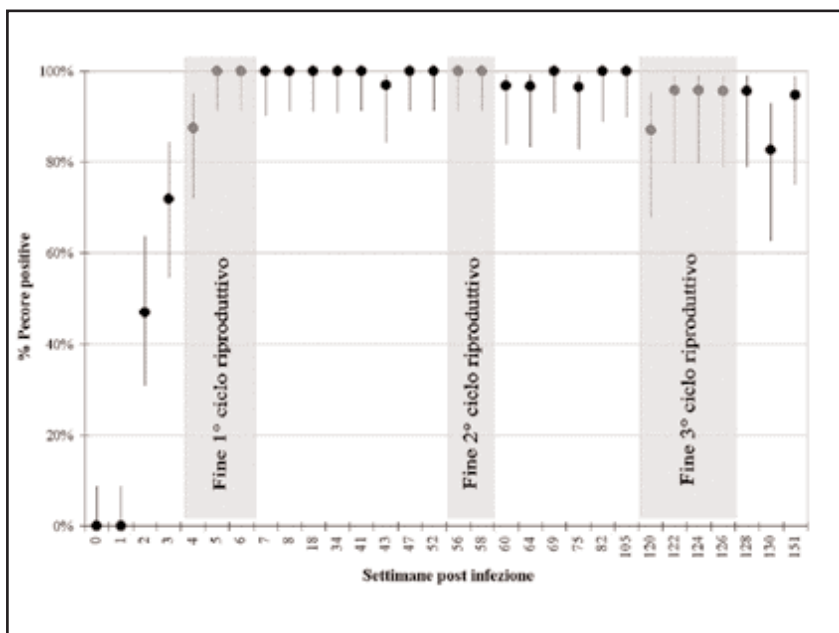


Figura 2: Percentuale di pecore risultate positive alla FDC e intervalli di confidenza al 95% durante l'intero esperimento.

Figure 2: ICFT: percent of positive sheep and 95% confidence intervals.

Experimental Infection

A field strain of *B. melitensis* biovar 3 isolated from an ovine aborted fetus has been used for the experimental infection. The strain was inoculated subcutaneously in 2 guinea pigs and was re-isolated in 10 ml of Farrell's medium (2) from the homogenized spleens of the inoculated animals 21 days p.i.. After 48 hours at +37° C the medium grown strain was titrated. The animals were experimentally infected by the intra-conjunctival route during the 3rd month of the 1st reproductive cycle. A dose of 5×10^8 Colony Forming Units (CFU) in 100 μ l was inoculated in the conjunctiva of both eyes (50 μ l each).

Samples collected

All animals were tested for *Brucella* spp. antibodies before infection, then weekly for two months p.i., and then periodically until 151 weeks p.i.. From each animal, 3 ml of serum were collected by jugular venipuncture. Finally, 1225 serum samples were collected and analyzed.

Serological tests

All sera were tested for presence of antibodies against *Brucella* spp. using RBT and CFT. Both tests were performed using the *Brucella abortus* biovar 1 strain 99 antigen (VLA, Weybridge, UK), prepared and standardized according to the methods described in the 5th edition of the O.I.E. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (5). CFT titers were expressed in International Complement Fixation Test Units (I.U.). Any CFT titer higher than zero has been considered as positive.

Statistical analysis

For each sampling, the percentage of positive animals and its 95% confidence intervals were estimated by the Beta distribution (7). CFT titers resulted during the 2nd and the 3rd reproductive cycles were compared by the non-parametric Wilcoxon test. For each reproductive cycle, a comparison amongst samplings was performed by Friedman non-parametric analysis of variance, while contrasts were evaluated by Wilcoxon test and Bonferroni's confidence intervals.

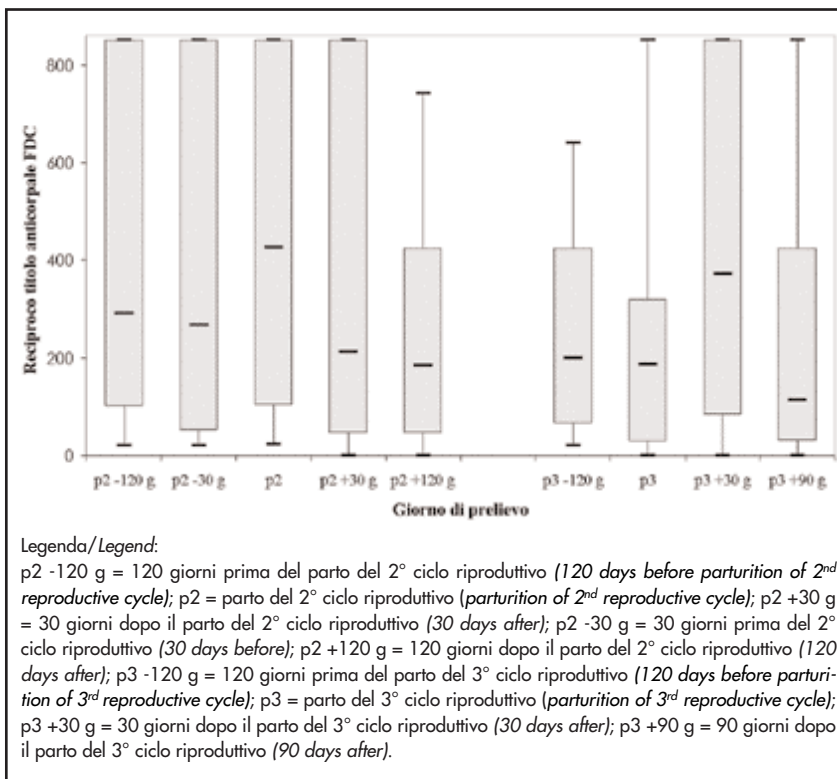


Figura 3: Mediana, valore massimo, valore minimo, 25° e 75° percentile dei titoli anticorpali alla FDC di 2° e di 3° ciclo riproduttivo.
Figure 3: ICFT median, maximum, minimum, 25th and 75th percentiles of antibody titer at 2nd and 3rd reproductive cycle.

risultati del confronto tra il 2° e il 3° ciclo riproduttivo tramite test di Wilcoxon sono mostrati in Tabella 5.

Discussione

Tutte le pecore utilizzate per l'esperimento sono state infettate dal ceppo inoculato (*B. melitensis* biovar 3), come dimostrato dal numero di animali positivi sierologicamente (46 su 46). Sul prelievo effettuato al parto del 2° ciclo riproduttivo è stato rilevato un picco nella produzione di anticorpi (Figure 1, 2 e 3). In questo prelievo sarebbe previsto un calo nei titoli anticorpali a causa di un possibile drenaggio di anticorpi nel colostro. Considerando sia il 2° che il 3° ciclo riproduttivo, il calo è stato invece osservato tra i 90 e 120 giorni post partum (Friedman test $p < 0,01$, Tabelle 3 e 4, Figura 3). Le statistiche

Results

All sera collected before the experimental infection gave negative results to RBT and CFT. All experimentally infected sheep produced RBT and CFT antibodies. The kinetics of antibody response to RBT and CFT is shown in Figures 1 and 2 respectively. CFT titer median, maximum value, minimum value, 25th and 75th percentiles of antibody titers at 2nd and 3rd reproductive cycle are shown in Figure 3. For the 2nd reproductive cycle, titers at parturition, 120 and 30 days before parturition, and 30 and 120 days after parturition were considered. For the 3rd reproductive cycle, titers at parturition, 120 days before parturition, and 30 and 90 days after parturition were analyzed. Descriptive statistics of the same over mentioned sampling days are shown in Tables 1 and 2 respectively. Results of Friedman test and Wilcoxon test within 2nd and 3rd reproductive cycles for the same sampling days are shown in Tables 3

Tabella 1: Statistiche descrittive dei titoli alla FDC nel corso del 2° ciclo riproduttivo.

Table 1: CFT titers: descriptive statistic of 2nd reproductive cycle.

	p2 -120g	p2 -30g	p2	p2 +30g	p2 +120g
Media/Mean (U.I.)	397,4	405,0	468,9	408,6	214,9
Mediana/Median (U.I.)	292,0	266,4	426,4	212,8	185,6
Valore Minimo/Minimum (U.I.)	20,0	20,0	23,2	0,0	0,0
Valore Massimo/Maximum (U.I.)	851,2	851,2	851,2	851,2	742,4
Percentili/Percentils	25°	99,8	51,5	103,0	46,4
	75°	851,2	851,2	851,2	851,2

Legenda:

U.I. = Unità Internazionali; p2 -120 g = 120 giorni prima del parto del 2° ciclo riproduttivo (120 days before parturition of 2nd reproductive cycle); p2 -30 g = 30 giorni prima del parto del 2° ciclo riproduttivo (30 days before); p2 = parto del 2° ciclo riproduttivo (parturition of 2nd reproductive cycle); p2 +30 g = 30 giorni dopo il parto del 2° ciclo riproduttivo (30 days after); p2 +120 g = 120 giorni dopo il parto del 2° ciclo riproduttivo (120 days after).

Tabella 2: Statistiche descrittive dei titoli alla FDC nel corso del 3° ciclo riproduttivo.

Table 2: CFT titers: descriptive statistic of 3rd reproductive cycle.

	p3 -120g	p3	p3 +30g	p3 +90g
Media/Mean titre (U.I.)	247,6	248,7	425,2	261,9
Mediana/Median titre (U.I.)	199,2	186,4	371,2	112,8
Valore Minimo/Minimum titre (U.I.)	20	0	0	0
Valore Massimo/Maximum titre (U.I.)	640	851,2	851,2	851,2
Percentili/Percentils	25°	66,4	28,3	83,2
	75°	425,6	320	851,2

Legenda/Legend: U.I. = Unità Internazionali; p3 -120 g = 120 giorni prima del parto del 3° ciclo riproduttivo (120 days before parturition of 3rd reproductive cycle); p3 = parto del 3° ciclo riproduttivo (parturition of 3rd reproductive cycle); p3 +30 g = 30 giorni dopo il parto del 3° ciclo riproduttivo (30 days after); p3 +90 g = 90 giorni dopo il parto del 3° ciclo riproduttivo (90 days after).

Tabella 3: Risultati della FDC: test di Friedman e contrasti tra periodi nel 2° ciclo riproduttivo.**Table 3:** CFT titers: Friedman test and contrasts within periods in the 2nd reproductive cycle.Friedman $\chi^2=32,79$ $p<0,01$ Contrasti tra periodi: Test Wilcoxon con intervalli di confidenza del Bonferroni.
Contrasts between periods: Wilcoxon test with Bonferroni's confidence intervals.

Contrasto/Contrast	p2 -120g	p2 -30g	p2	p2 +30g	p2 +120g
p2 -120g	-	ns	ns	ns	** (p2-120>p2+120)
p2 -30g	-	-	ns	ns	* (p2-30>p2+120)
p2	-	-	-	** (p2>p2+30)	** (p2>p2+120)
p2 +30g	-	-	-	-	ns
p2 +120g	-	-	-	-	-

Legenda/Legend:

ns= non significativo; ** = significativo con $p<0,01$; * = significativo con $p<0,05$;p2 -120 g = 120 giorni prima del parto del 2° ciclo riproduttivo (120 days before parturition of 2nd reproductive cycle); p2 -30 g = 30 giorni prima del parto del 2° ciclo riproduttivo (30 days before); p2 = parto del 2° ciclo riproduttivo (parturition of 2nd reproductive cycle); p2 +30 g = 30 giorni dopo il parto del 2° ciclo riproduttivo (30 days after); p2 +120 g = 120 giorni dopo il parto del 2° ciclo riproduttivo (120 days after).**Tabella 4:** Risultati della FDC: test di Friedman e contrasti tra periodi nel 3° ciclo riproduttivo.**Table 4:** CFT titers: Friedman test and contrasts within periods in the 3rd reproductive cycle.Friedman $\chi^2=12,841$ $p<0,01$

Contrasti tra periodi: Test Wilcoxon con intervalli di confidenza del Bonferroni.

Contrasts between periods: Wilcoxon test with Bonferroni's confidence intervals.

Contrasto/Contrast	p3 -120g	p3	p3 +30g	p3 +90g
p3 -120g	-	ns	* (p3 +30>p3 -120)	ns
p3	-	-	ns	ns
p3 +30g	-	-	-	* (p3 +30>p3 +90)
p3 +90g	-	-	-	-

Legenda/Legend:

ns= non significativo; ** = significativo con $p<0,01$; * = significativo con $p<0,05$;p3 -120 g = 120 giorni prima del parto del 3° ciclo riproduttivo (120 days before parturition of 3rd reproductive cycle); p3 = parto del 3° ciclo riproduttivo (parturition of 3rd reproductive cycle); p3 +30 g = 30 giorni dopo il parto del 3° ciclo riproduttivo (30 days after); p3 +90 g = 90 giorni dopo il parto del 3° ciclo riproduttivo (90 days after).**Tabella 5:** Risultati della FDC: confronto tra 2° e 3° ciclo riproduttivo tramite test di Wilcoxon.**Table 5:** Wilcoxon test comparison between 2nd and 3rd reproductive cycle.

Comparazione/Comparison	p3-120g - p2-120g	p3 - p2	p3+30g - p2+30g	p3+90g - p2+120g
Z (basato su ranghi positivi) (based on positive ranks)	-2,357	-2,412	-0,459	-0,534
p a 2 code (2-tail)	0,018	0,016	0,646	0,594

Legenda/Legend:

p2 -120 g = 120 giorni prima del parto del 2° ciclo riproduttivo (120 days before parturition of 2nd reproductive cycle); p2 = parto del 2° ciclo riproduttivo (parturition of 2nd reproductive cycle); p2 +30 g = 30 giorni dopo il parto del 2° ciclo riproduttivo (30 days after); p2 +120 g = 120 giorni dopo il parto del 2° ciclo riproduttivo (120 days after); p3 -120 g = 120 giorni prima del parto del 3° ciclo riproduttivo (120 days before parturition of 3rd reproductive cycle); p3 = parto del 3° ciclo riproduttivo (parturition of 3rd reproductive cycle); p3 +30 g = 30 giorni dopo il parto del 3° ciclo riproduttivo (30 days after); p3 +90 g = 90 giorni dopo il parto del 3° ciclo riproduttivo (90 days after).

and 4 respectively, while results of comparison with Wilcoxon test between 2nd and 3rd reproductive cycle are reported in Table 5.

Discussion

All ewes involved in the experiment, have been infected by the inoculated strain (*B. melitensis* biovar 3), as demonstrated by the number of serologically positive animals (46 out of 46). At day of parturition of the 2nd reproductive cycle, a peak in antibody production was noted (Figures 1, 2, and 3). Considering a possible drainage effect of antibody due to colostrum production, a drop in the antibody titers was expected. This drop was instead observed between 90 and 120 days after parturitions of the 2nd and the 3rd reproductive cycles (Friedman test $p<0,01$, Tables 3 and 4). Descriptive statistics (Tables 1 and 2) confirm a peak in antibody production at parturition, followed in a few months by a drop of antibody titers. The comparison of antibody titers of the 2nd reproductive cycle with those of the 3rd (table 5) shows that in the 120 days preceding parturition, parturition day included, antibody titers were significantly lower during the 3rd reproductive cycle than during the 2nd, while this difference disappeared 30 days post-partum onwards. These data suggest that there is not a drainage effect by colostrum that can hamper serologic diagnosis of brucellosis. Nevertheless, 2 years p.i., a transient decrease in antibody titers and even serological negativity were observed in a few animals. Kinetics of antibody titers during the entire experiment (Figures 1 and 2) suggests that brucellosis infection can still be revealed at flock level 3 years p.i.. Yet, when the disease has been present in a flock for a long time, serological investigation may not be able to reveal the infection of single animals. Depopulation of chronically infected flocks is, therefore, often warranted.

descrittive (Tabelle 1 e 2) confermano la presenza di un picco nella produzione di anticorpi al parto, seguito da un calo del titolo anticorpale nel giro di pochi mesi. Il confronto dei titoli anticorpali del 2° e 3° ciclo riproduttivo (tabella 5), mostra come nei 120 giorni precedenti il parto, incluso il giorno stesso del parto, i titoli fossero significativamente più bassi nel corso del 3° ciclo riproduttivo piuttosto che nel 2°, mentre questa differenza scompare dai 30 giorni post-partum in avanti. Questi dati suggeriscono che l'effetto di drenaggio di anticorpi nel colostro non sia tale da ostacolare la diagnosi sierologica di brucellosi. Tuttavia, a 2 anni p.i., in alcuni animali è stata osservata una transitoria diminuzione nei titoli anticorpali e persino negatività sierologica. In ogni caso, la cinetica dei titoli

anticorpali nel corso di tutto l'esperimento (Figure 1 e 2) suggerisce che l'infezione brucellare, a 3 anni p.i., può essere ancora svelata a livello di gregge. Pertanto, quando la malattia è presente da lungo tempo in un gregge, l'indagine sierologica può non essere in grado di svelare lo stato d'infezione di singoli animali. Per tali motivi, l'abbattimento totale dei greggi infetti in maniera cronica, è spesso ritenuto giustificato.

Ringraziamenti

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute. Gli autori ringraziano Diamante Rodomonti per la preziosa assistenza tecnica prestata.

Bibliografia/References

1. Alton G.G. (1990). - *Brucella melitensis*. In: Animal brucellosis. Nielsen K. and J.R. Duncan eds. CRC Press Inc.

Boca Raton, FL, USA. 383-409.

2. Farrell I.D. (1974). - The development of new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci.* **16**: 280-286.

3. Jacques I., V. Olivier-Bernardin & G. Dubray (1998). - Efficacy of ELISA compared to conventional test (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet. Microbiol.* **64**: 61-73.

4. Nannini, D., A. Giovannini, M. Tittarelli, E. Di Giannatale, P. Semprini, V. Caporale, D. Cerri, E. Andreani & R. Farina. (1992). - Valutazione della risposta anticorpale in pecore sperimentalmente infettate con *B. melitensis* biovariante 2. *Vet. Ital.* **28**: 4-10.

5. O.I.E. (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines. For Terrestrial Animals. Fifth edition. O.I.E., Paris. 598-601.

6. Shimi A. & A.H. Tabatabayi (1981). - Pathological, bacteriological and serological responses of ewes experimentally infected with *Brucella melitensis*. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **93**: 1411.

7. Vose D. (2000). - Risk analysis: a quantitative guide. 2nd Ed. John Wiley & sons. Chichester, 418pp.

a cura di Manuel Graziani



Giancarlo Ruffo
Legislazione Veterinaria
 (Poletto, pp. 323, € 50,00)

Dopo la laurea in giurisprudenza Giancarlo Ruffo ha applicato gli studi giuridici alla medicina veterinaria. Ha iniziato la sua carriera professionale presso l'Istituto di Medicina Legale e di Legislazione Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano, dove è stato nominato Professore Associato nel 2000. I risultati di 10 anni di lavoro sono da poco confluiti nel volume "Legislazione Veterinaria": manuale ben architettato che si pone come strumento di consultazione e di orientamento per tutti quei veterinari che hanno difficoltà di movimento nel districato terreno "di un legislatore fecondo di idee e generoso di inchiostro", secondo la colorata descrizione che ne dà l'autore stesso. Leggere e rileggere le norme ratificate dal Legislatore, prendendo in considerazione i minimi particolari (dalle parole usate al lessico della frase, dai punti alle virgole); ma

anche prestare attenzione ai testi precedentemente abrogati o modificati, interpretando i contenuti di un diritto in continua trasformazione, per poi studiarne l'applicazione in campo pratico e le difficoltà dei medici veterinari ad essa connesse: questo e molto altro consiglia Giancarlo Ruffo che, contemporaneamente, affronta il rapporto del veterinario con l'ordine professionale, le società scientifiche, le associazioni di categoria, gli enti di diritto pubblico, ecc. Insomma, il testo in questione tocca da vicino gli aspetti inerenti la responsabilità e la deontologia dei singoli professionisti, ma anche la sicurezza della struttura veterinaria, dei farmaci somministrati, della tutela e del benessere degli animali.



Alberto Contessi
Le Api -
Biologia, allevamento, prodotti
 (Edagricole, pp. 497, € 39,50)

Così scrive Giorgio Celli nella presentazione della terza edizione di questo fortunato manuale sulla biologia delle api: "Alberto Con-

tessi ha saputo fare convivere in queste pagine la sua pratica di apicoltore, e la sua vocazione di ricercatore, il suo "mestiere", e le sue conoscenze, a confezionare un'opera poliedrica, e multivalente, un manuale per capire, e per gestire la società impervia, e misteriosa, dell'alveare." Sono infatti passati una ventina di anni dalla sua pubblicazione originaria, ma "Le Api - Biologia, allevamento, prodotti" rimane un punto di riferimento nel suo genere proprio per la grande passione che ha spinto l'Autore ad un continuo aggiornamento. In questa nuova edizione è stato sensibilmente ampliato il capitolo sulla fisiologia sociale delle api, anche con la stesura di un nuovo paragrafo ad hoc sui feromoni dell'alveare e le loro funzioni. E' stato poi rivisto e corretto il capitolo sulle avversità delle api, ponendo l'accento sul rischio di introduzione di nuovi parassiti e sulle nuove tecniche di difesa dalla varroa. Infine è stata aggiornata la tabella riassuntiva delle principali leggi di interesse apistico. Una nuova edizione che si è resa necessaria proprio perchè riporta l'evoluzione delle conoscenze sulla biologia delle api. Conoscenze che nei prossimi anni potranno essere utilizzate per trasformare anche le tecniche di allevamento.