



UNIVERSITÀ DI PARMA

ANNALI
DELLA
FACOLTÀ DI MEDICINA
VETERINARIA

Vol. XXIX
2009

Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma
2009

Pubblicazione ufficiale della Facoltà di Medicina Veterinaria
dell'Università di Studi di Parma

DIRETTORE RESPONSABILE
Prof. Fausto Quintavalla

COMITATO DI DIREZIONE
Ezio Bottarelli
Sandro Cavirani
Simone Taddei
Andrea Salghetti
Giuseppe Zannetti

SEGRETERIA DI REDAZIONE
Biblioteca Generale della Facoltà di Medicina Veterinaria
dell'Università degli Studi di Parma
Via del Taglio, 8
43100 PARMA (ITALY)
Tel. +39-0521/032654/56
Fax +39-0521/032737
Responsabile: Angelo Ampollini

La pubblicazione è disponibile on-line sul sito
<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/index.htm>

I volumi degli annali possono essere chiesti in scambio da altre Università
o Istituzioni culturali rivolgendosi alla Segreteria di Redazione

INDICE

Personale docente e tecnico amministrativo della Facoltà di Medicina Veterinaria.....	pag. 7
Afferenze del personale docente ai dipartimenti e servizi della Facoltà.....	pag. 12

ANESTESIA / Anaesthesia and Immobilization

ANAESTHETIC REGIMEN IN A SHEEP EXPERIMENTAL MODEL WITH MYOCARDIAL ISCHEMIA <i>GESTIONE ANESTESIOLOGICA DI PECORE CON ISCHEMIA MIOCARDICA INDOTTA A SCOPI SPERIMENTALI</i> Leonardi Fabio, De Razza Pierangela, Simonazzi Barbara, Martini Filippo Maria, Zanichelli Stefano, Botti Paolo.....	pag. 17
---	---------

FISIOLOGIA ANIMALE / Animal Physiology

THE ROLE OF ORBITOFRONTAL CORTEX IN EMOTION-BASED DECISION MAKING AND FOOD CHOICES <i>RUOLO DELLA CORTECCIA ORBITOFRONTALE NELLE DECISIONI SU BASI EMOTIVE E NELLE SCELTE ALIMENTARI</i> Ghirri Alessia, Bignetti Enrico.....	pag. 27
---	---------

ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI / Veterinary Food Hygiene; Public Health

DOMESTIC FOOD HANDLING PRACTICES AND FOOD SAFETY <i>GESTIONE DOMESTICA DEGLI ALIMENTI E SICUREZZA ALIMENTARE</i> Conter Mauro, Pojani Linda, Cortimiglia Claudia, Di Ciccio Pierluigi, Ghidini Sergio, Zanardi Emanuela, Ianieri Adriana.....	pag. 33
PARMA HAM: A LOW RISK-FOOD FOR HUMAN TRANSMISSION OF <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> <i>IL PROSCIUTTO DI PARMA QUALE ELEMENTO A BASSO RISCHIO PER LA TRASMISSIONE ALL'UOMO DI LISTERIA MONOCYTOGENES</i> Cotugno Delia, Bonardi Silvia.....	pag. 39
IDENTIFICATION OF THE ICTHYIC SPECIES THROUGH MORPHOLOGIC AND LABORATORY METHODOLOGIES <i>IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE ITTICHE MEDIANTE METODICHE MORFOLOGICHE E DI LABORATORIO</i> Nicosia S. Dario, Sigovini Giovanni, Ianieri Adriana, Bracchi Pier Giovanni:.....	pag. 51

RESIDUES IN FOODSTUFFS

RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Signorini Giancarlo, Biagi Giulia, Luchetti Elena, Nannipieri Sandra, Marzotto Giampaolo, Roncaia Angelo.....pag. 77

MEDICINA INTERNA e TERAPIA / Internal Medicine and Therapeutics

USE OF NICARBAZINE IN THE CONTROL OF URBAN PIGEON COLONIES IN ITALY IN 1990-2007

USO DEL NICARBAZINE NEL CONTROLLO DELLE COLONIE DI PICCIONI URBANI IN ITALIA NEL 1990-2007

Ferri M, Ferraresi Maurizio, Gelati Antonio, Zannetti Giuseppe, Ubaldi Antonio, Contiero Barbara, Bursi Eleonora.....pag. 91

MUCOKYNETIC DRUGS. *IN VITRO* RHEOLOGICAL STUDY ON HORSE MUCUS

FARMACI MUCOCINETICI: ATTIVITÀ REOLOGICA IN VITRO SUL MUCO DI CAVALLO

Quintavalla Fausto, Skert Stefano, Pini Paolopag. 103

MICROBIOLOGIA / Microbiology

MOLECULAR TYPING OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* STRAINS ISOLATED FROM DOGS BY TOXIN GENE AMPLIFICATION

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ISOLATI DA CANI

Zerbini Laura, Ossiprandi Maria Cristinapag. 115

ZOOTECNIA E NUTRIZIONE ANIMALE, ECONOMIA PRODUZIONI ZOOTECNICHE / Animal Production, Agricultural Economy

PREDICTING LIVEWEIGHT FROM BODY MEASURES IN NERO DI PARMA PIGS

STIMA DEL PESO VIVO DALLE MISURE BIOMETRICHE NEL SUINO NERO DI PARMA

Beretti Valentino, Superchi Paola, Manini Raffaele, Cervi Claudio, Sabbioni Albertopag. 129

NATURAL WHEYSTARTER IN THE PARMIGIANO-REGGIANO CHEESE PRODUCTION WITH PARTICULAR REFERENCE TO THE ACIDIFICATION OF THE WHEEL IN THE EARLY HOURS AFTER THE EXTRACTION FROM THE VAT: AN OVERVIEW

IL SIERO INNESTO NELLA PRODUZIONE DEL FORMAGGIO PARMIGIANO-REGGIANO, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALLA ACIDIFICAZIONE DELLA FORMA NELLE PRIME ORE DOPO L'ESTRAZIONE DALLA CALDAIA: STATO DELL'ARTE

Formaggioni Paolo, Vecchia Paola, Summer Andrea, Franceschi Piero, Malacarne Massimo, Mariani Primopag. 141

EFFECTS OF MYCOTOXINS ON FERTILITY OF DAIRY COW <i>EFFETTI DELLE MICOTOSSINE SULLA FERTILITÀ DELLA VACCA DA LATTE</i> Rossi Federico, Righi Federico, Fuochi Sara, Quarantelli Afro.....	pag. 153
PIG FARMING AND BUSINESS STRATEGIES <i>ALLEVAMENTI SUINI E STRATEGIE D'IMPRESA</i> Salghetti Andrea, Ferri Giovanni, Dolfini Enrica	pag. 167
ECONOMIC SURVEY OF RACEHORSE BREEDING FARMS <i>INDAGINE ECONOMICA SUGLI ALLEVAMENTI EQUINI DA COMPETIZIONE</i> Salghetti Andrea, Ferri Giovanni, Gambino Pietro.....	pag. 193
THE INFLUENCE OF ARAB GENES IN THE BARDIGIANO HORSE BREED <i>INFLUENZA DEL SANGUE ARABO NELLA RAZZA EQUINA BARDIGIANA</i> Vaccari Simonini Franca, Sabbioni Alberto, Beretti Valentino, Villa Marcello, Martuzzi Francesca	pag. 223

**PERSONALE DOCENTE E TECNICO AMMINISTRATIVO
DELLA FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**
*TEACHER, ADMINISTRATIVE AND TECHNICAL STAFF OF THE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE*

Presidenza Facoltà

Sig.ra BERTOLI Barbara	Personale non docente
Dott.ssa MIDURI Francesca	Personale non docente
Sig.ra ROSSETTI Elisa	Personale non docente

Servizio Segreteria Studenti

Sig.ra GROSSARDI Cristina	Personale non docente
Sig. TRINITATO Palmerino	Personale non docente

Servizio Biblioteca

Rag. AMPOLLINI Angelo	Personale non docente
Dott.ssa OLIVIERI Giovanna	Personale non docente
Dott.ssa SORENTI Mariangela	
Personale non docente	

Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti

PERSONALE NON DOCENTE

Sig.ra AMPOLLINI Costanza	Personale non docente
Sig.ra BELLOLI Cinzia	Personale non docente
Sig.ra BRANCA Giulia	Personale non docente
Sig.ra CAMPESATO Elisabetta	Personale non docente
Dott.ssa CAVALLI Valeria	Personale non docente
Sig.ra CONTI Virna	Personale non docente
Sig. DAMASCHI Cesare	Personale non docente
Dott.ssa DRAMIS Maria	Personale non docente
Sig. FAROLDI Luigi	Personale non docente
Dott. FORMAGGIONI Paolo	Personale non docente
Rag. NINIMOSI Clara	Personale non docente
Dott. RENZI Marco	Personale non docente
Sig.ra TRANCOSSI Mariangela	Personale non docente
Dott. ZAMBINI Ernesto Mario	Personale non docente

Sezione di Biochimica Veterinaria

Prof. GROLLI Stefano	Ricercatore Universitario
Prof. RAMONI Roberto	Professore Associato

Sezione di Fisiologia Veterinaria

Prof.ssa BASINI Giuseppina	Professore associato
Prof.ssa GRASSELLI Francesca	Professore Associato
Prof.ssa SALERI Roberta	Ricercatore Universitario

Sezione di Informatica e Biomatematica

Prof. BRACCHI Giovanni	Professore Associato
------------------------	----------------------

Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione

Prof. QUARANTELLI Afro	Professore Ordinario
Prof. RIGHI Federico	Ricercatore Universitario
Prof.ssa SUPERCHI Paola	Professore Ordinario

Sezione di Scienze e Tecnologie Lattiero Casearie

Prof. MARIANI Primo	Professore Ordinario
Prof. SUMMER Andrea	Professore Associato

Sezione di Scienze Zootecniche e Qualità delle Produzioni Animali

Prof. CATALANO Antonio Lucio	Professore Ordinario
Prof.ssa MARTUZZI Francesca	Professore Associato
Prof. SABBIONI Alberto	Professore Associato

Sezione di Sicurezza degli Alimenti

Prof. GHIDINI Sergio	Ricercatore Universitario
Prof.ssa IANIERI Adriana	Professore Ordinario
Prof.ssa ZANARDI Emanuela	Ricercatore Universitario

Dipartimento di Salute Animale

PERSONALE NON DOCENTE

Sig. ALBA Giuliano	Personale non docente
Rag. BALESTRIERI Alberta	Personale non docente
Sig. BERTACCINI Giuseppe	Personale non docente
Rag. CANTARELLI Giovanna	Personale non docente
Sig.ra CATTABIANI Chiara	Personale non docente
Sig. CONTARDO Claudio	Personale non docente
Dott. BONATI Luca	Personale non docente
Dott.ssa DE ANGELIS Elena	Personale non docente
Dott. DODI Pier Luigi	Personale non docente
Sig. FERRARI Ivano	Personale non docente
Dott. FERRI Giovanni	Personale non docente
Dott.ssa FUSARI Antonella	Personale non docente
Sig. GALIA Giordano	Personale non docente
Sig.ra GIANELLI Paola	Personale non docente
Sig. LONETI Vannes	Personale non docente
Sig. LURISI Roberto	Personale non docente
Dott.ssa MANGHI Elisa	Personale non docente
Sig.ra MANTELLI Federica	Personale non docente
Sig. ROSSI Andrea	Personale non docente
Rag. ROSSIANO Cristina	Personale non docente
Sig. PACCHIANI Andrea	Personale non docente
Dott.ssa PIZZIN Gisella	Personale non docente
Sig. POLI Ida	Personale non docente
Dott.ssa REVERBERI Cinzia	Personale non docente
Sig. RUSTICI Mirco	Personale non docente
Dott.ssa SCHIANO Emiliana	Personale non docente
Dott. SERVENTI Paolo	Personale non docente
Sig.ra TRENTADUE Giuseppina	Personale non docente

Sezione di Anatomia degli Animali di Interesse Medico Veterinario

Prof.ssa BO Luisa	Professore Associato
Prof.ssa BOTTI Maddalena	Ricercatore Universitario
Prof. CACCHIOLI Antonio	Ricercatore Universitario
Prof. GAZZA Ferdinando	Professore Associato
Prof. PANU Rino	Professore Ordinario
Prof.ssa RAGIONIERI Luisa	Ricercatore Universitario

Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina D'Urgenza

Prof. BOTTI Paolo	Professore Ordinario
Prof. DEL BUE Maurizio	Professore Ordinario
Prof. MARTINI Filippo Maria	Professore Associato
Prof.ssa SIMONAZZI Barbara	Ricercatore Universitario
Prof. ZANICHELLI Stefano	Professore Ordinario

Sezione di Clinica Medica Veterinaria

Prof. BIANCHI Ezio	Ricercatore Universitario
Prof. DONDI Maurizio	Professore Associato
Prof. MARTELLI Paolo	Professore Ordinario
Prof.ssa QUINTAVALLA Cecilia	Professore Associato
Prof. QUINTAVALLA Fausto	Professore Ordinario
Prof. ZANNETTI Giuseppe	Professore Ordinario

Sezione di Clinica Ostetrica e Riproduzione Animale

Prof. BIGLIARDI Enrico	Professore Associato
Prof. MORINI Giorgio	Ricercatore Universitario
Prof. PARMIGIANI Enrico	Professore Ordinario

Sezione di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale

Prof. UBALDI Antonio	Professore Ordinario
----------------------	----------------------

Sezione di Endocrinologia e Farmacologia Veterinaria

Prof. BERTINI Simone	Professore Associato
Prof. DE RENSIS Fabio	Professore Ordinario
Prof. MENOZZI Alessandro	Ricercatore Universitario

Sezione di Microbiologia ed Immunologia Veterinaria

Prof. BOTTARELLI Ezio	Professore Ordinario
Prof.ssa OSSIPRANDI Maria Cristina	Professore Associato

Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica

Prof. BORGHETTI Paolo	Professore Ordinario
Prof.ssa CANTONI Anna Maria	Professore Associato
Prof. CORRADI Attilio	Professore Ordinario
Prof.ssa DI LECCE Rosanna	Ricercatore Universitario
Prof.ssa PASSERI Benedetta	Ricercatore Universitario

Sezione di Risorse del Territorio

Prof. BONAZZI Giuseppe	Professore Associato
Prof. SALGHETTI Andrea	Professore Associato

Sezione Ispezione degli Alimenti di Origine Animale

Prof. BENTLEY Stefano	Ricercatore Universitario
Prof.ssa BONARDI Silvia	Professore Associato
Prof. BRINDANI Franco	Professore Ordinario

Sezione Malattie Infettive degli Animali

Prof.ssa CABASSI Clotilde Silvia	Professore Associato
Prof. CAVIRANI Sandro	Professore Ordinario
Prof. DONOFRIO Gaetano	Professore Associato
Prof. FLAMMINI Cesidio Filippo	Professore Ordinario
Prof. TADDEI Simone	Ricercatore Universitario

Sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie

Prof. GRANDI Giulio	Ricercatore Universitario
Prof.ssa KRAMER Laura Helen	Professore Associato

**AFFERENZE DEL PERSONALE DOCENTE AI
DIPARTIMENTI E SERVIZI DELLA FACOLTÀ**
*TEACHER AFFERENCES FACULTY DEPARTMENTS AND
FACULTY SERVICES*

Presidenza

www.unipr.it/Facoltà/Veterinaria
Via del Taglio, 8 – 43100 Parma
Tel. Presidenza 0521.032600 – 032601
Fax 0521.032602
E-mail: vetpres@unipr.it
Preside: Prof. CORRADI Emilio

Biblioteca Generale

Tel. 0521.032656 – Fax 0521.032737
E-mail: bibvet@unipr.it
Direttore: Prof. QUINTAVALLA Fausto

Segreteria Studenti

Tel. 0521.032604–05–06 –Fax. 0521.032606

Dipartimento di Salute Animale

Tel. 0521.032641 – Fax 0521.032642
E-mail: dipsa@unipr.it
Direttore . Prof. Cavirani Sandro

***Sezione di anatomia degli animali di**

Interesse Medico Veterinario

Tel.0521.032641 – Fax. 0521.032642
E-mail:animdome@unipr.it
Coordinatore: Prof. PANU Rino

Docenti:

Prof.ssa BO Luisa
Tel. 0521.032637
E-mail: luisa.bo@unipr.it
Prof. GAZZA Ferdinando
Tel. 0521.032641 – 0521.032631
E-mail: ferdinando.gazza@unipr.it
Prof. PANU Rino
Tel. 0521.032647
E-mail: rino.panu@unipr.it

Ricercatori:

Dott. CACCHIOLI Antonio
Tel. 0521.032648
E-mail: antonio.cacchioni@unipr.it
Dott.ssa RAGIONIERI Luisa
Tel. 0521.032641 – 0521.032639

E-mail: luisa.ragionieri@unipr.it

***Sezione di Patologia Generale e
Anatomia Patologica**

Tel. 0521.032731 – Fax 0521.032732
E-mail: apvet@unipr.it

Coordinatore: Prof. CORRADI Attilio

Docenti:

Prof. BORGHETTI Paolo
Tel. 0521.032725
E-mail: paolo.borghetti@unipr.it
Prof.ssa CANTONI Annamaria
Tel. 0521.032726
E-mail: annamaria.cantoni@unipr.it
Prof. CORRADI Attilio
Tel. 0521.032725
E-mail: attilio.corradi@unipr.it

Ricercatori:

Dott.ssa DI LECCE Rosanna
Tel. 0521.032726
E-mail: rosanna.dilecce@unipr.it
Dott.ssa PASSERI Benedetta
Tel. 0521.032726
E-mail: benedetta.passeri@unipr.it

***Sezione di Clinica Chirurgica
Veterinaria e Medicina d’Urgenza**

Tel. 0521.032781 – Fax 0521.032782
E-mail: chirvet@unipr.it

Coordinatore: Prof. BOTTI Paolo

Docenti:

Prof. BOTTI Paolo
E-mail: paolo.botti@unipr.it
Tel. 0521.032796
Prof. DEL BUE Maurizio
E-mail: maurizio.delbue@unipr.it
Tel. 0521.032780
Prof. ZANICHELLI Stefano
E-mail: stefano.zanichelli@unipr.it
Tel. 0521.032786
Prof. MARTINI Filippo Maria
E-mail: filippomaria.martini@unipr.it

Tel. 0521.032785

Ricercatori:

Dott.ssa SIMONAZZI Barbara

E-mail: barbara.simonazzi@unipr.it

Tel. 0521.032781

***Sezione di Clinica Medica Veterinaria**

Tel. 0521.032691 – Fax 0521.032692

Coordinatore: Prof. ZANNETTI Giuseppe

E-mail: giuseppe.zannetti@unipr.it

Docenti:

Prof. DONDI Maurizio

Tel. 0521.032696

E-mail: maurizio.dondi@unipr.it

Prof. MARTELLI Paolo

Tel. 0521.032689

E-mail: paolo.martelli@unipr.it

Prof.ssa QUINTAVALLA Cecilia

Tel. 0521.032694

E-mail: cecilia.quintavalla@unipr.it

Prof. QUINTAVALLA Fausto

Tel. 0521.032688

E-mail: fausto.quintavalla@unipr.it

Prof. ZANNETTI Giuseppe

Tel. 0521.032687

E-mail: giuseppe.zannetti@unipr.it

Ricercatori:

Dott. BIANCHI Ezio

Tel. 0521.032696

E-mail: ezio.bianchi@unipr.it

***Sezione di Clinica Ostetrica e**

Riproduzione Animale

Tel. 0521.032661 – Fax. 0521.032662

Coordinatore: Prof. PARMIGIANI Enrico

Docenti:

Prof. PARMIGIANI Enrico

Tel. 0521.032660

E-mail: enrico.parmigiani@unipr.it

Prof. BIGLIARDI Enrico

Tel. 0521.032663

E-mail: enrico.bigliardi@unipr.it

Ricercatori:

Dott. MORINI Giorgio

Tel. 0521.032674

E-mail: giorgio.morini@unipr.it

***Sezione di Diagnostica e Tossicologia
Sperimentale**

Tel. 0521.032765 – Fax. 0521.032772

Coordinatore: Prof. UBALDI Antonio

Docente:

Prof. UBALDI Antonio

Tel. 0521.032763

E-mail: antonio.ubaldi@unipr.it

***Sezione di Endocrinologia e
Farmacologia Veterinaria**

Tel. 0521.032608 – Fax. 0521.032800

Coordinatore: Prof. DE RENSIS Fabio

Docenti:

Prof. BERTINI Simone

Tel. 0521.032608

E-mail: simone.bertini@unipr.it

Prof. DE RENSIS Fabio

Tel. 0521.032608

E-mail : fabio.derensis@unipr.it

Ricercatori :

Dott. MENOZZI Alessandro

Tel. 0521.032797

E-mail: alessandro.menozzi@unipr.it

***Sezione di Ispezione degli Alimenti di
Origine Animale**

Tel. 0521.032741 – Fax. 0521.032742

Coordinatore: Prof. BRINDANI Franco

Tel. 0521.032743

Docente:

Prof. BRINDANI Franco

Tel. 0521.032743

E-mail: franco.brindani@unipr.it

Prof.ssa BONARDI Silvia

Tel. 0521.032744

E-mail: silvia.bonardi@unipr.it

Ricercatori:

Dott. BENTLEY Stefano

Tel. 0521.032745

E-mail: stefano.bentley@unipr.it

***Sezione di Malattie Infettive degli Animali**

Tel. 0521.032671 – Fax. 0521.032672

E-mail: malinvet@unipr.it

Coordinatore: Prof. CAVIRANI Sandro

Tel. 0521.032743

Docenti:

Prof. CAVIRANI Sandro

Tel. 0521.032667

E-mail: sandro.cavirani@unipr.it
Prof. FLAMMINI Cesidio Filippo
Tel. 0521.032680
E-mail: cesidiofilippo.flamini@unipr.it
Prof. CABASSI Clotilde Silvia
Tel. 0521.032669
E-mail: silvia.cabassi@unipr.it
Prof. DONOFRIO Gaetano
Tel. 0521.032669
E-mail: gaetano.donofrio@unipr.it

Ricercatori:

Dott. TADDEI Simone
Tel. 0521.032671
E-mail: simone.taddei@unipr.it

***Sezione di Microbiologia e Immunologia
Veterinaria**

Tel. 0521.032721 – Fax. 0521.032721
Coordinatore: Prof. BOTTARELLI Ezio
Docenti:
Prof. BOTTARELLI Ezio
Tel. 0521.032719
E-mail: ezio.bottarelli@unipr.it
Prof.ssa OSSIPRANDI M. Cristina
Tel. 0521.032718
E-mail: mariacristina.ossiprandi@unipr.it

***Sezione di Radiologia e Diagnostica per
Immagini**

Tel. 0521.032791 – Fax. 0521.032792
Coordinatore: Prof. BERTONI Giorgio
Docenti:
Prof. BERTONI Giorgio
Tel. 0521.032703
E-mail: giorgio.bertoni@unipr.it
Prof. GNUDI Giacomo
Tel. 0521.032789
E-mail: giacomo.gnudi@unipr.it

***Sezione di Risorse del Territorio**

Tel. 0521.032709 – Fax. 0521.032708
Coordinatore: Prof. SALGHETTI Andrea
Docenti:
Prof. SALGHETTI Andrea
Tel. 0521.032713
E-mail: andrea.salghetti@unipr.it
Prof. BONAZZI Giuseppe
Tel. 0521.032707
E-mail: giuseppe.bonazzi@unipr.it

**Dipartimento di Produzioni Animali,
Biotecnologie Veterinarie, Qualità e**

Sicurezza degli Alimenti

Tel. 0521.032607 – Fax. 0521.032752
E-mail: dipabqsa@unipr.it
Direttore: Prof. QUARANTELLI Afro

***Sezione di Biochimica Veterinaria**

Tel. 0521.032768 – Fax. 0521.032772
E-mail: vetbioc@unipr.it

Coordinatore: Prof. RAMONI Roberto
Docenti:

Prof. RAMONI Roberto
Tel. 0521.032767
E-mail: roberto.ramoni@unipr.it

Ricercatori:

Dott. GROLLI Stefano
Tel. 0521.032767
E-mail: stefano.grolli@unipr.it

***Sezione di Parassitologia e Malattie
parassitarie degli animali domestici**

Tel. 0521.032715
Docente:
Prof. KRAMER Laura Helen
Tel. 0521.032715
E-mail: laurahelen.kramer@unipr.it

Ricercatori:

Dott. GRANDI Giulio
Tel. 0521.032776
E-mail: giulio.grandi@unipr.it

***Sezione di Fisiologia Veterinaria**

Tel. 0521.032771 – Fax. 0521.032770
E-mail: vetfisisio@unipr.it

Coordinatore: Prof. GRASSELLI
Francesca

Docenti:

Prof. GRASSELLI Francesca
Tel. 0521.032773
E-mail: francesca.grasselli@unipr.it

Prof. BASINI Giuseppina

Tel. 0521.032775
E-mail: giuseppina.basini@unipr.it

Ricercatori:

Dott.ssa SALERI Roberta
Tel. 0521.032774
E-mail: roberta.saleri@unipr.it

***Sezione di Informatica e Biomatematica**

Tel. 0521.032714 – Fax. 0521.032715
Coordinatore: Prof. BRACCHI Pier
Giovanni

Docenti:

Prof. BRACCHI Pier Giovanni
Tel. 0521.032716
E-mail: piergiovanni.bracchi@unipr.it

***Sezione di Sicurezza degli Alimenti**

Tel. 0521.032751 – Fax. 0521.032752
E-mail: ispalim2@unipr.it
Coordinatore: Prof.ssa IANIERI Adriana

Docenti:

Prof.ssa IANIERI Adriana
Tel. 0521.032750
E-mail: adriana.ianieri@unipr.it

Ricercatori:

Prof. GHIDINI Sergio
Tel. 0521.032761
E-mail: sergio.ghidini@unipr.it
Dott.ssa ZANARDI Emanuela
Tel. 0521.032761
E-mail: emanuela.zanardi@unipr.it

***Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione**

Tel. 0521.032621 – Fax. 0521.032622
E-mail: zootec@unipr.it
Coordinatore: Prof. QUARANTELLI Afro

Docenti:

Prof. QUARANTELLI Afro
Tel. 0521.032624
E-mail: afro.quarantelli@unipr.it
Prof.ssa SUPERCHI Paola
Tel. 0521.032618
E-mail: paola.superchi@unipr.it

Ricercatori:

Dott. RIGHI Federico
Tel. 0521.032624
E-mail: federico.righi@unipr.it

***Sezione di Scienza e Tecnologie Lattiero Casearie**

Coordinatore: Prof. MARIANI Primo
Tel. 0521.032614
E-mail: primo.mariani@unipr.it

Docenti:

Prof. SUMMER Andrea
Tel. 0521.032613
E-mail: andrea.summer@unipr.it

***Sezione di Scienze Zootecniche e Qualità delle Produzioni Animali**

Tel. 0521.032621 – Fax. 0521.032611
E-mail: zootec@unipr.it

Coordinatore: Prof. CATALANO Antonio Lucio

Docenti:

Prof. CATALANO Antonio Lucio
Tel. 0521.032617
E-mail: antoniolucio.catalano@unipr.it
Prof.ssa MARTUZZI Francesca
Tel. 0521.032616
E-mail: francesca.martuzzi@unipr.it
Prof. SABBIONI Alberto
Tel. 0521.032625
E-mail: alberto.sabbioni@unipr.it

Scuole di Specializzazione**Ispezione degli Alimenti di Origine Animale**

Direttore: Prof. BRINDANI Franco
- Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale
Tel. 0521.032743

Patologia suina (triennale)

Direttore: Prof. CORRADI Attilio
- Sezione di Patologia Generale e Anatomia patologica
Tel. 0521.032730

Sanita' Animale. Allevamento e produzioni Zootecniche (triennale)

Direttore: Prof.ssa. OSSIPRANDI Maria Cristina
- Sezione di Microbiologia ed Immunologia Veterinaria
Tel. 0521.032718

ANAESTHETIC REGIMEN IN A SHEEP EXPERIMENTAL MODEL WITH MYOCARDIAL ISCHEMIA

GESTIONE ANESTESIOLOGICA DI PECORE CON ISCHEMIA MIOCARDICA INDOTTA A SCOPI SPERIMENTALI

LEONARDI Fabio¹, DE RAZZA Pierangela², SIMONAZZI Barbara¹, MARTINI Filippo Maria¹, ZANICHELLI Stefano¹, BOTTI Paolo¹

Structured summary

Objectives To evaluate an anaesthetic regimen in sheep with induced myocardial ischemia.

Methods A In five sheep, two left thoracotomies were performed to induce a chronic myocardial ischemia and after 45 days to inject myoblasts into the infarct area. The same anaesthetic management was used: premedication by diazepam, induction by propofol, maintenance by isoflurane using a mechanical ventilator. Analgesia was ensured by flunixin meglumine, intercostal nerves blocks with bupivacaine, fentanyl in bolus and buprenorphine. Heart and respiratory rates, body temperature, end tidal CO₂ (EtCO₂), diastolic, systolic and mean arterial blood pressures were recorded at different times.

Results Five minutes after induction and at the end of surgery, EtCO₂ was significantly higher during the second thoracotomy. Body temperature significantly decreased ten minutes after entering the pleural cavity and at the end of surgery. At the end of surgery, body temperature was lower after the second thoracotomy.

Clinical significance The multimodal analgesia employed in this study resulted effective. Fentanyl and buprenorphine produced little effects upon cardiovascular system. Mechanical ventilation opposed pulmonary atelectasis, but this alveolar recruitment was not sustained over time and re-formation of atelectasis cannot be excluded producing a mild hypercapnia. Hypothermia is probably due to the surgical procedures.

Keywords

Anaesthesia, thoracotomy, myocardial ischemia, sheep.

INTRODUCTION

The sheep has proved useful as an experimental animal model for cardiovascular research because its circulatory and respiratory characteristics are similar to those of human beings (Gross 1994a).

Ischemic damages routinely occur in a lot of clinical situations such as vascular or neurosurgery. It is possible to encounter ischemic injuries, as after a transient myocardial ischemia during a stressful anaesthetic induction (Schlack *et al.*

1 Animal Health Department, University of Parma, via del Taglio n. 8, 43126 Parma, Italy;

2 Veterinary practitioner, PhD

2004). Also surgical procedures may exert an influence over cardiac and respiratory functions. Thoracotomy favours formation of atelectasis and right-to-left shunting (Kronen *et al.* 2005).

The goal of an anaesthetic regimen is to maintain an adequate cardiocirculatory and respiratory function. The anaesthetic management of a patient with cardiovascular dysfunction can be very challenging, since most preanesthetic and anaesthetic agents capable of central nervous system depression are also capable of producing cardiovascular and respiratory depression. Diazepam and the Benzodiazepines are commonly used in sheep. Diazepam induces taming effects in animals probably by affecting neurotransmitter system (Gross 1994b). It is used because of its minimal and dose dependent effects on cardiovascular system and because of its antiarrhythmic effects (Conklin *et al.* 1980; Gross 1994b; Lumb and Jones 1996b; Celly *et al.* 1997). Propofol is injected as a single bolus for induction of general anaesthesia to allow tracheal intubation. Propofol ensures a smooth induction, produces an increase in heart rate and mean aortic pressure, a decrease of hepatic and renal blood flow while cardiac output does not change (Runciman *et al.* 1990; Booke *et al.* 1996; Mather *et al.* 2004). If it is injected rapidly apnoea may occur, but slow administration may be able to prevent this complication (Riebold 1996). Performing a thoracotomy, respiratory function must be supported by mechanical ventilation and general anaesthesia can be maintained by inhalation anaesthetics (Riebold 1996). Isoflurane is preferred because it ensures a good cardiac stability even if it induces dose-dependent respiratory depression. For its analgesic properties, fentanyl is often used as a part of a balanced anaesthetic protocol for cardiac surgery in animals, but it leads to respiratory depression (Kronen *et al.* 2005). Fentanyl reduces the hemodynamic adverse effects of propofol (Booke *et al.* 1996), does not change cardiac output, mean aortic pressure and heart rate, but it decreases renal blood flow (Yaster *et al.* 1989).

The aim of our study is to evaluate the influence of an anaesthetic regimen on the cardiovascular and respiratory function in sheep with surgical induced myocardial ischemia.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in accordance with local animal welfare laws (Legislative Decree 116/92 and Regional Decree 020/2002 of Region Emilia Romagna, Italy).

Five female Sardinian sheep, two years old, weighing 49.6 ± 0.89 kg were anaesthetized to perform a left thoracotomy two times at a distance of forty-five days: the first one (phase A) to induce a chronic myocardial ischemia and the second one (phase B) to inject skeletal autologous myoblasts into the infarct area. The same anaesthetic management was used in both phases. All animals were classified as ASA 1 or 2 on the basis of physical examination, electrocardiogram (ECG) and haematological parameters. The animals were fasted for 12 hours prior to anaesthesia, but access to water was allowed at all times. A physical restraint was necessary to perform the premedication with diazepam (Diazepam 0.5%, Gellini, Aprilia, Italy) 0.5 mg/kg into the right cephalic vein through a 45 mm, 16-gauge plastic cannula secured with a strap. Induction was carried out with propofol (Rapinovet, Schering-

Plough Animal Health, Harefield, UK) 3 mg/kg I/V. The trachea was intubated with a direct visualization using a laryngoscope MacIntosh blade number 5. To facilitate the intubation, an assistant stabilized the larynx externally with the forefinger and thumb until the orotracheal probe was passed through the larynx into the trachea. After the placement of a Magill orotracheal tube (diameter 9 mm), the trachea was sealed by inflating the cuff with 10-12 ml of air. Anaesthesia was maintained with 1.5-2% isoflurane (Isoflurane, Schering-Plough Animal Health, Harefield, Uxbridge, UK) in oxygen (5 l/min) by a semi-closed circle system. One dose of atracurium besilate (Tracrium, GlaxoSmithKline, Stockley Park West, UK) 0.5 mg/kg I/V was administered after intubation. The level of neuromuscular blockage was monitored checking the presence or absence of spontaneous respiratory activity using the monitor PM8050 (Drager Italia, Corsico, Italy) (Lachin 2005). No neuromuscular blockage antagonist was used. The animals were ventilated immediately after the administration of atracurium until the end of surgery. Intermittent positive pressure ventilation (IPPV) was used (ventilator Fabius, Drager Italia, Corsico, Italy) with inspiratory pressure 20-25 cm H₂O, respiratory rate 15 breaths per minute (brpm), tidal volume 10-14 ml/kg, inspiratory-expiratory ratio 1:2, positive end-expiratory pressure (PEEP) 3-12 cm H₂O. Fluid intake was carried out with lactate Ringer's solution (Ringer lactate, ACME, Milan, Italy) at a dosage of 8-10 ml/kg/h. To reduce the risk of ventricular fibrillation, lidocaine chlorhydrate 2% (Lidocaina 2%, Fort Dodge Animal Health, Aprilia, Italy) was administered at a dosage ranging between 0.4-0.8 mg/kg I/V before the coronary ligation (Chachques *et al.* 2004). Analgesia was ensured by flunixin meglumine (Niglumine, Bio 98, Milan, Italy) 1 mg/kg preoperatively I/V, by intercostal nerves blocks at intercostal spaces 3-7 on the left side with bupivacaine (Bupicain, Recordati, Milan, Italy) 1 mg/kg 30 minutes before the surgical procedures, by fentanyl (Fentanest, Pharmacia Italia, Nerviano, Italy) 2 µg/kg I/V in bolus 5 minutes before entering the pleural cavity and by buprenorphine (Temgesic, Schering-Plough Animal Health, Harefield, UK) 10 µg/kg I/M at the end of surgery. At the end of anaesthesia, intravenous infusion of lactate Ringer's solution was decreased to 5 ml/kg/h and was continued until the animals were able to stand.

Postoperative management consisted of cefazolin (Cefazolina, Merck, Frankfurter, Germany) at 20 mg/kg I/M and flunixin meglumine 1 mg/kg I/M every 12 hours over 5 days.

Monitoring consisted of ECG, oesophageal temperature (T°C), respiratory (RR) and heart rates (HR) before surgery (B), 5 minutes after premedication (P), 5 minutes after induction and intubation (I), 10 minutes after entering the pleural cavity (T) and at the end of surgery and anaesthesia (E). We recorded end tidal CO₂ (EtCO₂), partial saturation of hemoglobin (SpO₂) and systolic (SAP), diastolic (DAP) and mean (MAP) arterial blood pressure by a non-invasive system 5 minutes after induction and intubation (I), 10 minutes after entering the pleural cavity (T) and at the end of surgery and anaesthesia (E). Cardiac and hemodynamic data and oesophageal temperature were recorded by the monitor Guardian Byosis (Schiller, Esaote, Genova, Italy) while respiratory parameters were recorded by the monitor PM8050.

The degree of left ventricular damage in phase A was evaluated through the plasma concentration of cardiac troponin I (cTnI) by Access Accu TnI Immunoassay

System (Beckman Coulter, Milan, Italy). cTnI was assessed before surgery and 24 hours after surgery.

Results are reported as mean \pm SD. Student *t* test was used to compare the data; the significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

A minimal physical restraint was necessary during the premedication and the induction. The induction of general anaesthesia by intravenous administration of propofol was rapid and smooth. Intubation did not create any difficulty because movements of the tube were easily felt through the skin and its placement could be readily identified. No case of regurgitation or tympany was recorded.

The mean time of anaesthesia was significantly ($p < 0.05$) longer in phase B (86 ± 18 minutes) than in phase A (54 ± 13 minutes).

Phase A (table 1). Body temperature significantly ($p < 0.05$) decreased 10 minutes after entering the pleural cavity and at the end of surgery. No ECG change was recorded. No significant differences were recorded about other data. The serum levels of cTnI before surgery was 0.06 ± 0.03 ng/ml while 24 hours after coronary ligation was 16.93 ± 9.21 ng/ml.

Table 1: Data recorded in phase A: values are expressed as mean \pm SD ($p < 0.05$).

	Ba	Pb	Ic	Td	Ee
HR (bpm)f	134 \pm 19	116 \pm 35	121 \pm 10	117 \pm 14	117 \pm 23
RR (brpm)g	34 \pm 3	44 \pm 16	15 (IPPV)	15 (IPPV)	15 (IPPV)
T°C (°C)h	38.9 \pm 0.1	38.8 \pm 0.2	38.3 \pm 0.6	37.6 \pm 0.9	37.0 \pm 0.4
EtCO₂ (mmHg)	NT	NT	38 \pm 3	35 \pm 6	34 \pm 4
SpO₂ (%)	NT	NT	97 \pm 2	96 \pm 2	97 \pm 3
SAP (mmHg)i	NT	NT	93 \pm 32	114 \pm 11	113 \pm 19
DAP (mmHg)l	NT	NT	54 \pm 32	70 \pm 9	72 \pm 9
MAP (mmHg)m	NT	NT	68 \pm 31	89 \pm 11	92 \pm 8

a before surgery; b five minutes after premedication; c five minutes after induction and intubation; d ten minutes after entering the pleural cavity; e the end of surgery and anaesthesia; f heart rate (bpm, beats per minute); g respiratory rate (brpm, breaths per minute); h oesophageal temperature ($^{\circ}$ C, centigrade degrees); i systolic arterial blood pressure; l diastolic arterial blood pressure; m mean arterial blood pressure.

Phase B (table 2). An ischemic injury was macroscopically observed in all five animals. Respiratory rate significantly ($p < 0.05$) decreased 5 minutes after the premedication. 5 minutes after induction and at the end of surgery, EtCO₂ was significantly ($p < 0.05$) higher than the same times in phase A. Body temperature significantly ($p < 0.05$) decreased 5 minutes after induction, after entering the pleural cavity and at the end of surgery. At the end of surgery, body temperature was significantly ($p < 0.05$) lower than the same time in phase A.

No ECG change was recorded. No significant differences were recorded about other data.

Table 2: Data recorded in phase B: values are expressed as mean \pm SD ($p < 0.05$).

	Ba	Pb	Ic	Td	Ee
HR (bpm)f	131 \pm 35	127 \pm 34	124 \pm 16	107 \pm 16	117 \pm 23
RR (brpm)g	40 \pm 13	30 \pm 13	15 (IPPV)	15 (IPPV)	15 (IPPV)
T°C (°C)h	38.9 \pm 0.3	38.8 \pm 0.4	37.8 \pm 0.2	37 \pm 0.1	36.4 \pm 0.4
EtCO₂ (mmHg)	NT	NT	45 \pm 4	36 \pm 6	51 \pm 12
SpO₂ (%)	NT	NT	97 \pm 2	96 \pm 1	95 \pm 2
SAP (mmHg)i	NT	NT	107 \pm 30	110 \pm 20	124 \pm 26
DAP (mmHg)l	NT	NT	61 \pm 31	53 \pm 24	68 \pm 28
MAP (mmHg)m	NT	NT	81 \pm 35	84 \pm 23	94 \pm 43

a before surgery; b five minutes after premedication; c five minutes after induction and intubation; d ten minutes after entering the pleural cavity; e the end of surgery and anaesthesia; f heart rate (bpm, beats per minute); g respiratory rate (brpm, breaths per minute); h oesophageal temperature (°C, centigrade degrees); i systolic arterial blood pressure; l diastolic arterial blood pressure; m mean arterial blood pressure.

DISCUSSION

The sheep anesthetized in phase A were healthy animals in which an acute myocardial ischemic damage was induced. Serum level of cTnI is useful to check the presence of myocardial ischemic injury. Likewise in human beings, also in sheep the serum level of cTnI is suitable to emphasize the myocardial ischemic injury (Chachques *et al.* 2004). In this study, the serum levels of cTnI before surgery was 0.06 ± 0.03 ng/ml while 24 hours after coronary ligation it increased at 16.93 ± 9.21 ng/ml, confirming the myocardial ischemic injury. Consequently, the same subjects anesthetized in phase B showed a chronic myocardial injury.

Goals of an anaesthetic regimen for cardiac surgery are hypnosis, hemodynamic stability, neurohumoral stress ablation and analgesia. The first step is to ensure an adequate preoperative fast in order to prevent tympany and regurgitation. The sheep must be fasted from 12 h (Lumb and Jones 1996a) to 18 h (Mudrovici *et al.* 1989) before surgery. In this study, the sheep were fasted 12 hours before surgery and no case of tympany or regurgitation was recorded. These data pointed out that 12 hours of preoperative fast are enough to prevent tympany and regurgitation.

This anaesthetic regimen was chosen in order to prevent excessive insult to the cardiovascular system. Our data about arterial pressure and heart rate (HR) point out that diazepam, propofol, isoflurane and fentanyl may be employed satisfactorily. In fact, they are similar to those previously reported: according to Riebold (1996), in anesthetized sheep mean arterial pressure (MAP) of at least 75 mmHg or systolic arterial pressure (SAP) of 100 mmHg and diastolic arterial pressure (DAP) of 60 mmHg should be maintained while normal heart rate is 90-130 bpm.

Diazepam has been used in sheep and goats apparently without marked adverse effects (Coulson *et al.* 1989) even if it is reported that the carrier base for diazepam (propylene glycol) may induce pulmonary hypertension (Quinn *et al.* 1990). The changes in heart rate, body temperature and ventilation after diazepam

injection are not significant even if we recorded a decrease in respiratory rate in phase B. Probably it reflects the separation anxiety reduced by the diazepam. In fact, after the administration of diazepam, the sheep calmed down.

Propofol is considered a safe anaesthetic (Booke *et al.* 1996). The kinetic and dynamic effects of propofol induction of anaesthesia in sheep are well described (Booke *et al.* 1996; Zheng *et al.* 2003). The magnitude of the effect of propofol on the cardiovascular system is dose dependent. Propofol decreases heart rate and produces vasodilatation and reduction in myocardial contractility that contribute to the reduction in MAP. These hemodynamic effects are well tolerated in healthy sheep (Runciman *et al.* 1996), but the hemodynamic situation deteriorates in septic sheep anesthetized with propofol. There are no data about the effects of propofol in sheep with myocardial ischemia while it is reported that propofol deteriorates hemodynamic parameters in dogs with myocardial ischemia (Mayer *et al.* 1993). In both phases, arterial blood pressure is lower after induction than in the other times even if the differences are not significant. This cardiovascular effect is most likely a direct vasodilatation of peripheral blood vessels, an increased vagal tone and a sympatholytic action of propofol (Booke *et al.* 1996). We may suppose that propofol ensures a good hemodynamic stability in sheep with chronic myocardial ischemia because no significant differences are recorded between phases.

Inhalation anaesthetics have been widely used for the anaesthetic management of sheep (Holmberg and Olsen 1987). Inhalation anaesthetics decrease cardiac output and arterial blood pressure and may sensitize the heart to arrhythmogenic effects of catecholamines. Isoflurane is least arrhythmogenic (Steffey 1996), but it decreases MAP in a dose dependent manner and heart rate in sheep (Brett *et al.* 1987; Gaynor *et al.* 1998). In this study no change on hemodynamic, cardiac and respiratory parameters was recorded during the administration of isoflurane. Likewise in other species, it is probably due to the short duration of anaesthesia because some cardiovascular effects may change with duration of anaesthesia (Steffey 1996).

Isoflurane has been administered using IPPV because mechanical ventilation must be instituted if intrathoracic surgery is performed. Besides, it is been reported that domestic ruminants tend to hypoventilate and mechanical ventilation must be considered (Riebold 1996). But it is important to minimize the effects of mechanical ventilation on the cardiovascular system. The administration of neuromuscular blocking agent was made in order to ensure adequate ventilation. Atracurium was chosen because it is devoid of adverse cardiovascular side effects, produces paralysis of intermediate duration and its duration of action is independent of enzymatic, hepatic and renal function (Clutton and Glasby 1998). The duration of action of atracurium was enough to perform surgical *procedures* (Clutton and Glasby 1998). In according to previous experiences (Cass *et al.* 1980; Clutton and Glasby 1998) we did not recorded any change due to atracurium. Data confirmed that IPPV ensures adequate alveolar ventilation even if pulmonary atelectasis, resulting from surgery procedures, occurs. In fact, respiratory impairment is typical for thoracotomy and favours formation of atelectasis (Kronen *et al.* 2005). Mechanical ventilation is useful to oppose atelectasis. Nonetheless, this alveolar recruitment was not sustained over time and re-formation of atelectasis cannot be excluded (Dhyr *et al.* 2002). Also

in this study, we cannot exclude re-formation of atelectasis and the mild hypercapnia recorded at the end of surgery in phase B is probably due to this mechanism.

Cardiovascular and respiratory functions were kept, but a mild hypothermia was recorded in both phases. From our point of view, it is probably above all due to the surgical procedures even if we cannot exclude the influence of the anaesthetic regimen. In fact, thoracotomy predisposes to hypothermia because of external heat loss and evaporative cooling through convection and radiation from the skin and surgical incision. But also drugs administration may cause hypothermia because of thermoregulatory center depression. Likewise other inhalation anaesthetics, isoflurane lowers the threshold for response to hypothermia in people to about 34.5°C and it is possible that the same trend occurs in animals.

The use of analgesic drugs is essential for animal welfare, but in most instances, experiments will not and should not be conducted while analgesics are still causing cardiovascular effects (Gross 1994a). A good approach is multimodal analgesia, whereby agents with different modes of action are combined, but in lesser doses to avoid side effects. Opioid analgesics are able to relieve severe pain, non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) can diminish the pain produced by cell injury and local anaesthetics reversibly block the propagation of action potential along nerve axons. Antinociceptive effects of fentanyl (Waterman *et al.* 1990; Mather *et al.* 2000) and buprenorphine (Schauvliege *et al.* 2006) were demonstrated in sheep. Fentanyl and buprenorphine produce little effects upon cardiovascular system with normal doses, but they are able to cause respiratory depression (Kronen *et al.* 2005; Schauvliege *et al.* 2006). To improve the analgesia, intercostal nerves blocks were performed with bupivacaine (Flecknell *et al.* 1991). Intercostal nerve blockade provided by bupivacaine is useful to provide an adequate analgesia after thoracotomy in sheep (Drager *et al.* 1998). We can suppose that analgesic management was effective because no changes were recorded about MAP and heart rate (Antognini and Berg 1995) and because isoflurane suppresses the arterial blood pressure response to noxious stimuli only with concomitant hypotension (Paddleford 2000) that we did not record.

In conclusion, our results indicate that this anaesthetic regimen provided a good cardiovascular and respiratory stability in sheep with myocardial ischemia.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mr Giuseppe Bertaccini for his technical support.

REFERENCES

1. Antognini J.F., Berg K. (1995): Cardiovascular responses to noxious stimuli during isoflurane anesthesia are minimally effected by anesthetic action in the brain. *Anaesthesia & Analgesia* 81, 843-848.
2. Booke M., Armstrong C., Hinder F., Conroy B., Traber L.D., Traber D.L. (1996): The effects of propofol on hemodynamics and renal blood flow in healthy and septic sheep, and combined with fentanyl in septic sheep. *Anaesthesia & Analgesia* 82, 738-743.
3. Brett C.M., Teitel D.F., Heymann M.A., Rudolph A.M. (1987): The cardiovascular

- effects of isoflurane in lambs. *Anesthesiology* 67, 60-65.
4. Cass N., Brown W.A., Lampard D.G. (1980): Dosage patterns of non-depolarizing neuromuscular blockers in the sheep. *Anaesthesia and Intensive Care* 8, 12-13.
 5. Celly C.S., McDonnell W.N., Black W.D., Young S.S. (1997): Cardiopulmonary effects of clonidine, diazepam and the peripheral α_2 adrenoceptor agonist ST-91 in conscious sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 20, 472-478.
 6. Chachques J.C., Duarte F., Cattadori B., Shafy A., Lila N., Chatellier G., Fabiani J., Carpentier A. (2004): Angiogenic growth factors and/or cellular therapy for myocardial regeneration: a comparative study. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 128, 245-253.
 7. Clutton R.E., Glasby M.A. (1998): A comparison of neuromuscular and cardiovascular effects of vecuronium, atracurium and mivacurium in sheep. *Research in Veterinary Science* 64, 233-237.
 8. Conklin K.A., Graham C.W., Murad S., Randall F.M., Katz R.L., Cabalum T., Lieb S.M., Brinkman III C.R. (1980): Midazolam and diazepam: maternal and fetal effects in the pregnant ewe. *Obstetrics & Gynecology* 56, 471-474.
 9. Coulson N.M., Januszkiewicz A.J., Dodd K.T., Ripple G.R. (1989): The cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine and xylazine-ketamine anesthetic combination in sheep. *Laboratory Animal Science* 39, 591-597.
 10. Drager C., Benziger D., Feng G., Berde C.B. (1998): Prolonged intercostal nerve blockade in sheep using controlled-release of bupivacaine and dexamethasone from polymer microspheres (Laboratory investigations). *Anesthesiology* 89, 969-979.
 11. Dyhr T., Laursen N., Larsson A. (2002): Effects of lung recruitment maneuver and positive end-expiratory pressure on lung volume, respiratory mechanics and alveolar gas mixing in patients ventilated after cardiac surgery. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 46, 717-725.
 12. Flecknell P.A., Kirk A.J., Liles J.H., Hayes P.H., Dark J.H. (1991): Post-operative analgesia following thoracotomy in the dog: an evaluation of the effects of bupivacaine intercostal nerve block and nalbuphine on respiratory function. *Laboratory Animals* 25, 319-324.
 13. Gaynor J.S., Wertz E.M., Alvis M., Turner A.S. (1998): A comparison of the haemodynamic effects of propofol and isoflurane in pregnant ewes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 21, 69-73.
 14. Gross D.R. (1994b): Cardiovascular effects of the tranquilizers. In: Gross DR (ed). *Animal models in cardiovascular research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NED, pp 69-70.
 15. Gross D.R. (1994a): General principles of animal selection, preoperative care, preanesthesia, chemical restraint and analgesia. In: Gross DR (ed). *Animal models in cardiovascular research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NED, pp 1-12.
 16. Holmberg D.L., Olsen D.B. (1987): Anesthesia and cardiopulmonary bypass technique in calves and sheep. *Veterinary Surgery* 16, 463-465.
 17. Kronen P.W., Levionnois O.L., Eckstein F.S., Moens Y.P.S. (2005) Prolonged

- recovery and respiratory depression after fentanyl infusion in a sheep undergoing mitral valve reconstruction. *Laboratory Animals* 39, 428-434.
18. Lachin A. (2005): Farmacologia e monitoraggio del blocco neuromuscolare. Proceedings of 50° SCIVAC National Congress, pp 138-140.
 19. Lumb W.V., Jones E.W. (1996a): Considerations for general anesthesia. In: Lumb WV, Jones EW (eds). *Veterinary Anaesthesia. 3rd edn.* Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp 5-34.
 20. Lumb W.V., Jones E.W. (1996b): Preanesthetic and anesthetic adjuncts. In: Lumb WV, Jones EW (eds). *Veterinary Anaesthesia. 3rd edn.* Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp 183-209.
 21. Mather L.E., Cousins M.J., Haung Y.F., Pryor M.E., McG Barratt S. (2000): Lack of secondary hyperalgesia and central sensitization in an acute sheep model. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 25, 174-180.
 22. Mather L.E., Duke C.C., Ladd L.A., Copeland S.E., Gallagher G., Chang D.H. (2004): Direct cardiac effects of coronary site-directed thiopental and its enantiomers. A comparison to propofol in conscious sheep. *Anesthesiology* 101, 354-364.
 23. Mayer N., Legat K., Weinstabl C., Zimpfer M. (1993): Effects of propofol on the function of normal, collateral-dependent, and ischemic myocardium. *Anesthesia & Analgesia* 76, 33-39.
 24. Mudrovici D.E., Alberti C.D., Eyherabide R., Lazia G.S. (1989): Anesthesia general en ovinos sometidos a circulación extracorporeal. *Veterinaria Argentina* 6, 608-610.
 25. Paddleford R.R. (2000): Analgesia e controllo del dolore. In: Paddleford RR (ed). *Anestesia dei piccoli animali.* Edizioni Masson, Milano, ITA, pp 237-257.
 26. Quinn D.A., Robinson D., Hales C.A. (1990): Intravenous injection of propylene glycol causes hypertension in sheep. *Journal of Applied Physiology* 68, 1415-1420.
 27. Riebold T.W. (1996): Ruminants. In: Lumb WV, Jones EW (eds). *Veterinary Anaesthesia. 3rd edn.* Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp 610-624.
 28. Runciman W.B.M., Mather L.E., Selby D.G. (1990): Cardiovascular effects of propofol and of thiopentone anaesthesia in the sheep. *British Journal of Anaesthesia* 65, 360-364.
 29. Schauvliege S., Narine K., Bouchez S., Desmet D., Van Parys V., Van Nootenand G., Gasthuys F. (2006): Refined anaesthesia for implantation of engineered experimental aortic valves in the pulmonary artery using a right heart bypass in sheep. *Laboratory Animals* 40, 341-352.
 30. Schlack W., Ebel D., Preckel B. (2004): What should the anaesthetist know about ischemia perfusion injury? Proceedings of Euroanaesthesia: Joint Meeting of the European Society of Anaesthesiologists and European Academy of Anaesthesiology, pp 19-25.
 31. Steffey E.P. (1996): Inhalation anesthetics. In: Lumb WV, Jones EW (eds). *Veterinary Anaesthesia. 3rd edn.* Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp 297-329.
 32. Waterman A., Livingston A., Amin A. (1990): The antinociceptive activity and

- respiratory effects of fentanyl in sheep. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 17, 20-23.
33. Yaster M., Koehler R.C., Traystman R.J. (1989): Interaction of fentanyl and pentobarbital on peripheral and cerebral hemodynamics in newborn lambs. *Anesthesiology* 70, 461-469.
 34. Zheng D., Upton R.N., Martinez A.M. (2003). The contribution of the coronary concentration of propofol to its cardiovascular effects in anesthetized sheep. *Anesthesia & Analgesia* 96, 1589-1597.

THE ROLE OF ORBITOFRONTAL CORTEX IN EMOTION-BASED DECISION MAKING AND FOOD CHOICE

RUOLO DELLA CORTECCIA ORBITOFRONTALE NELLE DECISIONI SU BASI EMOTIVE E NELLE SCELTE ALIMENTARI

GHIRRI Alessia*, BIGNETTI Enrico¹

Structured Summary

- Objectives

The orbitofrontal lobe is a precise anatomical region mediating an emotion-based voluntary action. The question how orbitofrontal cortex (OFC) might elicit this decision is intriguing.

- Results and Discussion

It was demonstrated that OFC can rate regret in function of the “reward” expected and obtained. The term “reward” is utilized for describing the positive value an individual ascribes to an object but it is an operational concept absolutely abstract unless we associate the word “reward” to the consequences of an action on subject’s health or wellness.

- Clinical Significance

As a concluding remark regarding food choices, we may say that several strategies can be put in action by OFC in order to control also feeding behavior.

Keywords

Orbitofrontal cortex, decision making, emotion, regret, food choice

INTRODUCTION

The direct consequence of an individual action can trigger either positive or negative emotions, respectively like satisfaction and relief or disappointment and regret. Among negative emotions, regret seems to be an efficacious tool in emotion-based decision making (Camille et al 2004). In contrast to a mere disappointment which is totally avulsed from the decision preceeding the action, regret is strongly linked to the feeling of responsibility of what has been premeditated. On this basis, regret should help the subject to prevent from making other mistakes in the future.

Emotion-based decision making is mediated by several central structures among which the Orbitofrontal Cortex (OFC) plays a fundamental role. OFC is located in between the prefrontal cortex active in reasoning and planning, and several limbic structures implicated in emotions. Moreover, it receives afferences from other areas providing multiple sensory modalities (Rolls 2000). Thanks to the strategic location and interconnections, OFC exhibits a peculiar ability in evaluating an action

¹ Department of Animal Production, Veterinary Biotechnology, Food Quality and Safety, Parma University, 43126 Parma, Italy. Correspondence: @ enrico.bignetti unipr.it

outcome in terms of “success” or “unsuccess”. In particular, it is able to evaluate what is the reward gained by an action as compared to what would have been the gain of an alternative decision. This counterfactual thinking can color the liability for one’s own decision of regret.

RESULTS AND DISCUSSION

Studying animal behaviour, the efficacy of conditioning protocols or neurophysiological tasks is mostly based on the countereffect of reward (Tremblay and Schultz 1999). The basic goal of a voluntary action depends on the rewarding outcomes and the relative reward preference may constitute a motivational control in each specific task. The attractiveness of a specific reward can be experienced in a graduated manner. However, the rating criterion is not decided on the basis of a scale of absolute values, rather it is based on a comparison among alternative rewards, easily adjusting personal needs to what the situation can offer at best. The adaptive process of the reward system is a mechanism typical of many successful systems.

No doubts that the discovery of a precise anatomical region mediating an emotion-based voluntary action might be absolutely relevant. However, the question how OFC might elicit and rate regret in function of the “reward” expected and obtained, still remains crucial. In fact, the term “reward” is utilized for describing the positive value an individual ascribes to an object but it is an operational concept absolutely abstract unless we associate the word “reward” to the consequences of an action on subject’s health or wellness. Only such consequences represent those concrete inputs on the bases of which brain can process regret, at first, and eventually extrapolate further abstract categories like success or unsuccess.

People in rich countries seem to be primarily attracted by money, cars, houses, etc., so that daily life is conditioned by the reach of higher and higher levels of welfare. Conversely, “primary drives” that lead animals to motivational behaviour include hedonic rewards which satisfy basic needs like hunger, thirst and sex. Indeed, the first behaviourists were probably deceived by the simple mind of the laboratory animals working with, so they initially compiled a list limited to these three drives. Later on, when they discovered that the animals could sometimes follow different goal seeking, they more properly elongated the list to include further hedonic drives like curiosity, sleep, freedom preferences etc. That’s why, nowadays, there is neither a universally accepted preference scale derived from the small basic set of primary needs, nor there is a global consensus on the motivational characteristics of each hedonic drive that marks it as unique and perfect reward. What is the animal point of view on what is really “pleasantness” has not yet a conclusive answer, much depending on the experimental conditions.

Till now, liquid or solid food has been esteemed an easy-to-handle reward that might motivate an animal to execute a protocol properly, so that it has been considered the most powerful tool in order to investigate animal behaviour. Recently, the study of taste and olfaction were improved by the introduction of functional neuroimaging techniques, especially functional magnetic resonance and positron emission tomography. These techniques represented a formidable chance to study human behavior, especially because a subject could consciously answer to a precise

questionnaire during the measurements. An emblematic case was the possibility to get an image of the brain responding to food which was automatically delivered into the subject's mouth and, at the same time, to listen to the subject ranking his pleasantness (De Araujo et al 2003). These kind of experiments could shed light on the role of OFC in representing the specific flavor of a food and in extrapolating affective valence from it.

The question was how flavor and affective consequences can emerge from primary sensory perceptions. Primary gustatory sensations, for instance, are tuned to identify only five simple modalities: salty, bitter, salty, sour and umami. These five tastes are considered by some authors a sort of ancestral categories by which the environment can be grossly featured by the animals for their survival: sweet should ensure energy reserves, salty should maintain the electrolytic balance, savory or umami should guarantee a regulatory intake of proteins and, finally, bitter should give the necessary allarm to avoid toxins. As far as it regards olfaction, the primary sensations projected onto pyriform cortex and medial OFC cortex are thousands, probably as many as the huge amount of odorants. Nevertheless, the idea that flavor and its further hedonic evaluation in OFC might rise by mixing distinct gustatory and olfactory sensations in a simple combinatorial way is absolutely reductive. Not only OFC does encode taste, olfaction and somatic sensations coming from the oral cavity (grittiness, stickiness, etc.) but it is also responsible for a double-way information exchange with the rest of the limbic system, so that even the lasting subject's memory is elicited in the complex computation of flavor, reward and emotion-based decision making.

This process enables OFC to evoke a blend of sensations that we can define flavor and, in the same way, the hedonic percept of it. From this we assist at the arousal of the sense of pleasantness (Small et al 2007).

Many experiments seem to confirm this statement. A clear-cut example was carried out by exposing a subject to chocolate odor mixed with other nonfood olfactory stimuli (Small et al 2005). All the odorants could elicit a response of the primary sensory cortex (pyriform and medial OFC) but only the **chocolate odor** could also activate a lateral OFC cortex which is usually responsive to **chocolate taste**. In other words, food odor can evoke the corresponding taste component. The result was explained by assuming that the olfactory perception is launched to higher order cortical loop where flavor was already experienced as a unitary percept of chocolate in the past. Then, the recruitment of the higher cortex is able, on the rebound, to elicit the gustatory component backward in the primary taste cortex.

In summary, a meaningful conceptual representation of a food can be elaborated by OFC only on the basis of smell, provided this kind of food is already familiar to the subject. On this basis, we may speculate that chocolate smell may evoke a sort of virtual taste sensation in order to anticipate the real contact of chocolate components with the gustatory receptors in the mouth. Up to us, this mechanism might create a sort of psychological expectation and, then, a true gratification upon swallowing a real bit of chocolate. Conversely, let's assume that, at the right moment of oral intaking, chocolate were incidentally exchanged for a totally different food (odorless and with a taste different than chocolate). Most probably, either disappointment or

even true regret might be elicited, depending on how strong is the sense of guiltiness of the subject for the mistake. In one sense, this hypothesis might exemplify simple cognitive processes at the basis of emotion-based decision making.

Although primary sensorial and higher computational levels in OFC exhibit clearly distinct anatomical and functional features, both cortices cooperate to process food identification, the affective response and the coherent behavior. Recently, we have observed a change in food preference that might be due to a totally different way of cooperation among brain portions even more distant one from each other, the olfactory bulb and the limbic system (Bignetti et al 2009).

Recently, it was demonstrated by others that olfactory acuity starts oscillating in women upon sexual maturation. Moreover, the mean acuity in cycling women is greater than in the pre-pubertal age. On the basis of the current literature, we came to the conclusion that the oscillating levels of sex hormones (particularly testosterone and 17β -estradiol derivative) could affect the dopaminergic tone within the olfactory bulb. Then, up- and down-regulation of the dopaminergic tone might trigger the oscillation of olfactory acuity from a minimum during the bleeding days, whose value corresponds to the pre-pubertal one, to a maximum during ovulation, whose value is about 30 times higher than the minimum. To monitor a possible consequence on human behavior, we investigated whether the apparent regulation of olfactory thresholds could affect alimentary habits and, in particular, food preferences. To do so, we investigated the effect of sexual maturation on fish consumption. Infact, the rotten fish odor trimethylamine is one of the best perceived odor, it is quite familiar and it is considered one of the worse odorant by most people. As expected, we observed a significant fish consumption decrease upon sexual maturation. Interestingly, the same evidence was observed with male subjects, thus soliciting us either to study the effect of sexual maturation on male olfaction and to try to give a more convincing interpretation of both evidences under the light of possible mating strategies. As a concluding remark, we may say that several strategies can be put in action in order to control feeding behavior. In this last example, it was evident that the disgust towards trimethylamine odor is already a well-established concept of the individual. Thus, if we need to synchronize fish consumption with sexual maturation, it is useless to change limbic categories, rather we may pass through a hormonal loop to get up- or down-modulation of apparent olfactory threshold at the periphery of the sensory systems.

CONCLUSIONS

In conclusion, a reward attribute is given to a food by OFC in accordance with the rank of pleasantness. These concepts might arise from the individual past experience evoked by analogous sensory features, furtherly integrated at the perspective of internal affective and hormonal state of the subject. In some circumstances, the notion of food composition and brand or a familiar consumption might also enter the computation of the final concept. These cognitive features might even override the final computational output by influencing alimentary behavior and food preferences (MacClure et al 2004).

Nowadays, obesity, bulimia, anorexia and other eating disorders are becoming a real individual and social emergency in the so-called rich countries. Uncorrect

alimentary habits may lead to dangerous metabolic disfunctions. Thus the deviation from the natural mechanisms regulating alimentary habits and food preferences are hot subjects of deep investigation. In connection with this, our personal suspect is that there is also a general spreading of other mental distortions leading to couldn't-care-less attitude, aggressivity and discontent. The feeling is that we have missed the goal of the precept indicated by WHO in 1947, that health is not only the absence of illness but it consists also in a complete physical, mental and social welfare. Maybe an ultimate definition of what should be considered "individual and social well-being" seems to be urgent. To this regard, new research centers devoted to the sciences of wellbeing seem to grow up everywhere and food and feeding are often meaningful actors on these stages. To contribute to this effort, in a recent paper, it was tentatively discussed the definition of food "total quality" by one of us (Giusti et al 2008) which could take into account not only the nutritional value and the risk assessment but also the psycho-active effects on mood, cognitive functions, decision making, etc.

Acknowledgements

This research was financially supported by MiPAAF (Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali) "FINALE-QUALIFU" Project D.M.2087/7303/09.

REFERENCES

1. Camille N., Coricelli G., Sallet J., Pradat-Diehl P., Duhamel J.-R., Sirigu A. (2004) The involvement of the orbitofrontal cortex in the experience of regret. *Science*, 304, 1167-1170
2. Rolls E.T. (2000) The orbitofrontal cortex and reward. *Cerebral Cortex* 10, 284-294
3. Tremblay L., Schultz W. (1999) Relative reward preference in primate orbitofrontal cortex, *Letters to Nature*, 398, 704-708
4. De Araujo I.E.T., Kringelbach M.L., Rolls E. T. and Hobden P (2003) Representation of umami taste in the human brain. *J. Neurophysiol*, 90, 313-319
5. Small D.M, Bender G., Veldhuizen M.G., Rudenga K., Nachtigal D. and Felsted J. (2007) The role of human orbitofrontal cortex in taste and flavor processing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1121, 136-151
6. Small D.M., Gerber J.C., Mark Y.E. and Hummel T. (2005) Differential neural responses evoked by orthonasal versus retronasal odorant perception in humans. *Neuron*, 47, 593-605
7. Bignetti E., Aiello G.L., Sinesio F. and Cannella C. (2009) The amelioration of olfactory acuity upon sexual maturation might affect food preferences, *Nutrients*, 1, 3-17
8. McClure S.M., Li J., Tomlin D., Cypert K.S., Montague L.M. and Montague P.R. (2004) Neural correlates of behavioral preferences for culturally familiar drinks, *Neuron*, 44, 379-387
9. Giusti A.M., Bignetti E. and Cannella C. (2008) Exploring new frontiers in total food quality definition and assessment: from chemical to neurochemical properties. *Food Bioprocess Technol.* 1, 130-142

**DOMESTIC FOOD HANDLING PRACTICES
AND FOOD SAFETY**
*GESTIONE DOMESTICA DEGLI ALIMENTI
E SICUREZZA ALIMENTARE*

CONTER Mauro, POJANI Linda, CORTIMIGLIA Claudia, DI CICCIO Pierluigi, GHIDINI Sergio, ZANARDI Emanuela, IANIERI Adriana¹

Abstract

Consumers have an active role in the contest of food safety. Management of food at home is the last step of the chain “from farm to fork”, but is not the least important. Outbreaks of food-borne illness occurring in private homes are less likely to be reported, but a significant proportion of food-borne outbreaks in countries with an advanced economic development can be attributed to the home environment. This study aimed to provide information on the consumer management of refrigerated food. Overall, 1240 people have been interviewed in order to have information about domestic management of food. This study highlighted some gaps in food safety knowledge and practices that occur in domestic setting and consumers are not familiar with their role in the food safety chain. Findings from this study clearly indicate the need for greater consumer education regarding proper domestic refrigerator management, because consumers aware of safety issues can be active partners within the food chain.

Keywords

Refrigeration; domestic management; food handling practices;

INTRODUCTION

Epidemiological data from Europe, North America, Australia, and New Zealand indicate that a substantial proportion of foodborne disease is attributable to improper food preparation practices in consumers' homes (Sharma, et al., 2009). Outbreaks of food-borne illness occurring in private homes are less likely to be reported than those in commercial and public premises (Scott E. 2003; Kilonzo-Nthenge, et al., 2008). Nevertheless, data from England, Wales, the USA and Canada suggest that 12–20% of reported food-borne outbreaks have been attributed to the home. Overall, in Europe, Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization (FAO et al., 2002) stated that the ‘private home is the single location where most food-borne cases occur’.

Failure to follow correct practices in the adjustment, maintenance, use or cleaning of domestic refrigerators poses a number of risks to consumers. Refrigerators

¹ Department of Animal Production, Veterinary Biotechnologies, Food Quality and Safety, Parma University, 43126 Parma, Italy. Corresponding author: mauro.conter@unipr.it

form an important link in the wider chain of cross-contamination, and a significant factor in 28% of outbreaks of domestic foodborne disease (Kilonzo-Nthenge *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 1996). Bacteria contaminating unwashed raw foods, leaking packages, hands, surfaces, etc. introduced to domestic refrigerators may directly contaminate other stored foods, or attach to and persist on the internal surface of the refrigerator posing risks of indirect longer term contamination during subsequent food preparation activities (Michaels *et al.*, 2001). Many domestic refrigerators are incorrectly adjusted, operating above the recommended temperature and are therefore capable of supporting sub-optimum but significant growth of mesophilic organisms such as *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. (Jackson *et al.*, 2007; Flynn *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1998). Even when correctly adjusted, refrigerators can support the growth of psychotropic pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*, which can therefore increase to clinically significant numbers in foods stored for extended periods in domestic refrigerators (Flynn *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1998).

Surveys conducted in many countries to evaluate the food safety practices of consumers have been reviewed by Redmond and Griffith (2003). Data on the food handling practices are usually limited to the collection of data concerning consumer awareness and knowledge rather than actual food handling practices (Kennedy *et al.*, 2005; Kosa *et al.*, 2007; Lagendijk *et al.*, 2008). This survey was undertaken to obtain information on the domestic meat and poultry handling practices. Specific information on purchasing, transport, storage, and freezing, practices was requested in the questionnaire. Therefore, the objectives of this study were to evaluate consumers behaviour with regard to refrigeration practices.

MATERIALS AND METHODS

The survey has been carried out in Italy. A questionnaire has been designed involving 25 questions arranged in three sections: (i) demographic characteristics (gender, age, residence area, education, employment status, household size), (ii) domestic management of refrigerated food from purchase to consumption (placing, packaging, temperature, cleaning practices), and (iii) risk perception by the consumer. Face-to-face interviews have been conducted in the respondents' homes or workplaces. Each questionnaire took approximately 10 min to complete. Following the survey, a statistical analysis of the data has been conducted. All statistical analysis has been made by using SPSS (Chicago, IL) ver. 16.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Overall 1240 interviews have been performed. Socio demographic characteristics of surveyed participants are listed in Table 1.

Table 1: Socio demographic characteristics of the studied population samples.

Number of subjects	1240
Gender ^a	
male	61.8
female	38.2
Age class (years) ^a	
< 18	2.0
18-30	27.4
31-45	31.7
46-60	24.3
>60	14.6
Number of people at home ^a	
1	17.0
2	21.3
3	33.4
4	18.5
>4	9.8
Children at home ^a	
Yes	63.5
No	36.5
N° of children at home (if any) ^a	
1	28,3
2	40,3
3	25,3
4	4,8
>4	1,3
Age of children (if any) ^a	
0-10	29.7
10-20	34.0
20-30	24.3
>30	12.0
Education level ^a	
primary school	16.0
secondary school	20.0
college	39.0
university	25.0
Job category ^a	
employee	30.0
executive	19.0
retired	20.0
student	13.0
housewife	18.0

^a Data are presented as percentages

Regarding the second part of the questionnaire, the majority of the interviewed people (38.1%) do the shopping twice a week, following a purchase order. In particular, 38.1% of consumers follows the disposition of the shelves, 37.8% follows a personal

order and only 24.1% leave the refrigerated/frozen food at the end. Moreover, less than half of respondents used a cool bag during shopping. Interestingly, only 18% of people do the shopping as the last step before going home. Regarding domestic management of refrigerated food, the majority of respondents (60.9%) place the food randomly into the fridge and some half of them do not separate raw food from cooked products. The majority of respondents (69.9%) were aware of the correct temperature range (2-5°C) of the household refrigerator units, but they seldom (44.4%) or never (38.7%) checked the temperature anyway. Frozen food are stored into the original packaging, but some 33% of consumers remove the packaging before to store the product into the freezer. Of the interviewed people 70.2% of them declared that they clean their hands after touching raw foods. For the third part of the questionnaire, related to the risk perception from the consumer, interestingly, the majority of people (74.4%) affirmed that the food management at home is important, but the remaining 25.6% had never thought about this issue. The major risk perceived by the consumers is the presence of bacteria (88%) followed by the presence of chemicals such as dioxin (49%).

The results of this survey indicate a low level of food safety knowledge in a representative sample of householders in Italy. However, this situation is not unique, since a similar level of food safety ignorance has been identified in similar studies conducted in Ireland or in Australia (Bolton *et al.*, 2005; Jay *et al.*, 1999). For example, 20.0% of householders in the current study knew that the correct refrigeration temperature was 1-5°C, the corresponding figure for Australia was 26.3% (Jay *et al.*, 1999). Similarly, only 18.0% of householders reported they frequently monitored the temperature of their refrigerator, compared to 22.4% in Ireland or 15.5% in the Australian study (Bolton *et al.*, 2005; Jay *et al.*, 1999).

Outbreaks of foodborne illness, especially in the home, occur as a result of improper food hygiene practices in which cross-contamination in combination with inadequate storage or cooking was implicated in many instances (Olsen, *et al.*, 2000). It is impossible to completely exclude food pathogens from the kitchen; however their spread, growth and survival can be controlled with correct food storage and regular cleaning and disinfection of food contact surfaces. Some surveys reports the role of refrigerator as a significant niche for persistence and dissemination of foodborne pathogens (Azvedo *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2007). In our study, 80.0% of consumers were aware of the correct temperature inside the fridge, but 38.7% of them don't checked it at all. This percentage is in agreement with those reported in other studies (James, *et al.*, 2008; Kosa, *et al.* 2007; Redmond & Griffith, 2003). If food is held over time at temperatures allowing to bacterial growth, there is a potential risk in terms of food safety because a more rapid growth of spoilage microorganisms or food pathogens is allowed, if they are present, such as *L. monocytogenes* or *Salmonella* spp. Moreover, their ability to attach to many kinds of surfaces (glass, rubber and stainless steel) and to produce biofilm have been demonstrated (Di Bonaventura *et al.*, 2008). The levels of contamination observed could be influenced by the method of food placing into the fridge. In fact, even against a high level of education, 60.9% of respondents adopted personal criteria to food placing, disregarding the risk arising from cross-contamination. Raw meat, poultry and fish should be stored separately

from other ready to eat foods to avoid cross-contamination. Furthermore, 29.8% of householders do not wash their hands after touching raw food, increasing the likelihood of cross-contamination. This study highlighted some gaps in food safety knowledge and practices that occur in domestic setting. In conclusion, result obtained from the present survey revealed that consumers are not familiar with their role in the food safety chain and that they allow numerous opportunities for microbiological contamination of food. Findings from this study clearly indicate the need for greater consumer education regarding proper domestic refrigerator management.

REFERENCES

1. Azvedo, I., Regalo, M., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P.A. (2005). Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control*, 16, 121-124.
2. Bolton, D.J. (2005) A Study of Consumer Food Safety Knowledge, Microbiology and Refrigeration Temperatures in Irish Domestic Kitchens. A report published by Safefood, The Food Safety Promotion Board.
3. Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., & Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1552-1561.
4. FAO (2002). Statistical information on food-borne disease in Europe. Microbiological and chemical hazards. Conference paper presented at FAO/WHO pan-European conference on food safety and quality. 25–28 February. Report no: 01/04. Agenda item 4b. Budapest; FAO/WHO.
5. Flynn O.M.J., Blair I., McDowell D. (1992). The efficiency and consumer operation of domestic refrigerators. *International Journal of Refrigeration* 15, 307–312.
6. Jackson, V., Blair, V., McDowell, D. A., Kennedy, J., & Bolton, D. J. (2007). The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control*, 18, 346-351
7. James, S. J., Evans, J., & James, C. (2008). A review of the performance of domestic refrigerators. *Journal of Food Engineering*, 87, 2-10.
8. Jay, S. L., Comar, D. and Govenlock, L. D. (1999). A national Australian food safety telephone survey. *Journal of Food Protection* 62, 921-928.
9. Johnson A.E., Donkin A.J., Morgan K., Lilley J.M., Neale R.J., Page R.M et al. (1998). Food safety knowledge and practice among elderly people living at home. *Journal of Epidemiology and Community Health* 52, 745–748.
10. Kennedy, J., Jackson, V., Blair, I. S., McDowell, D. A., Cowan, C., & Bolton, D. J.(2005) Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. *Journal of Food Protection*, 68, 1421-30.
11. Kilonzo-Nthenge, A., Fur-Chi, C., & Sandria L. G. (2008). Occurrence of *Listeria* and *Enterobacteriaceae* in domestic refrigerators. *Journal of Food Protection*, 71, 608-612.

12. Kosa, K. M., Cates, S. C., Karns, S., Sandria, L. G., & Chambers, D. (2007). Consumer Home Refrigeration Practices: Results of a Web-Based Survey. *Journal of Food Protection*, 70, 1640-1649.
13. Lagendijk, E., Assere, A., Derens, E., & Carpentier, B. (2008). Domestic refrigeration practices with emphasis on hygiene: analysis of a survey and consumer recommendations. *Journal of Food Protection*, 71, 1898-1904.
14. Michaels B., Ayers T., Celis M., Gangar V.(2001). Inactivation of refrigerator biofilm bacteria for application in the food service environment. *Food Service Technology* 1, 169–179.
15. Olsen, S. J., MacKinon, L. C., Goulding, J. S., Bean N. H., & Slutskear, L. (2000). Surveillance for food-borne disease outbreaks-United States, 1993-1997. *MMWR Surveillance Summary*, 49(SS05), 1-51.
16. Redmond, E. C., & Griffith, C. J. (2003). Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. *Journal of Food Protection*, 66, 130-61.
17. Ryan M.J., Wall P.G., Gilbert R.J., Griffin M. and Rowe B. (1996). Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. *Communicable Disease Report CDR Review* 13, R179–R182.
18. Scott E. (2003). Food safety and food-borne disease in 21st century homes. *The Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 14, 277–280.
19. Sharma, M., Eastridge, J., & Mudd, C. (2009). Effective household disinfection methods of kitchen sponges. *Food Control*, 20, 310-313.

**PARMA HAM: A LOW RISK-FOOD FOR HUMAN
TRANSMISSION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*
IL PROSCIUTTO DI PARMA QUALE ALIMENTO A BASSO
RISCHIO PER LA TRASMISSIONE ALL'UOMO DI *LISTERIA
MONOCYTOGENES***

COTUGNO Delia¹, BONARDI Silvia²

Summary

Listeria monocytogenes is a Gram-positive, facultative anaerobic bacterium, responsible for listeriosis, a well-known foodborne disease. Clinical presentation of human listeriosis includes non-invasive listeriosis (a febrile gastroenteritis), and more severe diseases such as meningitis, septicaemia, and abortion. Invasive listeriosis usually occurs in particularly vulnerable individuals, such as elderly, infants, pregnant women and immuno-compromised people. *L. monocytogenes* is ubiquitous in the environment and can contaminate several categories of foods. Its ability to multiply at low temperatures makes *L. monocytogenes* a formidable pathogen to control in food that can support its growth during refrigerated storage and that are consumed without further lethality treatments, such as reheating. Therefore, ready-to-eat products, including Parma ham, are regarded as a category of food at increased risk of listeriosis. Parma ham is a typical Italian product that meets the highest quality and hygienic standards, traditionally manufactured following several steps including salting, resting, drying, maturing and ageing. Italian researchers demonstrated that the curing step of Parma ham leads to a final a_w (0.90-0.93) which is effective in limiting the growth of *L. monocytogenes*. Dry-cured ham slices and portions can be vacuum packed or packed under protective atmosphere. Packaging conditions and storage at refrigeration temperatures are able to guarantee the safety of the product. In 2007, a risk assessment for listeriosis in Parma ham consumers could insert this traditional ham in the category of “low risk for listeriosis-food”.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Parma ham, dry-cured ham, RTE products, listeriosis

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a Gram-positive, facultative anaerobic bacterium, responsible for listeriosis, a severe disease which can affect both man and animals.

¹ Doctor in Veterinary Medicine. Student at the postgraduate School of Food Hygiene at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Parma via del Taglio, 10- 43126 Parma - Italy

² Department of Animal Health, Section of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Parma via del Taglio, 10- 43126 Parma – Italy

Human listeriosis is mainly foodborne and can vary from gastroenteritis with non-specific flu-like symptoms to a more severe illness causing septicaemia, abortion, and meningoencephalitis (Quinn *et al* 2002; Bille *et al* 2003).

The severity of listeriosis is influenced by various aspects, including virulence variability among different strains of the microorganism, human susceptibility and the level of *L. monocytogenes* contamination in the ingested food. The elderly and other immunocompromised people, pregnant women and neonates are particularly susceptible to the infection. Those highly susceptible population groups present a lower infective dose and a higher mortality rate (up to 30%) than low risk people (EFSA 2007; Ramaswamy *et al* 2007).

L. monocytogenes is ubiquitous in the environment, often isolated from soil, water and vegetation. It can live in the intestines of humans and animals without causing clinical signs of infection. Being ubiquitous and tolerant to extreme pH, low temperatures and NaCl conditions, *L. monocytogenes* can contaminate and multiply in a wide variety of foods. Its unusual characteristic of growing, albeit slowly, at temperatures as low as 0°C, is responsible for the high contamination levels detected in foods stored at refrigeration temperature. Consequently, Ready-to-Eat (RTE) products, including dry-cured hams, are normally considered high risk foods for human listeriosis, especially because they are eaten without further bactericidal treatments, such as cooking or heating (Bille *et al* 2003; Liu 2006; EFSA 2007; Ramaswamy *et al* 2007).

LISTERIA MONOCYTOGENES: DESCRIPTION OF THE MICROORGANISM

The genus *Listeria* represents a group of Gram-positive, facultative anaerobic, non-spore-forming, non-branching, rods 0,5 µm in width and 1 – 1.5 µm in length (Liu 2006). The organisms are motile at 28°C by means of one to five peritrichous flagella, but lose motility with temperature increasing. *Listeria* species grow on specific culture media such as Oxford Agar, Palcam Agar and ALOA (Agar *Listeria* by Ottaviani and Agosti), and on nutrient agar or blood agar (Bille *et al* 2003).

Characteristic *Listeria* colonies are small (1 to 2 mm after 24-48 hours of incubation at 37°C), smooth or rough, and blue-gray on nutrient agar when examined with obliquely transmitted light. The optimum growth temperature is between 30 and 37 °C, but growth occurs at 4 °C within a few days. Catalase is produced except in a few strains, and the oxidase test is negative; the G+C content of the DNA is 36 to 42% (Bille *et al* 2003).

The genus *Listeria* is divided into six species, including *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* and *L. grayi* (Allerberger 2003). While *L. monocytogenes* infects both humans and animals, *L. ivanovii* is considered to be an animal pathogen that rarely causes disease in man (Low and Donachie 1997). The biochemical identification of *Listeria* species is based on a limited number of tests, as for example *L. monocytogenes* produces acids from L-rhamnose and α-methyl-D-mannoside only. *L. monocytogenes* haemolytic activity can be tested by inoculating cultures onto blood agar plates or by the CAMP-test. The CAMP-test is particularly useful as it is able to differentiate between *L. monocytogenes* and

L. innocua, since the two species give similar reactions to other biochemical tests (Allerberger 2003).

L. monocytogenes is a ubiquitous microorganism, widely distributed in the environment. Primary habitats are considered to be the soil and decaying vegetable matter. Both water, and human and animal faeces are frequently contaminated by *L. monocytogenes*. It can survive for a long time in soil, milk, faecal matter and silage, where its possibility to survive depends especially on pH (Bille *et al* 2003).

The ability of *L. monocytogenes* to survive within wide temperature (from 1 to 45°C) and pH (from 4.4 to 9.0) ranges and to tolerate concentration of salt around 10% has been well documented. Both *L. monocytogenes* virulent and avirulent strains are able to tolerate much wider pH ranges for short periods of time (up to 1 hour at pH 3 or pH 12), and seem to be unaffected by incubation in saturated NaCl solutions (Liu *et al* 2005).

Upon ingestion through contaminated foods, *L. monocytogenes* withstands exposure to host proteolytic enzymes, the acidic environment in the stomach, the elevated osmolarity and presence of bile salts in the gut, with significant differences between strains and serotypes (Werbrouck *et al* 2008). *L. monocytogenes* can live in the intestines of humans and animals for long periods of time without causing infection and has been found in 5% of normal healthy people (Ramaswamy *et al* 2007), including pregnant women who delivered healthy infants (Farber and Peterkin 1991).

A variety of animal species can carry *L. monocytogenes* in the gastrointestinal tract, especially bovine, swine and poultry, but the highest shedding rates were found in cows who had aborted because of listeriosis (Schuchat *et al* 1991). Data from Italian researches showed that the carriage rate of *L. monocytogenes* in cattle and finishing pigs at slaughter was 7.7% and 1.3-6.0% respectively (Bonardi *et al* 1997; Bonardi *et al* 2002). In sheep at herds the prevalence of faecal carriers was about 8.0% (Wesley 2007).

Food contamination by *L. monocytogenes* usually results from the pathogen's persistence in the food processing environment. Facing cleaning and sanitizing procedures for extended periods of time, due to its ability to attach to surfaces, establish niches and form biofilm, especially on plastic surfaces, *L. monocytogenes* can colonize and persist in food plants (Krysinski *et al* 1992; Bremer *et al* 2002; Borucki *et al* 2003; Pan *et al* 2006).

CLINICAL FEATURES OF HUMAN LISTERIOSIS

L. monocytogenes is an intracellular parasite able to survive in macrophages and to invade a variety of normally non-phagocytic cells, involving early escape from the phagocytic vacuole, rapid intracytoplasmatic multiplication and direct spread to neighbouring cells (Ramaswamy *et al* 2007).

The primary site of entry of *L. monocytogenes* into the host is the gastrointestinal tract; the first bacterial multiplication occurs in the Peyer's patches monocytes, the foci of infection consisting of pyogranulomatous reactions in the subepithelial follicular tissue. Bacteria that cross the intestinal barrier are carried by lymph or blood to the mesenteric lymphnodes, spleen and liver. The first target organ

after intestinal translocation is thought to be the liver, where neutrophils, gradually replaced by blood-derived mononuclear cells together with lymphocytes, two to four days after infection form the characteristic granulomas. Granulomas presumably act as physical barriers that limit further spread of the infection in patients with an adequate cell-mediated immunity. In individuals with a weakened immune system, the unrestricted proliferation of *L. monocytogenes* in the liver may result in invasion to secondary target organs: the brain and the gravid uterus (Vazquez-Boland *et al* 2001; Lecuit 2005; Ramaswamy *et al* 2007).

Being able to limit the infection, healthy adults usually show a mild, self-limited non-invasive form of listeriosis, characterised by a febrile gastroenteritis with nausea, vomiting and diarrhoea. Elderly people or immuno-compromised patients can develop meningitis, encephalitis and septicaemia; infection in pregnant women causes an influenza-like illness that can lead to abortion, premature birth or to a severe disease of the newborn with sepsis or meningitis (Quinn *et al* 2002; Bille *et al* 2003).

The severity of listeriosis depends on several factors:

- i*) virulence of the *L. monocytogenes* infective strain (strains serotype 1/2a, 1/2b and 4b are responsible for 98% of human cases);
- ii*) *L. monocytogenes* contamination level in the ingested food (the infective dose in normal healthy people is considered to be higher than 10⁷ microorganisms);
- iii*) host's immune response: newborns, elderly people, pregnant women and immuno-compromised individuals (transplant and cancer patients, HIV positives, individuals with chronic diseases) have a higher susceptibility to the infection (Ooi and Lorber 2005; Liu 2006; EFSA 2007; Ramaswamy *et al* 2007).

PARMA HAM

Parma Ham is a dry-cured ham produced following high hygienic and qualitative standards. It has been certified with the Protected Designation of Origin (P.D.O.) and its production is based on local traditional methods, according to Parma Ham Consortium Regulation and to the "Specifications and Dossier" pursuant to article 4 of Council Regulation (EEC) N°2081/92. As described by the Dossier, both processing plants and slicing-packaging plants must be located within the geographical boundaries of Parma province, Emilia-Romagna Region, Italy. The biochemical processes, which take place in the ham during the long curing time (more than 12 months, after salting time), are deeply influenced by Parma valley climatic conditions.

Pigs employed for the production of Parma ham have to meet specific requirements of breed, geographical origin, weight and age. Large White, Landrace and Duroc breed pigs are accepted. In accordance with the Italian Herd Book even other pig breeds, either cross-breeds or hybrids, are accepted, if suitable for the production of "heavy pigs". Pigs that carry antithetical traits, with particular reference to stress sensitivity (PSS genotype), are not accepted for Parma ham production. Purebred Belgian Landrace, Hampshire, Pietrain, Duroc and Spotted Poland are excluded. Pigs must be reared in one of the following Italian Regions: Emilia-Romagna, Veneto, Lombardy, Piedmont, Molise, Umbria,

Tuscany, Marche, Abruzzo and Lazio. The minimum slaughtering age is nine months, with an average live weight of 160 kilograms. The employ of boars and sows is forbidden.

Animals responding to all these specific requirements are slaughtered and perfectly drained of blood. Legs are immediately separated from pork carcasses and stored at refrigeration temperature for 24 hours, until meat temperature lowers to 0°C. Cold legs are easier to trim and low temperatures prevent bacterial spoilage. During the cooling stage, the legs' weight reduces by at least 1%.

Through trimming, some fat and skin are removed and the leg takes its peculiar "chicken leg" round shape. Trimming has technical reasons too, as it helps the following salting phase. After trimming, legs lose up to 24% of their weight in fat and muscle. Cooled and trimmed legs are sent from the slaughterhouses to the curing houses.

Parma ham production starts with a salting phase. Sea salt, the only additive allowed in Parma ham manufacturing, is mainly added to the legs by a salting machine and partially manually by sprinkling the salt onto specific areas, such as the aitch and the femur bone (Barbuti *et al* 2009). Salting is divided into two consecutive phases. During the first salting phase, pork legs are covered with salt and stored at temperatures ranging from 1°C to 4°C in rooms with about 80% humidity. After 6-7 days of storage, legs are taken out, cleaned of residual salt and sprinkled with tiny amounts of salt. Legs are then stored at the same conditions for 15-18 days. During this period, legs slowly absorb salt and give off some of their moisture. The whole salting stage ends up with a pork leg 3.5-4.0% weight reduction. Once salting is carried out and the residual salt is removed, legs are put in resting rooms at temperatures ranging from +1°C to +5 °C with 75% humidity ca. for 60 to 90 days. During this stage, called "resting" phase, the salt penetrate deeply and uniformly inside the meat and legs lose about 8-10% of their weight. After the resting period, hams are washed with warm water to eliminate salt and any impurities ("washing" phase). Thereafter they are hung on special wood frames (traditionally called "scalere") and stored in large rooms at 15 / 18°C with windows on either side, where the maturing phase is carried out. Windows are opened or closed in order to respect humidity levels that allow gradual and constant drying of the legs, which lose a further 8-10% of their weight. This period is characterized by gradual air-drying of Parma ham and lasts three to four months. During the following "fattening" phase, the cavity around the bare part of the femur bone, the uncovered muscular mass and possible chaps are manually covered with a mixture of ground pork fat and salt traditionally called "sugna", that prevents excessive surface drying. In the seventh month, the "ageing" phase begins: hams are moved to the "cellars", which are colder and less ventilated than maturing rooms. Before being moved, hams are subjected to sampling with a traditional needle, which is inserted into different muscular sites and then sniffed by experts who "test" the evolution of the production process. As briefly described, Parma ham curing phase is traditionally divided into the "maturing" and "ageing" periods. During the ageing phase, hams lose about 5% of their weight. Curing lasts at least 10 months for hams with a final weight of 7-9 kg and at least 12 months for hams weighing more than 9 kg.

Parma ham shelf life at retail can be prolonged only by packaging slices and pieces in protective atmosphere or under vacuum, together with storage at refrigeration temperatures. Chemicals, preservatives or other kinds of additives are indeed strongly forbidden by the Parma ham “Specifications and Dossier”, just as any preservation treatment apart from refrigeration.

CONCERNS RELATED TO *L. MONOCYTOGENES* CONTAMINATION IN DRY-CURED HAM

Dry-cured ham has always been regarded as a safe product. Long ripening times, refrigeration temperature during the first processing stages, salt adding, constant a_w lowering are all parameters which should warrant high sanitary levels in the cured product (Grisenti *et al* 2004). Hygienic quality of Parma ham has been proved by several studies. In the dry-cured ham the bacterial flora is mainly represented by non-toxicogenic species of *Staphylococcus* spp. On the ham surface *S. xylosum* has a good prevalence, together with bacteria belonging to the genus *Lactococcus*. Microbial flora in the Parma ham core is mainly represented by halotolerant rods (gen. *Corynebacterium*, *Brevibacterium* and *Carnobacterium*). The good hygienic standards of Parma ham are demonstrated by the absence of *Enterobacteriaceae* and *Brochothrix thermosphacta*, together with a low prevalence of hams (less than 1.5%) contaminated by *Staphylococcus aureus*, which levels never exceed 60 CFU/g (Lori *et al* 2005).

Contamination during processing. Recent studies carried out on different types of American dry-cured raw hams (“country-cured ham”, “dry-cured ham”) showed that the dry-curing process is effective in reducing to undetectable levels *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* (Reynolds *et al* 2001; Portocarrero *et al* 2002). Investigations concerning microbial inactivation during Parma ham productive process were performed by Italian microbiologists recently. Particularly, two important microbial challenge tests (MCT) were carried out: the first one was related to the risk of microbial contamination during the salting phase, the second one to the microbial hazards of the fattening phase. Being manually performed, these two steps may be regarded as potential sources of microbial contamination, in addition to the contamination of the meat itself (Barbuti *et al* 2009).

1st Microbial Challenge Test: 62 raw hams were open-surface inoculated just before salting with different strains of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. (inoculums: about 10⁵ CFU/g each). Contemporarily, the hock of each ham was contaminated with *L. monocytogenes* strains only, since a large inoculum of *Salmonella* was likely to cause deep putrefactive spoilage. *L. monocytogenes* isolates were inoculated between the tibia bone and the skin. By the end of the resting period (108 days), all hams were sampled by excision at three sites (cushion, knuckle, hock) and data for both pathogens showed a strong decrease in the number of viable cells (4.48 and 4.06 log₁₀ reductions for *L. monocytogenes* and *Salmonella*, respectively).

2nd Microbial Challenge Test: 12 hams at mid-maturing stage (6 months) were inoculated just before greasing, following the procedure described for the first MCT. After another six-month ageing, hams were finally sampled as previously described.

L. monocytogenes and *Salmonella* spp. were strongly inactivated (4.63 and 4.77 log₁₀ reductions, respectively).

According to these data, the traditional manufacturing process of Parma ham seems to be effective in inactivating *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp., which both decreased more than 4 log₁₀ over the curing phase (Barbuti *et al* 2009).

Recontamination by handling. Dry-cured ham may undergo recontamination by *L. monocytogenes* prior to marketing. As well-known, de-boning, cutting, slicing and packaging procedures could represent sources of contamination in ready-to-eat products. *L. monocytogenes* is a hazard that an establishment producing post-lethality exposed RTE products must control through its HACCP plans or prevent in the processing environment through Sanitation Standard Operation Procedures (SSOPs). The sanitation procedures in the post-lethality processing environment include testing of food contact surfaces to ensure that they are free of *L. monocytogenes* or an indicator microorganism (FSIS 2003; Grisenti *et al* 2004; Comi *et al* 2005). According to recent studies, the prevalence of *L. monocytogenes* in de-boned, cut, or sliced dry-cured Parma ham specimens has been less than 0.3% for years (Comi *et al* 2005).

As *L. monocytogenes* contamination in processing plants seems to be impossible to put at zero, it is absolutely necessary to guarantee that ham contamination, if occurred, could not increase to dangerous levels during the product's shelf-life. During commercialization *L. monocytogenes* behaviour is influenced by storage temperature and by physico-chemical characteristics of dry-cured ham. For these reasons, storage at refrigeration temperature of pre-sliced ham and under-vacuum ham pieces is commonly recommended. Packaging in protective atmosphere, with CO₂ higher than 20%, may extend the lag phase, inhibit the growth and/or cause slight inactivation of *L. monocytogenes*. In order to validate under-vacuum and protective atmosphere packaging techniques, 40 dry-cured hams were tested for a_w values in proximity of the articulation. As a_w values ranged from 0.90 to 0.93, two hams with a_w = 0.90 and a_w = 0.93 values were selected. These hams were cut in pieces and sliced to obtain several sampling units, which were artificially contaminated with 5 different *L. monocytogenes* strains (contamination levels ranged from 1.54 log₁₀/g, to 3.56 log₁₀/g). Contaminated sampling units were packed both vacuum as pieces and under protective atmosphere (30% CO₂, 70% N₂) as slices. Samples were kept both at two refrigeration temperatures (+3° C and +8° C) and at the abuse temperature of 20°C. According to these data, *L. monocytogenes* cannot grow in dry-cured ham pieces or slices vacuum packed or under protective atmosphere, both at +3 and +8°C (recommended refrigeration range for Parma ham) and at 20°C. *L. monocytogenes* growth was not detected even in samples with higher a_w (0.93), although it could be hypothesized on the basis of predictive models (Grisenti *et al* 2004).

In 2007 the Italian Ministry of Health planned a risk assessment for listeriosis in consumers of Parma and San Daniele hams. The risk assessment was performed following international guidelines set by FAO and WHO (2003), to estimate the expected incidence of listeriosis in the normal adult population and in some sub-populations with a heightened susceptibility. A random sampling plan of 306 cured hams at the end of the production chain was planned, with bone-in, de-boned and

vacuum packed sliced ham samples. Based on the prevalence of *L. monocytogenes* positive samples (4.08%) and on the observed contamination levels (maximum detected level: 5 CFU/serving), the expected risk per serving and per annum and the dose-response curve were calculated for each population groups. The risk per serving was found to be low both in normal healthy people (4.7×10^{-10}) and in organ transplanted patients (6.1×10^{-7}), which represent the most susceptible sub-population. As a whole, the annual number of expected case was lower than 2 cases/year. These values were recalculated, using a predictive model, simulating the growth of *L. monocytogenes* in hams with initial contamination of 5 CFU/serving (equal to the maximum level observed in Parma ham), $a_w = 0.94$ (equal to the maximum a_w value observed in Parma ham), during 1-30 days of storage at temperatures between 4 to 10°C and at higher, but less suitable, temperatures between 10 to 25°C. According to these data, the expected probability of infection doubles after 8 days at 4°C and increases 51-fold after 8 days at 10°C. Samples stored at 25°C are at high risk of clinical listeriosis, as during the first three days of storage it increases of about 3 logarithms per day, until the stationary phase of bacterial growth is reached on the 5th day. At 10°C, bacterial growth stabilization is reached on the 30th day of storage. Once the maximum bacterial level is reached (log (CFU)/g around 9.5), the probability of infection per serving in normal adult population is around 10^{-5} . Nevertheless, samples stored at high temperatures for a long time are no more palatable due to bacterial spoilage.

In ham samples stored at 4°C, the predictive model for *L. monocytogenes* growth pointed out that the probability of infection per serving was up to 3.9×10^{-8} in the most susceptible sub-population group, *i.e.* in organ transplant people. This means that the probability of infection after simulating bacterial growth at refrigeration temperature was lower than the probability of infection estimated without bacterial growth. This was undoubtedly an artefact, due to the low inoculum level (5 CFU/serving) selected for *L. monocytogenes* growth simulation, but it was indeed the maximum contamination value observed in Parma ham samples. Moreover, the risk of listeriosis in susceptible population is weakened even because dehydration makes sliced ham no longer palatable after an 8-day long storage at refrigeration temperature, unless it has been vacuum packed. These data proved that due to the low a_w values even in the deeper parts of the ham, bacterial growth has a very slight effect on the probability of illness, even in the worst case-scenario (Giovannini *et al* 2007).

DISCUSSION

Contamination by *L. monocytogenes* in dry-cured ham can occur both prior to processing (raw pork ham) and during salting and fattening of pre-cured products. Cross-contamination after processing may also take place, especially during handling operations prior to commercialization: de-boning, cutting to pieces, slicing and re-packaging can be a source of microbial contamination if good hygiene practices are not followed and appropriate sanitation measures on the processing environment and equipments are not implemented. In order to verify the effectiveness of Parma ham curing process in reducing the growth of *L. monocytogenes*, microbial challenge tests and shelf-life studies have been performed by Italian researches. These studies

showed that the whole curing phase is effective in lowering the a_w values, so that *L. monocytogenes* could be inactivated even in the deeper parts of the ham. Vacuum packaging or under protective atmosphere (30% CO₂ and 70% N₂), together with storage at refrigeration temperatures, provides a good control on bacterial growth. According to the risk assessment for listeriosis in Italian dry cured ham consumers performed by the Italian Ministry of Health, Parma ham is a RTE product at low risk for listeriosis.

Acknowledgements

The authors kindly acknowledge Dr Silvana Barbuti of SSICA (Parma, Italy) for her fundamental cooperation.

REFERENCES

1. Allerberger F. (2003). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 183-189.
2. Barbuti S., Grisenti M. S., Frustoli M. A., Parolari G. (2009). Validation of the manufacturing process of Italian dry-cured ham (Prosciutto) for the inactivation of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. ICoMST n°55, August 16-21 2009, Copenhagen.
3. Bille J., Rocourt J., Swaminathan B. (2003). *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.M., Tenover F.C., Tenover F.C. (Eds.). ASM Press, Washington, 461-467.
4. Bonardi S., Bottarelli A., Fusaro S., Bentley S., Gnappi A., Morini A. (1997). Epidemiological investigation on *Listeria* spp. in a bovine slaughterhouse. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, XVII, 181-187.
5. Bonardi S., Brindani F., Maggi E. (2002). Isolation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. from pigs at slaughter in Italy. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, XXII, 205-210.
6. Borucki M. K., Peppin J. D., White D., Loge F., Call D. R. (2003). Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), 7336-7342.
7. Bremer P. J., Monk I., Butler R. (2002). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 321-325.
8. Comi G., Lovo A., Bortolussi N., Paiani M., Berton A., Bustreo G. (2005). Ionization systems to decontaminate the air of San Daniele dry-cured ham production rooms. *Industrie Alimentari*, XLIV, 1-9.
9. European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the Commission for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. *The EFSA Journal*, 599, 1-42.
10. FAO/WHO. (2003). Hazard characterization for pathogens in food and water. Guidelines. Microbiological Risk Assessment Series, No. 3.
11. Farber J. M., Peterkin P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne

- Pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476-511.
12. Food Safety and Inspection Service (FSIS). (2003). Regulation 9 CFR Part 430 "Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products".
 13. Giovannini A., Migliorati G., Prencipe V., Calderone D., Zuccolo C., Cozzolino P. (2007). Risk Assessment for listeriosis in consumers of Parma and San Daniele hams. *Food Control*, 18, 789-799.
 14. Grisenti M. S., Lori D., Vicini L., Bovis N., Pedrelli T., Barbuti S. (2004). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham in relation to packaging atmosphere and storage temperature. *Industria Conserve*, 79, 3-12.
 15. Krynski E. P., Brown L. J., Marchisello T. J. (1992). Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 55 (4), 246-251.
 16. Lecuit M. (2005). Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 430-436.
 17. Liu D., Lawrence M. L., Ainsworth A. J., Austin F. W. (2005). Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 373-378.
 18. Liu D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645-659.
 19. Lori D., Grisenti M. S., Parolari G., Barbuti S. (2005). Microbiology of dry-cured raw ham. *Industria Conserve*, 80, 23-32.
 20. Low J.C., Donachie W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes*. *The Veterinary Journal*, 153, 9-29.
 21. Ooi S. T., Lorber B. (2005). Gastroenteritis Due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 1327-1332.
 22. Pan Y., Breidt F. Jr., and Kathariou S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7711-7717.
 23. Portocarrero S. M., Newman M., Mikel B. (2002). Reduction of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7 during processing of country-cured hams. *Journal of Food Science*, 67 (5), 1892-1898.
 24. Prosciutto di Parma (Parma Ham) Protected Designation of Origin: Specifications and Dossier pursuant to Article 4 of Council Regulation (EEC) N°2081/92 dated 14th July 1992.
 25. Quinn P. J., Markey B. K., Carter M. E., Donnelly W. J., Leonard F. C. (2002). *Listeria* species. In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Quinn P. J., Markey B. K., Carter M. E., Donnelly W. J., Leonard F. C. (Eds.). Blackwell Science Ltd, Oxford, 72-75.
 26. Ramaswamy V., Cresence V. M., Rejitha J., Mohandas U. L., Dharsana K. S., Suryaprasad P. P., Helan M. V. (2007). *Listeria*: review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 40, 4-13.
 27. Regulation (EEC) No 2081/92 of 14 July 1992 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 24/07/1992. L 208, 1-8.

28. Reynolds A. E., Harrison M. A., Rose-Morrow R., Lyon C. E. (2001). Validation of dry cured ham process for control of pathogens. *Journal of Food Science*, 66 (9), 1373-1379.
29. Schuchat A., Swaminathan B., Broome C.V. (1991). Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 169-183.
30. Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehlan J., Kreft J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584-640.
31. Werbrouck H., Botteldoorn N., Ceelen L., Decostere A., Uyttendaele M., Herman L., Van Coillie E. (2008). Characterization of virulence properties of *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains of different origins. *Zoonoses Public Health*, 55, 242-248.
32. Wesley I. V. (2007). Listeriosis in animals. In: *Listeria*, listeriosis, and food safety. Ryser E. T., Marth E. H. CRC Press, 55-76.

IDENTIFICATION OF THE ICTHYIC SPECIES THROUGH MORPHOLOGIC AND LABORATORY METHODOLOGIES

IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE ITTICHE MEDIANTE METODICHE MORFOLOGICHE E DI LABORATORIO

NICOSIA S. Dario¹; SIGOVINI Giovanni²; IANIERI Adriana³; BRACCHI Pier Giovanni³.

Summary

Due to the increase in fish consumption, frauds (especially substitutions) have also increased in the market and can have both commercial and health side effects. The fight towards these kind of frauds is the task of some special healthcare workers and in particular to veterinarians. The methods used are morphological and laboratory tests. The latter being used when the morphological exam is not possible due to the techniques applied when working the product that will make the product lose its anatomical appearance. Two main techniques can be described: electrophoresis and DNA testing. The aim of this work is to demonstrate how such techniques can be applied by the workers, with some practical examples thus showing the difficulties in putting them into practice and the attention towards fish products in our country.

Keywords

Species, Morphologic, Isoelectrofocusing, DNA.

We wanted to emphasize in these terms also the caution that consumers should use when choosing fish to consume, both in terms of quality (species, origin, freshness, etc.) and in quantity, with more attentive chose made of not bred fishes of more value.

INTRODUCTION

For some years the 'fish food' arouses a growing interest in the world. On the back of a nutritional research persuading on the dietary quality of fish products are gaining more and more advanced positions in the rating and consumer demand.

The greater demand for fish has resulted in the market, especially in recent years, many exotic species that have created serious problems of identification for those who should exercise control functions on it. It must not be omitted another negative element linked to excessive activity of fishing vessels in areas already depleted, as the Adriatic and the Tyrrhenian Sea. This situation has led in many cases the replacement of fish species with others of lesser value, the damage done

¹ DVM; email: dariosn1974@yahoo.it

² Teacher (external) in the Master II° level in Public Health Veterinary-University of Padova - Italy

³ Department of Animal Productions, Veterinary Biotechnology, Quality and Safety of the Foods, University of Parma, Italy

is not only economic-commercial, but could also have implications for health and hygiene, as evidenced by national and community legislation on traceability of fish products. If you consider that more and more frequently fish products, for reasons of convenience, are sold already prepared, ready to eat portions, it becomes increasingly difficult, if not impossible, to recognize the species they belong to since they have been irretrievably lost morphologic characteristics. For this reason, laboratories engaged in food safety have developed new diagnostic methods that can identify the fish product, even after only anatomical fragments.

This paper examined and compared the morphological method as well as the bio-molecular one in order to clearly identify the fish of origin,

MORPHOLOGICAL EVALUATION FOR FISH SPECIES IDENTIFICATION

The first step in combating fraud, particularly those of replacement, comes from the recognition of a species from the morphological point of view. Issues to be considered when recognizing a species are different and are based on more or less obvious details that range from body shape, number, location and shape of fins, as well as patches of colour and different forms, sex, age, shape and position of the mouth with its teeth. There are many distinctive features and each species differs from the other in various characteristics (although sometimes it is just small details that do not immediately leap to the eye), but you must always keep in mind that the veterinary inspector has a limited time and large quantities of fish to be tested, then these characters become the “cornerstone” for instant recognition of the species. We speak therefore of cardinal characters. Of these, the veterinarian has to learn those that are so distinctive, but also quick and easy to analyse [1].

We will try to mention the most important features considered in the distinction of species, and finally how they are used in the inspection area at the moment of approval

PRINCIPLES OF ANATOMY

Firstly, fishes are divided into chondrichthyes and osteichthyes . The former are provided with a cartilaginous skeleton, the second of a bony skeleton. Sharks and rays are part of the first group. The second group includes all others. The bony fishes represent the largest class of existing fishes. They are easily distinguished by sharks due to the typical shape of the latter, the presence of a single gill slit on each side covered by bone complex called operculum. Moreover, the skin of bony fish is covered with scales of various sizes and shapes and intertwined in various ways, although in some species these may be reduced or even absent in other species and can be modified as bony plaques. Finally, unlike most sharks, the caudal fin is often outwardly symmetrical, although the skeleton inside is not

Body Shape

The body of fish has changed considerably during evolution to adapt to different environments and hence the need to find food or defend themselves from predators or become more efficient predators. Based on these considerations body shape can be different as follows:

- *FUSIFORM*: is the most common form. Offers little resistance to water and is

- typical of those fish that travel great distances (**Scombridae**: tuna).
- **FLAT**: these are fishes that live on the bottom and that once still are camouflaged with the background to defend themselves from predators (**Solidae**: sole; **Scophthalmidae**: turbot, and others)
 - **FLATTEN**: two forms are described one flatten on the back and the other on the abdomen. The first offers the opportunity to swim near the surface and is sometimes accompanied by the presence of bulging eyes (**Mugilidae**). The second allows to swim better on the seabed where usually they live and feed. (**Loricariidi**)
 - **COMPRESSED LATERALLY**: typical of those species which live among the rocks as the coral reef and in areas without current (**Ciclididae**).
 - **ANGUILLIFORM**: typical of eels and all those fish that live among the crevices and spaces between the rocks in search of food or to protect themselves from predators. The body is very long and very flexible. (**Anguillidae**; **Murenidae**).
 - **NEEDLE**: the body is elongated and very hard and usually they live on the surface or in the middle of algae where they camouflage themselves (**Belonidae**).
 - **SQUALIFORM (SHARK)**: Their structure is unmistakable. The body is tapered, cylindrical, elongated. However there are some species, such as the family **Squatinae** (sea angels or angel fishes) with a relatively flattened body that differ from the rays only for the gill slits and pectoral fins of triangular shape. Typical is the asymmetric tail called *heterocercal* (see below). Their structure is designed purely for predation.
 - **OVALOID (Balistidae or triggerfishes)**: **Serranidae** (sott.fam. **Epinephelinae**: grouper). Usual large species that do not require high speed.
 - **SQUARED or PARALLELEPIPED**: those fish with stocky and muscular body (**Tetraodontidae**: balloonfish, boxfish; **Ostraciidae**: boxfish) sometimes covered with spines (**Fam: Diodontidae**: blowfish) [2].

Note: To emphasize the concept that the work of the veterinarian is not just taxonomic I would like to stress that for instance a fish flattened dorsally eats near the surface. If this fish lives near the coast and near the ports, it goes without saying that has taken with food also substances such as oil, something that obviously should not be ignored by the veterinary inspector[1].

Moreover, a fish with a fusiform body may be able to travel even long distances. It is therefore important to know these migratory habits and the route travelled since some areas might have been subject to pollution of various kinds.

Tail

The tail of the fish can be divided into two categories: **heterocercal** and **homocercal**. **Heterocercal** means an asymmetric tail and the vertebral column continues in the queue to support the upper lobe in order to give firmness and rigidity (a bit 'like the tail of terrestrial mammals). All *chondrichthyes* have a **heterocercal** tail in which the upper lobe is typically longer than the lower lobe. To these we can add a third type of tail that is called **diphycercal** typical of lampreys. The thresher sharks, once easily detectable in our seas, is a striking example:

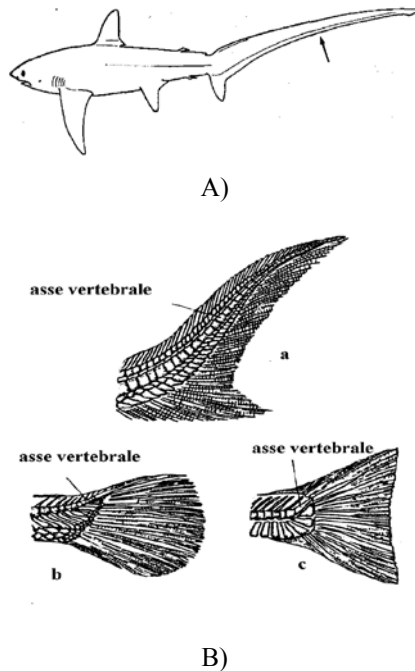


Fig 1: **A)** example of heterocercal tail of a thresher fish (*Alopiidae volpinus*) [4]; **B)** respectively: **a)** Heterocercal; **b)** Diphyrcercal (typical of lampreys); **c)** Homocercal [3].

All the *osteichthyes* have homocercal tails and can be: rounded, truncate, concave, swallowtail pointed (this can be at the end of the tail or continuing on the back and/or under the belly: eel ... *spp.*)

Note: among *osteichthyes* the only species to have a **heterocercal** tail is the sturgeon (*Acipenser spp.*).

Fins

The rays in the fins can be hard or soft, this will help to distinguish *Acanthopterygii* (spiny-ray) from *Malacotterigii* (with soft rays). The number of rays, whether hard or soft, is systematic and therefore useful for distinguishing species, but considering that some species can get to have more than 50, this feature may not always be used for immediate diagnosis

A first distinction can be made with even and odd fins.

The first are the pectoral and ventral, while odd are the backbone (although usually they are 2), caudal and anal (for these the same holds true of the dorsal fin). Based on the number of dorsal and anal fins fishes can be described as: mono dorsal

and mono anal (Clupeidae) bidorsal monoanal (Gadidae) tridorsal bialanal (Gadidae) and so on. Interestingly, when the dorsals are two, the first is spiny and the second is soft, according to a fixed pattern.

Ventral fins take on different names depending on the position:

- *Abdominalas*: posteriori alle pinne pettorali. (*Ciprinidae*, *Salmonidae*).
- *thoracic*: between the front and rear edges of insertion of the pectoral (*Sparidae*).
- *Jugular*: anterior to pectoral fins, between the front edge of pectoral and gill operculum (*Gadidae*).

In addition to these fins there can be structures called *pinnules* (*Sgombridae*, *Gempylidae*) that can run dorsally between the dorsal fin and tail and, centrally, between the anal fin and tail [1].

All the fins of the fish have a distinctive importance and the shape the position and relations between them should be examined.

Gills

One of the fundamental differences in the distinction between chondrichthyes and osteichthyes is the number of gills that are located in the area between the head and trunk. *Chondrichthyes* have from 5 (almost all species) to 7 (*Hexanchidi*) gill slits, whereas the gill slit in bony fish is single and covered by a bone and movable structure called *operculum*. The operculum can be smooth and rounded without any particular sing, or with little teeth (*Serranidae*) or other bone structures like plates. These characteristics vary from species to species for example in the *Serranidae fam.*, there are three spines near the upper edge of the operculum and the *Plyprion americanus (grouper)* that has a bony horizontal ridge near the upper edge.

Scales

A peculiarity of the appearance of the fish immediately striking is that they are covered with flexible armour made of overlapping scales like tiles on a roof. The scales are bone formation with a side inserted into the deep layers of the dermis and the other is free. They form regular queues both in **longitudinal** and **transversal** and **oblique** [2]. The number and size of the scales vary from species to species. Some are free and are protected only by the mucus which in these cases is particularly abundant (catfish, *Ictalurus melas*, bullhead, *Cottus gobio*, sheatfish, *Silurus glanis*).

Useful for identifying and distinguishing scales:

- **Ctenoids**: barbed free margin (eg *Perca fluviatilis*, perch);
- **Cycloid**: the free edge is smooth and rounded (eg *Salmonids* and *Cyprinides*);
- **Ganoids**: bony scales derived from the dermis of the fish (*Storione spp.*)
- **Placoids**: very small scales, characteristic of sharks. These are numerous, very hard and are used for working hard materials.

But the difference in scales is not only between different families. Two different species belonging to the same family may have different scales. An example is given

by *Tetrapturus albidus* and *Tetrapturus Georgea* (family: **Istiophoridae**, gen.: **Tetrapturus**) respectively having elongated scales each bearing one or two spines in the first species; rounded and smooth scales in the front, and a barbed margin in the back, in the second species.

Lateral Line

The lateral line plays an important function enabling the animal to perceive the movement of water in contact with the skin.

The lateral line can run only on the body or part of it and can be up to the tail to end sooner or continue in it (*Ombrina*, *Spp. Fam.: Sciaenidae*). With this feature, for example, should some doubt rise to on the distinction of species with compressed body (eg *Sparidae: dentex*), just make sure the lateral line arrives until the tail. In fact, in Sparidae this stops earlier. In some species (*fam. Exocoetidae*), the lateral line runs beneath the pectoral fins. The lateral line can run more or less regular and display bends more or less marked. *Lophius spp* have developed around the lateral line a number of skin pedicles, one of the distinguishing features to differentiate it from the balloon fish *Tetrodon cutcutia* (see below).

One of the species involved in fraud to the health field, as already mentioned, is the *Ruvettus pretiosus* that can be sold instead of cod. This fish has a typical lateral line covered with bone trabeculae arranged in neat rows and mixed with cycloid scales.

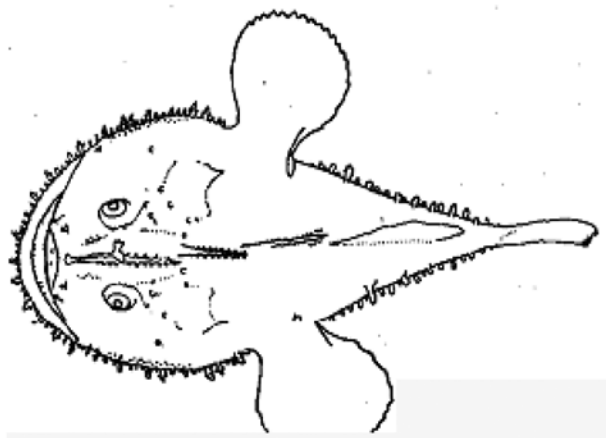


Fig 2: *Lophius piscatorius* (frog fish). Along the later line it has developed skin pedicles. [4]

In some families (*Clupeidae: sardine*) the lateral line can be absent. [4]

Mouth

The mouth of the fish can have different shapes and sizes depending on the species and its use.

In general, when you examine mouth the location, size, shape and the presence or absence of other structures, the depth of the angle of the mouth compared to the eyes have to be taken into account.

According to its position is can be:

- *inferior*: when it is placed under the head;
- *sub terminal, terminal*: when the opening is closed to the frontal part of the head;
- *superior*: when the mouth opening is situated dorsally
- *protractile*: can be protruded forward (eg in hunting sessions) and then be retracted and folded through membranes and bony structures in the mouth.

In addition to this, the mouth corners are also to be considered, if for example they are parallel to the longitudinal axis of the body or directed downwards or upwards and if the lips are straight or if they form a curve that can be more or less pronounced.

Moreover, the structures called barbells should be mentioned, these can be found around the mouth, usually under the chin, and which are characteristic of some families (eg fam. *Gadidae*: hake, cod). The size of the mouth varies from species to species and may be more or less proportionate to the size of the fish, for example the monkfish has a wide mouth that goes from one side of the head to the other and is disproportionate to the rest body

Teeth

The teeth of the fish have different size, shape and number in the various species, with a wide range (from very numerous to absent) not less significant than in land animals. As for the latter fact, the teeth (like the rest of the body) have adapted and changed during the evolution of various species, to the various types of food present in their diet.

They may be present on both jaws (maxillary and premaxillary teeth), on the vomer (sweeps), palate (palatine: *Muraenidae*), on the bones of the pharynx (*pharyngeal*).

In general we can distinguish three main forms: Canine-like and Molare-like, Incisors-like. In the first case their presence suggest purely carnivorous diet with predatory habits in the second case a diet consisting purely of molluscs and this form is used to break the shell; incisors teeth serve to rip the plants and scraping the rocks and the seabed looking for microorganisms [5].

The teeth of sharks are a separate category. They are triangular, flattened and with serrated edges. They are very sharp, arranged in several rows to the inside of the mouth, so that they can replace the outer in case of a fall (eg during predation). It is interesting to highlight the work that evolution has done on these fishes.

Eyes

The eyes have no eyelids, only certain groups such as sharks, have an eyelid called *nictitating*. During evolution, the eyes of the fish have taken different shapes and sizes. We have to consider the size, relationship with head, preorbital width

(space between the corner of the mouth and the eye). Besides the size of the eyes also their position is characteristic of many species. It is interesting to note, however, that large eyes are peculiar of deep sea habitats where light is scarce.

The so-called flatfishes (plaice, sole, turbot, etc. ..) have their eyes placed on the same side of the body (see below).

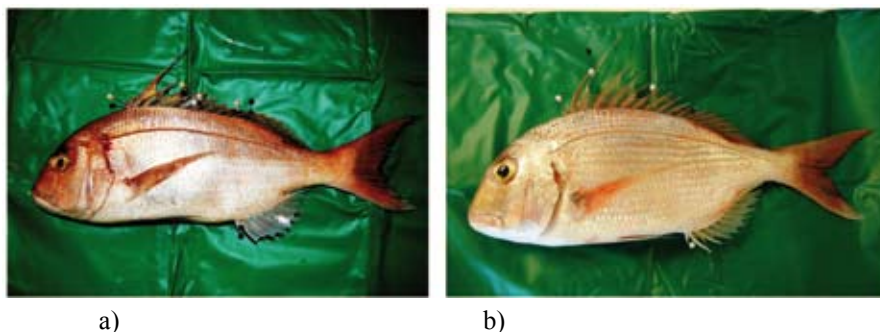
Colour

The colour of the fish can be misleading. This may vary according to the habitat, season, age or sexual dimorphism. So cannot be the only distinctive character unless it is a fundamental and unchanging as for example, patches of varying size and shape characteristics of a species only. [1]

PRATICAL EXAMPLES

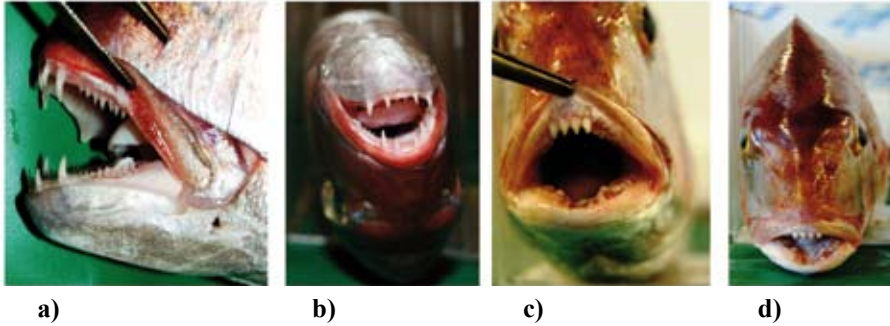
Given the above characteristics, we now describe three cases of rapid identification (between snapper and sea bream) and two others through the use of rapid schematic method (balloon and frog fish; plaice and sole) even considering the possible removal of skin and head.

Picture 1 : in a) *Dentex gibbosus*, pink dentex; in b) *Pagrus caeruleosticus*, Bluespotted seabream. Morphological comparison. [1], [6].



Morphologically they are almost identical and if there would be only one, the identification would be difficult. It can happen even to the expert veterinary inspectors to have some doubts in such recognition. The quickest way is to open the mouth and look at the teeth.

Picture 2: Comparison of teeth of the fishes shown in picture 1. In a) and b), later and frontal view of the *Dentex gibbosus*; in c) and d) frontal view of the *Pagrus caeruleosticus*, where in d) the bottom of the mouth is shown to note the molar-like teeth. [1], [6].



The snapper has canine like teeth throughout the mouth. In front they are more developed while inside they become smaller and arranged in a single row. Photo 2 a) and b). The sea bream hand, has canine like teeth in front, while in the mouth these teeth are replaced by molare like arranged in multiple files in the jaw: c) and d). Finally the sea bream lacks of the canine on the mandible as in (d). [1]

Example 2: Differences between BALLOON FISH and FROG FISH

According to Circular 48 of 13/05/1983 “*importation of fish species belonging to the species Lophius piscatorius commonly called frog fish*”, this species can be marketed only if include the head and skin. If the head is missing, should be present then there should be the first 3 free rays of second dorsal fin. Otherwise the whole lot will be blocked and not allowed to trade.

Tab 1: schematic differences between the balloon fish and the frog fish. [1]

<i>BALLOON FISH</i>	<i>FROG FISH</i>
Square head and mouth small; No modified rays as in frog fish;	Very large head and mouth (characteristic shape); presence of the <i>illicius</i> (first ray modified and used as bait);
Coloration of the skin always brownishn, but uniform; Absence of skin flaps;	Cute naked (no scales); Brown above and whitish on the belly; Skin flaps along the lateral line;
No free rays;	Frist three dorsal rays are free;
Yellowish subcutaneous tela;	pinky subcutaneous tela;
Yellow flesh;	Muscles of light color and glassy appearance (the flesh is an intense white);
The spine has some of the ventral apophyses well developed and strongly calcified (already palpable in the animal intact). It feels like a rosary beads formation arranged in a row	Skeletal structure of the spine without relevant details.

Picture 3: Differences between **frog** and **balloon fish (Fugu)**. In a) and b) the whole subject, easily recognizable in c) and d) we can see how the shape of the fillets is very similar in shape and how flesh colour of vary very slightly.



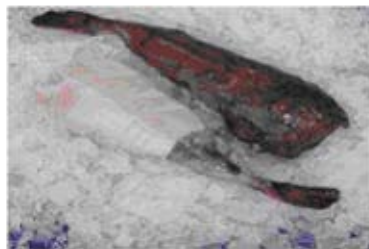
a)



b)



c)



d)

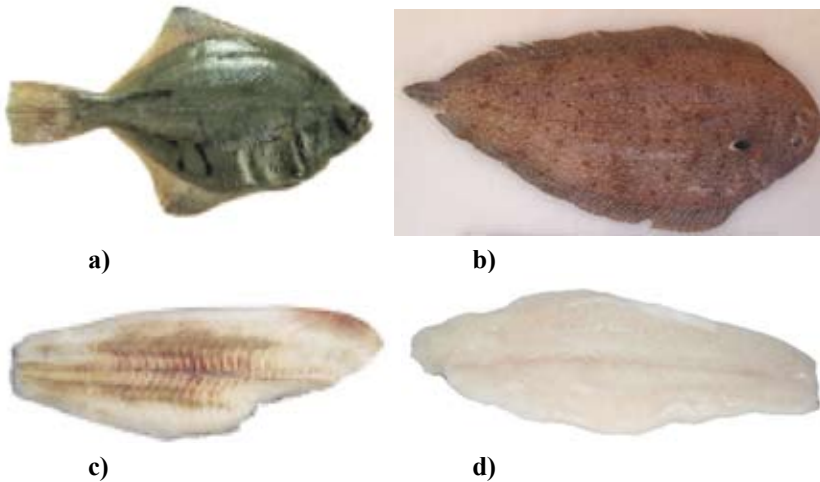
In fact it is not hard to distinguish the two fish when they are complete and with the skin (even when analyzed separately) and it is for this reason that the Circular 48 of 13/05/1983 above mentioned had those requirements. But when the head or skin are removed, the first 3 free rays of the second dorsal in *Lophius* become of particular importance, as well as the colour of the subcutaneous membrane and the flesh itself.

Example 3: Distinction between the PLAICE and the SOLE

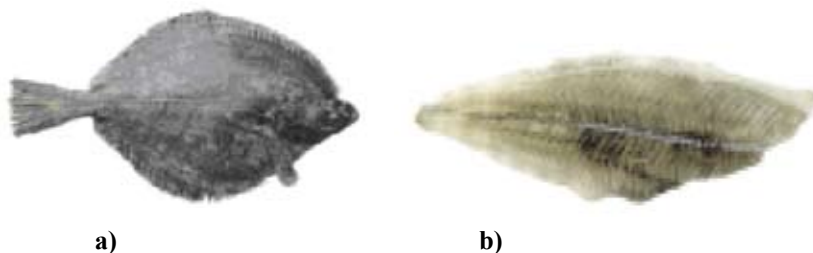
Tab 2: schematic differences between plaice and sole [1]

PLAICE	SOLE
Body more rounded on the side;	Oblonged body;
<i>Terminal mouth;</i>	inferior mouth;
free <i>caudal peduncle</i> (dorsal and ventral fins do not come together in the tail);	marked curve above the eye
Roughness along the lateral line	Lateral line with particular details;
Small denticles at the base of the dorsal and the anal fin	_____
Meat-white-pink with darker shades	Flesh slightly pink and uniform in colour

Picture 4: a) *Plathictys flesus flesus* plaice [8]; b) *Solea impar* sole [8]; c) e d), same fishes in threads. [8]



Picture 5: a) Pacific plaice *Pleuronectes quadrituberculatus*; b) fillet of plaice. [8]



In the whole fish the problem is more related to the distinction of the plaice than the sole (the sole is more elongated), but there is the presence of 5 bony tubercles on the post-orbital ridge. However, compared to plaice, the ridges along the lateral line and small denticles at the base of the dorsal and anal fin are missing. The form of the thread is similar to the other two species, but the flesh is in colour ranging from white to milky. From a market point of view the sole, with its delicate flavour which is very much appreciated, is the one that has a greater economic value. Then comes the plaice, tender and delicate, and at the end the flounder with discreet quality and quite delicate taste.

IDENTIFICATION THROUGH ELECTROPHORETIC TECHNIQUES

The identification of species through morphological evaluation is undoubtedly the first and most important step in combating fraud. However this is only possible when fish are presented in their entirety or at most (for the more experienced eyes) threaded, and again in pieces (for the more experienced eyes). Many times, however, the test material is presented as worked and not recognizable: fish sticks, fish paste, canned (in oil or natural), surimi, flour, etc.. losing each anatomical peculiarity. In these cases, the operators (veterinary inspectors, technicians responsible for maintenance of HACCP within the companies) need to refer to other methods to analyze the nature of the product. The first studies on laboratory methods are born around the 80s. Researchers begin in those years to experiment with different analytical methods to identify and characterize the fish species of commercial interest: the isoelectric focusing (isoelectric focusing also called IEF) [9], electrophoresis with sodium dodecyl sulphate, two-dimensional electrophoresis, liquid chromatography, the enzyme immunoassay [10] and systems derived from the analysis of DNA sequences [11]. The IEF, in particular, has been a widespread procedure, appropriate and officially used in many countries for the identification of species. [8]. However, the methods most used today are the IEF and DNA analysis.

IEF (ISOELECTRIC FOCUSING)

This procedure is based on the principle that molecules with charge can migrate when subjected to an electric field. The support matrix of migration is currently constituted in most cases by a *polyacrylamide* gel or in other cases of agarose.

One of the variants of electrophoresis is the *isoelectric focusing* (IEF): a

technique used to separate protein macro-molecules according to their different isoelectric point. This is a high-resolution method and the separation is by applying a potential difference at the ends of a gel containing a *pH gradient*, formed by the presence in the gel of molecules called *ampholytes* consisting of complex mixtures of synthetic *polyamine- polycarboxylic acids*.

Applications. The IEF technique was used in a recent study [8] aimed to compare the various families of flatfishes (order Pleuronectiformes: flatfish) and families of the order Gadiformes, often subject to voluntary exchanges or not, within marketing, especially if the species concerned are sold already worked: fillets or steaks.

The results obtained are here compared [Fig: 3-4].

Fig. 3 - Isoelectric focusing (pH range 3.5 - 9.5) of muscle proteins extracted from 28 different species of *Pleuronectiformes*. Dashes indicate significant bands of the species discussed in the text. On the left the layout of the protein standard (STD) and their pI; on the right pH gradient. [8]

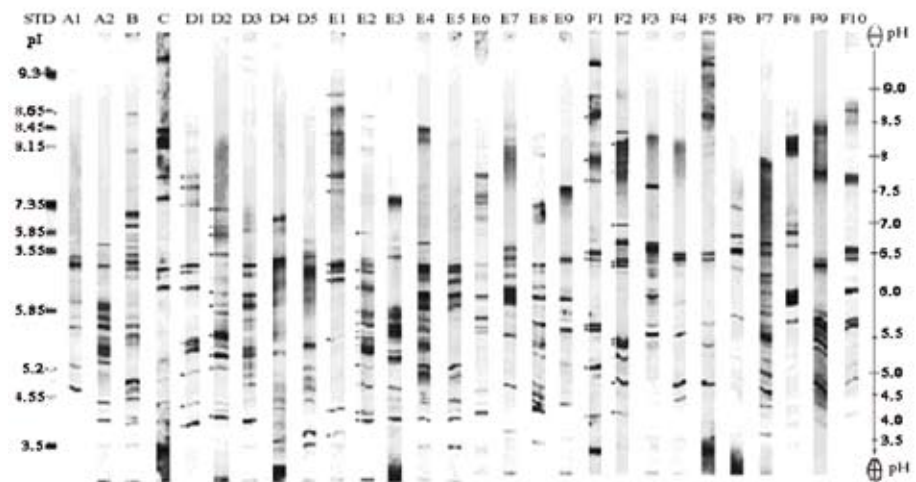
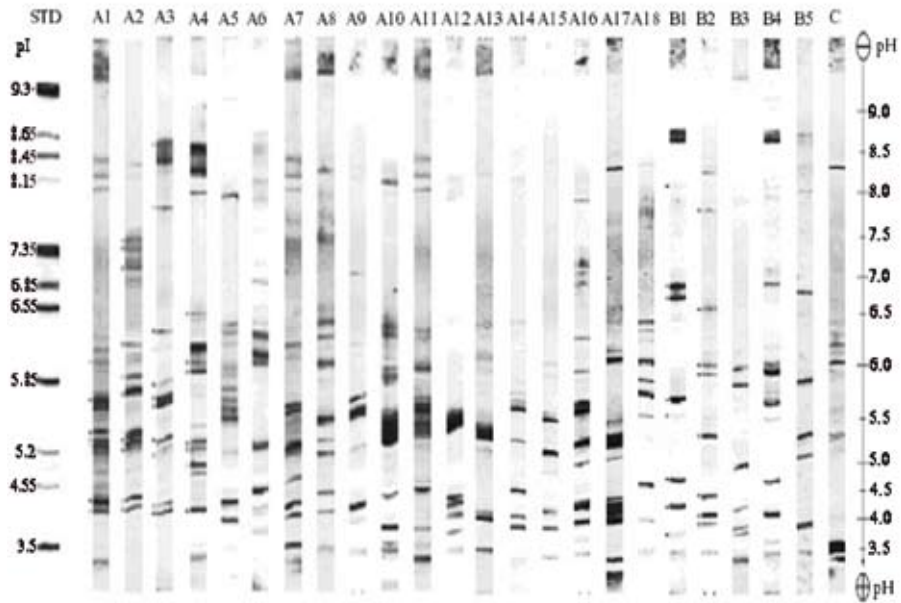


Fig. 4 - isoelectric focusing (pH range 3.5 - 9.5) of muscle proteins extracted from 24 different species of *Gadiformes*. Dashes indicate significant bands of the species discussed in the text. On the left the layout of the protein standard (STD) and their pI; on the right the pH gradient. [8]



TAB 3: The table shows the order family and species treated with IEF.

Orders, Families and Species treated	
Order Pleuronectiformes	Order Gadiformes
<p><u>Fam. BOTIDAE</u></p> <p>A2 <i>Arnoglossus laterna</i>; Scaldfish</p> <p style="text-align: center;">Fam. CITARIDAE</p> <p>B <i>Cytharus linguatula</i></p> <p style="text-align: center;">Fam. CYNOGLOSSIDAE</p> <p>C <i>Cynoglossus sp.</i>; tonguefish</p> <p style="text-align: center;">Fam. SOFTALMIDAE</p> <p>D1 <i>Psetta maxima</i>; Turbot D2 <i>Scophthalmus rhombus</i>; Brill D3 <i>Lepidorhombus boscii</i>; Megrin D4 <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>; Yellow megrim D5 <i>Phrynorhombus regius</i>.</p> <p style="text-align: center;"><u>Fam. PLEURONECTIDAE</u></p> <p>E1 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>; Halibut E2 <i>Reinhardtius hippoglossoides</i>; Halibut (della Groenlandia) E3 <i>Glyptocephalus cynoglossus</i>; Plaice E4 <i>Platichthys flesus flesus</i>; Plaice E5 <i>Platichthys flesus italicus</i>; Glasshead Grenadier E6 <i>Pleuronectes platessa</i>; European plaice E7 <i>Microstomus kitt</i>; Lemon sole E8 <i>Limanda aspera</i>; Yellowfin sole E9 <i>Limanda limanda</i>; Common dab.</p> <p style="text-align: center;"><u>Fam. SOLEIDAE</u></p> <p>F1 <i>Solea vulgaris</i>; Sole F2 <i>Synaptura cadenati</i>; Guinean sole F3 <i>Solea senegalensis</i>; Senegal sole F4 <i>Solea lascaris</i>; sand sole F5 <i>Pegusa triophthalma</i>; Cyclope sole F6 <i>Pegusa kleini</i>; Turkish sole F7 <i>Monochirus hispidus</i>; Whiskered sole F8 <i>Microchirus variegatus</i>; Thickback sole F9 <i>Microchirus ocellatus</i>; Foureyed sole F10 <i>Buglossidium luteum</i>; solenette.</p>	<p style="text-align: center;"><u>Fam. GADIDAE</u></p> <p>A1 <i>Gadus macrocephalus</i>; Cod A2 <i>Gadus morhua morhua</i>; Cod A3 <i>Melanogrammus aeglefinus</i>; Haddock A4 <i>Pollachius virens</i>; Pollock A5 <i>Pollachius pollachius</i>; Pollack A6 <i>Theragra chalcogramma</i>; Alaska Pollack A7 <i>Brosme brosme</i>; Brosme A8 <i>Merlangius merlangus</i>; Whiting A9 <i>Micromesistius poutassou</i>; blue whiting A10 <i>Molva dypterygia macrophthalma</i>; Ling A11 <i>Molva molva</i>; Ling A12 <i>Phycis blennoides</i>; Greater forkbeard A13 <i>Phycis phycis</i>; forkbeard A14 <i>Gaidropsarus sp.</i>; Rockling A15 <i>Trisopterus luscus</i>; Bib A16 <i>Trisopterus minutus capelanus</i>; Poor cod A17 <i>Gadiculus argenteus argenteus</i>; Silvery cod A18 <i>Lota lota</i>; Burbot.</p> <p style="text-align: center;"><u>Fam. MERLUCCIDAE</u></p> <p>B1 <i>Merluccius merluccius</i>; hake or cod B2 <i>Merluccius hubbsi</i>; hake or cod B3 <i>Merluccius capensis</i>; hake or cod B4 <i>Macruronus novazelandiae</i>; hake or cod B5 <i>Macruronus magellanicus</i> hake or cod</p> <p style="text-align: center;"><u>Fam. MACRURIDAE</u></p> <p>C <i>Hymenocephalus italicus</i>; Glasshead Grenadier</p>

The species analyzed with this technique, in this work are among those with the greatest economic interest and therefore more easily subject to fraud substitution. The IEF method however is not without drawbacks. In some patterns (and for some species) there may be polymorphisms and therefore differences of bands within the same species, however, this concern few bands: one or two at most. This detail does not affect the validity of the technique and the specificity that it offers, because interspecific differences are always greater than intraspecific [8]. Other species are more susceptible to these polymorphisms such as tuna, where interspecific paths are difficult to distinguish. To overcome these limitations you can use other variants of electrophoresis, such as two-dimensional electrophoresis (IEF followed by SDS-electrophoresis) and you can correctly discriminate species. [8]

GONOME ANALYSIS

As already seen, the incorrect description of the fraudulent content on food labels is a common problem, especially for products with high added value that reach high prices. In order to demonstrate conclusively that there has been fraud, the analysis and quantification of foods that make the product is required. Very often these are similar in “biochemical” terms to the products they replace, making their identification and quantification extremely difficult. [13]

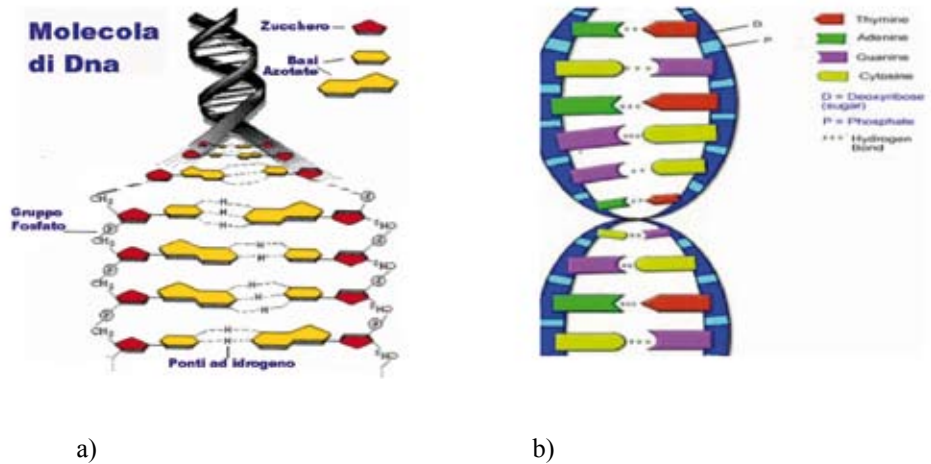
Besides this, many manufacturing processes, preparation and storage proteins degrade to the point they can no longer obtain a reliable result with methods such as IEF. For these reasons (and others) the development of techniques that include genome analysis have proved crucial in distinguishing species and identification of components of a food.

DNA STRUCTURE

DNA is a polymer that contains genetic information and which are typically different for each species and provide the basis for biodiversity. It consists of a long chain of nucleotides linked together to form a double helix.

Nucleotides are composed of nitrogenous bases + sugars (deoxyribose). The former are placed back into the chain while the sugars are more external. Hydrogen bridges (internally to join nitrogen bases) give strength to the structure, while outside are phosphates groups (to combine the sugars).

Fig.5: in a) DNA structure: Position of the nitrogenous bases, sugar and bonds by hydrogen bridges and phosphate groups; in b): sample sequence of DNA chain and base pairing.



The nitrogen bases are four: thymine (T), adenine (A), cytosine (C), guanine (G). The pairing of these bases follows the rule states that T - A, C - G. These pairs are repeated in different sequences depending on the species.

WHY THE DNA?

Those techniques that analyze the DNA polymers allow to overcome some limitations due to the type of transforming procedure that the fish has undergone, such as heat treatment (pasteurization, cooking, freezing, etc.) or dipping in a preservation milieu such as olive or seed oil. Additionally it resists to the action of decay (for this is shown in lots of expired products and in very poor condition).

The method of identification through DNA has high sensitivity since the genomic differences between two species are more numerous than morphological differences. As then, the morphological characteristics can be influenced by the environment (eg pollution) or the stage of development, the DNA does not vary and is identical in all tissues.

With this technique, finally, the amount of material needed for analysis is much smaller than other techniques: a few base pairs are sufficient to the laboratory for identifying species.

WHICH DNA?

DNA is present in all cells but can be contained in two structures: the nucleus and mitochondria. The DNA of the nucleus comes from the father, while the mitochondrial DNA comes from the mother. This is a controversial theory and probably not valid for all living beings.

Mitochondria have their own DNA and they are believed to have evolved separately, although many of the proteins in mitochondria are encoded by nuclear DNA.

Unlike nuclear DNA, however, the mtDNA is not changed in the transition from parent to child. Due to this high stability, the mtDNA (circular) is considered a valuable tool for reconstructing the characteristics of a species (tracing back the whole female line) and was used in this way also to study many species generations dating back several hundred years. [14]

Thus for diagnostic purposes both types of DNA can be used, however, the mitochondrial is preferred for several reasons: the partial or complete sequences of many species are already known [13] has low variability; evolves faster than nucDNA and it is smaller than the nucDNA (more manageable) [14] in every cell there are multiple copies (approximately 1000 more than nDNA).

It's worth noting that in forensic medicine mtDNA is not used because it can easily be contaminated: just touching it or breathing can alter it. However it is little affected by the processing and storage which the fish is often subjected, therefore reliability is high

TECHNIQUES AND MECHANISMS

DNA analysis consist in the identification of polymorphisms, therefore of those molecular differences at the DNA level present in each species. Every modern technique relies on the PCR (Polymerase Chain Reaction), used in many variations.

PCR (Polimerase Chain Reaction)

The PCR technique can amplify a certain amount of DNA molecules in a very short time. In general, the DNA fragment to be amplified is incubated with the enzyme DNA polymerase (with the specific role of copy genomic sequences) and nucleic acid molecules called primers (primer). Each primer starts a reaction amplification of a particular trait, then the process does not need to isolate specific genomic sequences from the outset but is able, together with molecules of various kinds, to duplicate one concerned by the action of the primer. The process takes a few hours and this time you can get billions of copies of the desired sequence. [15]

Some Technical Considerations. Currently all methods of species identification based on DNA analysis using PCR, at boiling temperatures (cooking and sterilization) DNA undergoes degradation therefore fragments of 200 bp maximum information must be selected, and many processed products are stored in different matrices such as oil, grease, materials of vegetable, animal tissues, food additives, for which DNA extraction procedures must be optimized to remove these matrices, which often prevent gene amplification (PCR inhibitors).

Variants of PCR used are: Length: PCR-RFLP, RAPD, VNTR, AFLP, sequence: sequencing, SNP, RT-PCR (TaqMan Probe); Conformation: SSCP.

Usually when you get to use (in the identification of species) DNA fragment, in addition to being low in quantity, is also degraded, making it even less the amount of available bases available. The amplification process consists of the repetition of cycles that can reach a number between 45 and 55. [13]

The problem is that you can not go beyond 55 cycles because the substrate already at the 30th cycle tends to run out (Fig. 6).

Contaminations

Whereas PCR is a highly sensitive technique, it is possible that a certain amount of exogenous DNA can be amplified instead of what you want to copy. Therefore samples should be handled as little as possible and with all the necessary precautions to avoid possible contamination [13]. Contaminants, however, can also be those substances that can inhibit the reaction. Compounds such as lipids, polysaccharides, phenols, glycogen, protein, Fe, Co, bacteria, DNA target are inhibitors of the PCR reaction. Besides these, the matrix in which are preserved, (olive oil or seeds) could inhibit the response by possibly think of a shortage of the sample.

The sample therefore has an important role in the success of PCR. [13]. Moreover, each new substrate from which we must extract DNA requires a specific protocol for sampling.

In Table 4 is an example of a protocol used for the identification of certain species of food fish, some of which are used for infant feeding.

Tab. 4

ANALISED PRODUCT	TARGET SPECIES	METHOD OF EXTRACTION	TARGET SEGMENT (MARKER)	SIEZE OF THE SEGMENT (bp)
1) Product in box	Tuna	Chloroform, methanol, water	Cyt b	171
2) Product in box	Sardina	Chelex ¹ , phenol, chloroform, isoamyl alcohol	Cyt b	152
3) Products made of meat or blood, pet food, baby food	Fish (as well as ruminants, birds and pigs)	Dneasy Tissue kit ²	12s RNA, tRNA ^{Val} , 16S rDNA	104 - 290
4) Caviar	Sturgeon spp	Unknown	Cyt b, 16s, 12s	Unknown
5) soup, dried fins,	Shark spp	Phenol-chloroform; Dneasy ²	Cyt b	155 - 188

¹[17]; ²[18]; 1) [19]; 2) [20]; 3) [21]; 4) [22]; 5) [23].

MARKERS FOR SPECIES IDENTIFICATION

The target sequence that you want to amplify is called *marker*. The best marker is the one which has a significant difference between species (especially among the closest phylogenetic point of view) and having little or no variability within the same species. Furthermore, this marker should have been already extensively studied to obtain information, data, comparisons (or the same protocols as mentioned above), which can provide quick access to the use of PCR technique and not less, allowing a comparison between the sudden analyzed sample and one already known (possibly in a database) [14].

Vertebrate *cytochrome b* (*Cyt b*, Table 1), largely meets these requirements. It 's the most studied gene, it is present in more than half of the studies on DNA

of species and also has two main features: it has conserved regions that allow the determination of universal primers, which can be used to amplify DNA from a wide range of vertebrate species, has regions of high variability that allows the study of evolution of species. Over the years, other markers have been studied, however, the cytochrome b is more used. [16]

To date most commonly used techniques that exploit the principle of PCR: PCR-RFLP and Real-time - PCR.

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

This laboratory technique compares the different DNA molecules. The first phase of this technique involves the extraction and purification of DNA from an individual sample, the extract is then immediately passed to the cutting of the sample restriction fragments using restriction enzymes called *endonucleases* that implement the cut only at a particular nucleotide sequences specific for each enzyme, the restriction fragments are then separated by length using electrophoresis on agarose gel, through the technique known as *Southern-blot* hybridization you can identify bands determined by the hybridization with probes radioactively labeled or by means of fluorochromes; the differences between the genotypes are determined by the number of bands that appear using the same probe for hybridization and that in turn is determined by the number of cutting sites in the sequence considered.

Interpretation of the Results

The distance between the cutting positions caused by restriction enzymes (called *restriction sites*) varies from one individual to another, thus giving rise to variations in the length of the fragments. This is reflected in a different position of some bands on the gel, hence the term *polymorphism*. This difference can be used to distinguish genetically two individuals or to show any genetic relationships. Within species, such reports can be displayed to highlight the relationship (Family, Order, etc.).

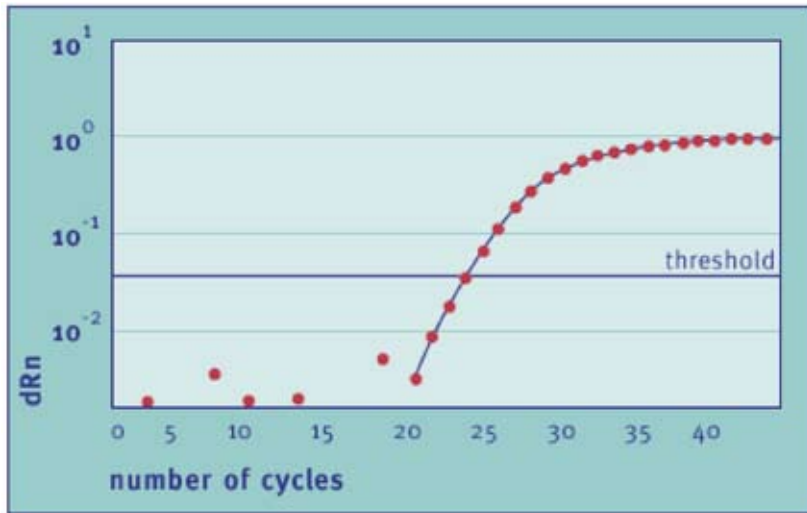
A limitation of this technique is the simultaneous presence of several different species in the same food. This problem has been solved by other techniques such as Single nucleotide polymorphisms (SNP) multiplex PCR, real-time PCR.

Real-Time PCR

The real-time PCR, also known as quantitative PCR or real-time quantitative PCR (rtq-PCR) is a method of simultaneous DNA amplification and quantification. With this technique, DNA is amplified by DNA polymerase reactions (as above) and after each cycle of amplification the DNA is quantified by staining with fluorescent probes attached to specific intercalated with the DNA molecule. When the polymerase (specially designed by pharmaceutical companies) acts by attaching to specific sequence to copy those same stretches of DNA occupied by the probes, the probes detach releasing the fluorescent substances in solution, producing a luminescence that is proportional to the concentration of amplified specific. Considering that the reaction is automatic and followed by a computer, the luminescence is shown in the chart by the computer itself.

Thus at each step, you can quantify the amplification reaction, seeing how DNA is duplicated. In principle, the amount doubles with each step, but around 45 ° -55 ° cycle, the reaction stops because it is lacking the substrate. The diagram of fluorescence on the number of cycles thus assumes a sigmoid pattern (Fig: 6)

Fig 6: Graph that measures the luminescence during the various cycles of PCR. Note the growing trend of the curve at the beginning doubles from cycle to cycle and then decreased as early as at 30th cycle and stop at around 40



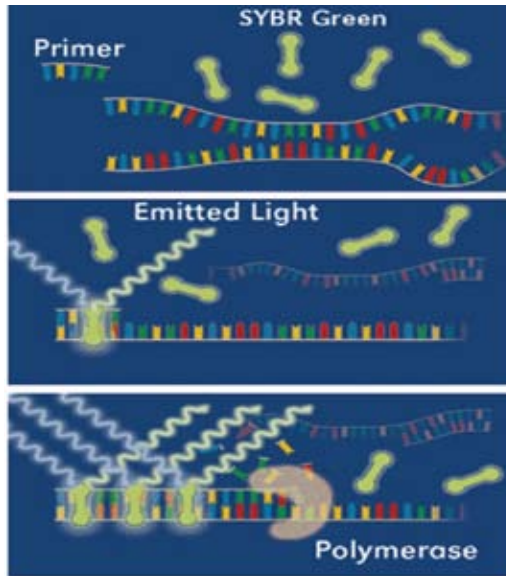
Similar to PCR reactions, several steps are required to develop a quantitative PCR. These include: the production of clean mold filaments, designing primers, optimizing reaction states.

The probes typically used are often the *TaqMan* and *SYBR Green*.

The *TaqMan* probe is an oligonucleotide sequence complementary to a specific sequence on the cDNA (which binds hybrid), whose ends are covalently linked to two different fluorochromes: the 5' end is linked to a reporter, while the 3' to a *quencher*. The reporter is a strong emitter of light, while shielding the quencher absorbs the reporter when they are close to the probe. During the reaction the activity of *Taq polymerase* detaches from the probe target sequence, releasing quencher and reporter. This then is able to emit light without being absorbed by the quencher and the intensity of the light, then detectable is proportional to the amount of amplified product.

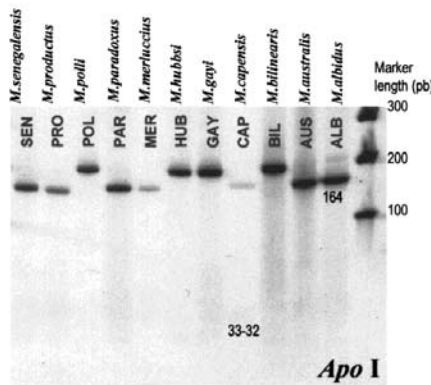
The probe *SYBR Green I* is an *intercalating agent* that binds preferentially to double stranded DNA (dsDNA). In general, the DNA-dye complex absorbs blue light at a wavelength $\lambda_{max} = 488$ nm and emits green light $\lambda_{max} = 522$ nm.

Fig.7: description of how the SYBR Green probe works



An example of application of genome analysis in the identification of fish species is shown in Figure 8, which highlights various species of the genus *Merluccius* compared to highlight the polymorphisms.

Fig 8: Restriction analysis of cytochrome b for species belonging to the family Merlucciidae (Quiriteiro et al., J. Food Chem., 2001, 49, 5108)



Internationally, we are creating a database where we data collect progressively in the identification of species are stored. The development of a technique called DNA *barcoding* is ongoing and will help in the near future, to quickly identify the species based on bands similar to that of Fig.8 being able to assign each individual to a species, classifying it with the bar code as for commercial products (hence the name “Barcode”).

It ‘s a technique used to characterize different organisms through the sequence of a short stretch of DNA, the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI). This is a molecular diagnostic tool to identify highly efficient a variety of taxa.

In 2003 the CBOL (Consortium for Barcode of Life) was born, it’s a project that brings together and coordinates the groups involved with different projects in the library barcode of all eukaryotic life.

The FISH-BOL is the project involved the collection of barcode of marine (over 30,000), fish freshwater and estuary species and is organized in a central committee and regional working groups, including a European one [24].

Researchers from 25 nations participate to this project whose objective is to create a large database: it will make possible the fully automated identification of most specimens. This automation will improve the ability to monitor, understand and manage biodiversity with advantages in science, forensic, epidemiological and economic.

CONCLUSION

In the last ten years the market for fish products has undergone a massive increase in trade, also for reasons of fashion. The consumption of fish is very detailed and focused only for certain products that are considered to be more valuable than others. For this reason many of the fraud in this area are intended to replace these products with others of inferior quality.

For this reason, controls by veterinary inspectors of the health service or other support organizations such as NAS, traffic police, park rangers and others have been implemented, with seriousness and rigor. The first step to defend the consumer is certainly the morphological evaluation of the fish. An operation that requires experience, skill and safety, taking into consideration that when a lot is not in accordance with the law, it must be withdrawn from the market. The veterinary inspector has little time to make a decision, given the high perishability of the products.

It should be noted that the recognition of species is merely a first act that has to be followed by qualitative determination regarding fish products. The task of a veterinary inspector is to admit to the consumption and to the market a healthy, edible and enjoyable product.

The sea bream of the example previously shown, may (in certain periods of the year and if from certain areas) to be toxic as it contains *ciguatoxin*. Similarly it may happen with grouper and shellfish. For this reason it is not sufficient to consider only a purely taxonomic evaluation of the various species and the veterinary inspector must also know the eating, territorial, migration habits etc.. Only in this way he can judge with knowledge and belief (even in case of appeals, before any courts) the

validity of investigations concerning the release for consumption of food fish. This objective is the result of experience and a continuous visits to the markets or other similar structures.

It was found that the recent molecular biology techniques in the field of proteomics (electrophoresis) and that of the genomic (DNA) have provided important tools for operators in the fisheries sector. It is therefore possible to identify the products even when the eye of the expert must surrender to obvious limitations. Indeed canned products, processed (such as fish sticks) or filleted do not allow to perform the classical morphological investigation.

The future in this area need further improvements of these techniques (for example for tuna the tracks between the different species are difficult to distinguish simply by IEF. A variation of this technique is under evaluation: the two-dimensional electrophoresis, IEF followed by SDS electrophoresis) and the creation of global databases in which to pour the knowledge learned and discoveries, to facilitate the work of the laboratories and increase the dependability of supervisory tools and their speed of action.

Regarding the study of the genome, an example is the *DNA-Barcoding* project, which aims to catalogue the various species and submit their tracks as a bar code that, once inserted into the global computer network, will enable a comparison quick and fast of the results obtained in various laboratories of control.

Fish-bol is the project that aims to bring together all the barcodes of fish, whether marine, freshwater or estuarine.

Currently, most energy is drawn to identify the families of fish with high commercial value such as *Gadidae*, *Merluccidae*, *Soleidae*, *Pleuronectidae*, *Sparidae*, *Clupeidae*, *Scombridae*, and others.

Indeed these are the families that more often one can find as frozen or canned. At the same time species such as swordfish are also tracked, since the meat can easily be replaced by that of sharks.

In general, however, worldwide, Italy is a country where the emphasis in the food sector is greatest with highest levels in quality and consistency of commitment.

Considering that it is always possible to improve, one should hope that the future will bring innovations in technology as well as in legislation, so to simplify and make more effective the control exerted by various organs, thereby assuring the consumer in terms of quality, health and safety of seafood.

Hopefully and most importantly, that consumers become also aware of the serious condition facing the sea and the fish and that they buy wisely, respecting the biological needs of fish species: not always bred fish is of less quality of then the fish caught

Acknowledgments

I would like to acknowledge Dr. Ilaria Guarniero and Dr. Valentina Tepedino for all the material promptly and kindly provided.

REFERENCES

1. Sigovini G. (2009). Comunicazione personale, Lido di Jesolo, Luglio 2009;
2. <http://it.wikipedia.org/wiki/Pesce>;
3. <http://users.uniud.it/fazzini/anItt/osseo/Image302.gif>;
4. Fischer W., Schneider M., Bauchot M.-L. (1987): “Fiches fao d’identification des especes pour les besoins de la peche”, Mediterranee et Mer Noire, zone de peche 37, révision 1, Vol II : Vertebres;
5. <http://wapedia.mobi/it/Pesce>;
6. Sigovini G. 2009 : Per gentile concessione;
7. <http://pescaalmare.altervista.org/pesci/rana-pescatrice.php>
8. Tepedino V., Raimondi-Evalli S., Berrini A., Borromeo V, Secchi C., Manzoni P. (2004): “IEF : una metodica rapida ed efficace” ; “IEF : a fast and efficacious method”, Eurofishmarket, febbraio (2004), 16-26;
9. Secchi C., Soncini G., Berrini A., Russo V., Biondi P.A. (1982): Archivio veterinario, 5-6;
10. Cespedes A., Garcia T., Carrera E., Gonzales I., Fernandez A., Asensio L., Hernandez P.E., Martin R. (1999): J. Food Protect. 62, 1178-1182;
11. Cespedes A., Garcia T., Carrera E., Gonzales I., Fernandez A., Hernandez P.E., Martin R. (1999): J. AOAC Int., 82, 903-907;
12. <http://www.fishbase.org/search.cfm>;
13. AOAC Official Methods of Analysis (1990), Species Identification. 980.16 Identification of Fish Species. Thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing method. Final Action. P., 885;
14. “Food and forensic molecular identification: update and callenges”; Trends in biotechnology ,Vol.23 No.7, july 2005;
15. <http://it.wikipedia.org/wiki/MtDNA>;
16. Kocher T.D. et al. (1989): “Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers”. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 6196–6200;
17. BioRAAd, <http://www.bio-rad.com>;
18. Applied Biosystems <http://www.appliedbiosystems.com>;
19. Terol J. et al. (2002): “Statistical validation of the identification of tuna species: bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences”. J. Agric. Food Chem. 50, 963–969;
20. Jerome M. et al. (2003): “Direct sequencing method for species identification of canned sardine and sardine-type products”. J. Agric. Food Chem. 51, 7326–7332;
21. Dalmaso A. et al. (2004): “A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs”. Mol. Cell. Probes 18, 81–87;
22. DeSalle R. and Birstein V. (1996): “PCR identification of black caviar”. Nature 381, 197–198;
23. Hoelzel A.R. (2001): “Shark fishing in fin soup.”, Cons Genet 2, 69–72;
24. <http://www.fishbol.org/>

RESIDUES IN FOODSTUFFS

RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

SIGNORINI Giancarlo¹, BIAGI Giulia², LUCHETTI Elena²,
NANNIPIERI Sandra³, MARZOTTO Giampaolo³, RONCAIA Angelo⁴

Summary

The authors suggest that official controls on foodstuffs should be made throughout the whole production chain. To avoid drug residues, official controls on foodstuffs should be made from primary production to processing, storage, transportation, and commerce, until the administration and consumption. In fact the presence of drug residues can be detected in meat, fish, milk, eggs and honey also to very low levels by the increasingly sophisticated laboratory techniques.

Keywords

Drug residues, food, controls

INTRODUZIONE

In Medicina Veterinaria il farmaco è impiegato sia come profilattico-terapeutico, e quindi per prevenire e curare le varie patologie degli animali, che come auxinico, e quindi per favorire l'accrescimento ponderale degli animali di interesse zootecnico. Il medicinale veterinario, pertanto, è considerato non solo come sostanza ad azione farmacologicamente attiva, ma anche come fattore "economico-produttivo": è ormai accertato infatti che senza l'uso di molecole ad azione farmacologica non sarebbe stato possibile conseguire l'attuale livello quali-quantitativo delle produzioni zootecniche. Negli allevamenti l'uso del farmaco è diventato un elemento costante ed indispensabile; tuttavia non dobbiamo dimenticare che esso può provocare ripercussioni sulla salute del consumatore per i problemi derivanti dall'eventuale presenza negli alimenti di origine animale (o.a.) di residui farmacologici che, grazie alle sempre più sofisticate tecniche di laboratorio è oggi possibile rilevare in tenori sempre più bassi in tutti i prodotti di o.a. (carne, pesce, latte, uova, miele).

L'obiettivo generale della politica di sicurezza alimentare dell'Unione Europea è stato da sempre quello di garantire un elevato livello di protezione della salute umana e degli animali tramite un incremento dei controlli sull'intera catena alimentare ponendo la qualità, indissociabile dalla sicurezza alimentare, al centro delle preoccupazioni. Pertanto, in considerazione dell'importante ruolo che ha l'impiego di medicinali veterinari nella produzione zootecnica, si è ritenuto

¹ School of Specialization in Animal Origin Food Inspection - Parma University

² Departments of Veterinary Clinic - Pisa University

³ AzUSL Livorno - Veterinary Director

⁴ Freelancer Mantova

necessario addivenire alla determinazione e fissazione di limiti massimi di residui, stabiliti in base a principi generalmente riconosciuti di valutazione dell'innocuità dei residui medesimi la fissazione di tali limiti è stato ed è un obiettivo che il legislatore comunitario si è imposto fin dal 1990 con l'emanazione del Regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio, del 26 giugno 1990, che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale (GU n. L 224, 18/08/1990).

DEFINIZIONI

In base al Regolamento (CEE) n. 2377/90 le definizioni a cui fare riferimento sono le seguenti:

“a) «residui di medicinali veterinari»: tutte le sostanze farmacologicamente attive, siano esse principi attivi, eccipienti e prodotti della degradazione, e i loro metaboliti che rimangano negli alimenti ottenuti da animali cui sia stato somministrato il medicinale veterinario in questione;

b) «limite massimo di residui»: la concentrazione massima di residui risultante dall'uso di un medicinale veterinario (espressa in mg/kg o mg/kg sulla base del peso vivo) che la Comunità può ammettere che sia consentita legalmente o riconosciuta accettabile negli o sugli alimenti. Esso è stabilito sulla base del tipo e del quantitativo del residuo considerato esente da rischi tossicologici per la salute umana secondo il criterio della dose giornaliera accettabile (DGA), o sulla base di una DGA temporanea che utilizzi un fattore di sicurezza supplementare. Tiene anche conto di altri rischi pertinenti per la pubblica sanità e di aspetti di tecnologia alimentare. Nello stabilire un limite massimo di residui (LMR) si tiene conto anche dei residui presenti negli alimenti di origine vegetale e/o provenienti dall'ambiente. Inoltre si può ridurre il LMR per renderlo conforme alle buone prassi nell'impiego dei medicinali veterinari, nella misura in cui sono disponibili metodi analitici pratici”.

La definizione di “tempo di attesa” è riportata nel Decreto Legislativo (D. L.gs) 6 aprile 2006, n. 193 “Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari” (GURI n. 121, 26/05/2006 – SO n. 127), art. 1 lettera g): *“intervallo di tempo che deve intercorrere tra l'ultima somministrazione del medicinale veterinario agli animali nelle normali condizioni d'uso e secondo le disposizioni del presente decreto e l'ottenimento di prodotti alimentari da tali animali per tutelare la salute pubblica garantendo che detti prodotti non contengono residui in quantità superiore ai limiti massimi di residui di sostanze attive, come stabilito ai sensi del regolamento (CEE) 2377/90”.*

Il Regolamento (CEE) n. 2377/90 riporta la definizione di “residui di medicinali veterinari” ma nelle derrate alimentari di o.a. si possono evidenziare altresì residui da xenobiotici, intesi come molecole di qualsiasi tipo, di origine naturale o sintetica, non endogene ad un organismo (compresi i metaboliti che possono acquisire proprietà tossiche diverse e/o più marcate rispetto alla molecola originaria come ad esempio proprietà cancerogene, allergizzanti, capacità di formare legami covalenti stabili con macromolecole organiche, ecc.), che possono esplicare la funzione sia di farmaco sia di tossico, e che comprendono pertanto non solo farmaci, ma anche contaminanti ambientali, tossine di origine animale e vegetale ed infine composti che si originano

in seguito a processi di tipo chimico (es. aggiunta di additivi) o fisico (es. cottura degli alimenti). Più in generale quindi, “residuo” si definisce la quantità di uno xeno biotico che si accumula o si deposita all’interno di cellule, tessuti od organi animali di interesse zootecnico, destinati all’alimentazione umana, pericolosi per la salute dell’uomo.

Vale la pena di ricordare che in Italia, negli anni sessanta, si asseriva che nelle derrate alimentari di o.a. non dovessero assolutamente essere presenti residui di xeno biotici, tanto che il principio a cui fare riferimento era quello del cosiddetto “livello zero o residuo zero”, intendendo che la concentrazione totale di residui in qualsiasi prodotto di o.a., determinata a seguito di specifiche analisi di laboratorio, doveva essere pari a zero. Per vari motivi, e fra questi ricordiamo l’accresciuto inquinamento ambientale a cui dobbiamo la presenza di contaminanti negli alimenti, l’uso a scopo profilattico-terapeutico e auxinico di farmaci negli allevamenti zootecnici sempre in costante aumento, le metodiche di analisi a disposizione per la ricerca dei residui estremamente raffinate e sensibili che consentono di determinare negli alimenti quantità dell’ordine di ppt (parte per trilione, o nanogrammo/Kg) il concetto del “livello zero o residuo zero” è stato abbandonato ed ormai oggi non è più ritenuto valido.

CLASSIFICAZIONE DEI RESIDUI

I residui che si possono reperire negli alimenti di o.a. vengono classificati sia in base alla loro provenienza (residui pervenuti, residui aggiunti e residui neo formati) sia in base alla loro solubilità nei diversi tipi di solventi.

Per quanto riguarda la loro provenienza, i “residui pervenuti” sono quelli riconducibili a xenobiotici pervenuti negli alimenti di o.a. a seguito della contaminazione degli animali produttori di o.a. per cause dirette od indirette (inquinamento ambientale, trattamenti farmacologici a scopo profilattico-terapeutico, contaminazione di mangimi, ecc.). Sono distinti in residui accidentali (quelli che casualmente o per errore raggiungono gli alimenti e che comprendono contaminanti ambientali, quali scarichi industriali, fitofarmaci, metalli pesanti, composti organoclorurati, radionuclidi, ecc.; sostanze ad azione medicamentosa, e cioè farmaci, integratori, auxinici, ecc.; biocontaminanti, micotossine, elaborate da varie specie di miceti presenti nei mangimi) ed i residui intenzionali (quelli correlati a sostanze impiegate volontariamente negli animali e che comprendono sostanze usate a scopo profilattico-terapeutico, come antibiotici, chemioterapici, antiparassitari, ecc. e sostanze impiegate a scopo fraudolento dagli allevatori per migliorare la “performance” degli animali, come ormoni naturali e di sintesi, anabolizzanti, cortisonici, tireostatici, beta-agonisti, ecc.).

I “residui aggiunti” più noti come “additivi”, originano dall’impiego di sostanze volontariamente aggiunte negli alimenti per migliorarne la loro qualità, conservabilità e salubrità.

I “residui neoformati” sono quelli che si formano in alcuni prodotti alimentari come conseguenza di trattamenti di natura fisica (calore, radiazioni, ecc.) oppure chimica a riconosciuta attività mutagena.

Nella Tabella 1 sono schematicamente riportati i residui di xenobiotici rinvenibili negli alimenti di o.a. (carne, latte e derivati).

Tabella 1 - Residui di xenobiotici rinvenibili negli alimenti di o.a. (carne, latte e derivati).

FARMACI IMPIEGATI A SCOPO PROFILATTICO TERAPEUTICO O AUXINICO	Antibiotici	penicilline, tetraciclina, aminoglicosidici, ecc.
	Chemioterapici	sulfonamidici, nitrofuranici, chinolonici, antelmintici, ecc.
	Ormoni	somatotropina bovina rBST, 17-beta-estradiolo, progesterone, ecc.
	Beta-stimolanti	clembuterolo, cimaterolo, ecc.
	Vitamine	vitamina PP, vitamine liposolubili A, D, E, ecc.
	Modulanti la fermentazione ruminale	avoparcina, flavomicina, ecc.
	Carnitina, metionina, ecc.	
	Metalli vari a piccole dosi	Mg, Ca, Cu, ecc.
Selenio ed enzima glutationperossidasi	GSH	
NEGATIVIZZANTI LA PROVA ALLA TUBERCOLINA	Isoniazide	
SOSTANZE INIBENTI NATURALI	Sistema lactoperossidasi-tiocianato-perossido d'idrogeno	
	Lactoferrine, lisozima	
	Acidi grassi liberi	
ANTISETTICI E DISINFETTANTI	Cloro attivo	
	Acqua ossigenata	
	Iodofori e derivati dell'ammonio	
CONSERVANTI	Nitrati e fosfati	
	Mercuriotiolato di sodio, nitrato di metilmercurio, ecc.	
CONTAMINANTI AMBIENTALI	Pesticidi o diserbanti	
	Composti organoalogenati	DDT, DDE, PCB, ecc.
	Antiparassitari vari	
	Metalli	Pb, Hg, Cu, Cd, Ta, ecc.

L'altra classificazione dei residui si basa sulla loro proprietà di essere più o meno solubili in alcuni solventi e quindi sulla possibilità di essere estratti dai tessuti nei quali si accumulano. Si definiscono quindi residui estraibili e residui non estraibili.

I "residui estraibili" sono, dal punto di vista chimico, simili al composto originario e vengono anche definiti "precoci, poiché la loro formazione si determina nei giorni immediatamente successivi all'ingresso dello xenobiotico nell'organismo e sostanzialmente altro non sono che le molecole originarie e/o i loro metaboliti in forma

libera o legati labilmente ai tessuti. Possono essere estratti per mezzo di solventi acquosi di pH diverso ed organici, per idrolisi enzimatica di eventuali metaboliti coniugati e per denaturazione delle proteine con tecniche diverse (precipitazione, denaturazione con urea, ecc.).

I “residui non estraibili o bound residues” sono quelli che si ottengono sottraendo i residui estraibili da quelli totali ed hanno struttura chimica che può essere anche molto diversa dal composto originario. Spesso si tratta di antelmintici quali mebendazolo, cambendazolo ecc., oppure micotossine e più in particolare l’aflatoxina B₁ e vengono anche definiti “persistenti” in quanto fanno la loro comparsa solo dopo lungo tempo. Questo gruppo di residui è ulteriormente suddividibile in “composti così detti endogeni” che si formano per incorporazione della molecola assunta, o di suoi metaboliti, in normali costituenti dell’organismo ed i “nuovi composti”, che vengono originati dal legame più o meno stabile dello xenobiotico assunto, o dei suoi metaboliti, con macromolecole tissutali. I nuovi legami che vengono a formarsi sono spesso di tipo covalente e questa è la ragione della loro stabilità.

Infine ricordiamo che la formazione dei residui degli xenobiotici e la loro eliminazione (e quindi la loro emivita biologica) dipendono da molteplici fattori e più precisamente:

- 1) il grado di liposolubilità della molecola e dei metaboliti,
- 2) le caratteristiche cinetiche della molecola originaria e dei metaboliti,
- 3) la via di esposizione,
- 4) il veicolo della forma farmaceutica,
- 5) i processi di biotrasformazione (ossidazione, riduzione, idrolisi, ecc.),
- 6) la specie, l’età, il sesso,
- 7) le condizioni fisiopatologiche,
- 8) la somministrazione o la possibilità di accesso di più xenobiotici,
- 9) la dose, il numero di somministrazioni (o durata dell’esposizione) ed il relativo intervallo.

RISCHI TOSSICOLOGICI PER L’UOMO

Ricordiamo, in maniera breve e schematica, che i rischi tossicologici che si possono manifestare nell’uomo in conseguenza dell’assunzione di residui xenobiotici presenti negli alimenti di o.a. si dividono in rischi diretti, derivanti dall’assunzione di residui contenuti negli alimenti, ed indiretti, responsabili di fenomeni di resistenza batterica, motivo di fallimenti terapeutici nel trattamento di varie patologie infettive dell’uomo e degli animali sostenute da microrganismi.

I rischi tossicologici diretti per l’uomo si distinguono in fenomeni tossici, manifestazioni allergiche, effetti cancerogeni, effetti mutageni, effetti teratogeni (Tabella 2) e sono dovuti alle più diverse molecole (Tabella 3).

Tabella 2 - Rischi tossicologici diretti per l'uomo

Fenomeni tossici	Manifestazioni allergiche	Effetti cancerogeni	Effetti mutageni	Effetti teratogeni
<p>+ sindromi tossiche a carico di vari organi correlate con l'assunzione anche solo di modeste quantità residuali (in genere ppb e/o raramente ppm) di xenobiotici.</p> <p>+ correlazione in via ipotetica per la difficoltà di essere certi del nesso causa/effetto fra ingestione del contaminante e la manifestazione tossica.</p> <p>+ comprendono anche gli effetti prodotti su specifici organi o apparati bersaglio da alcune molecole</p>	<p>+ in genere solo forme cutanee (prurito, arrossamenti, edemi) raramente con mal di testa e vertigini.</p> <p>+ ingrossamento linfonodale e delle articolazioni, broncospasmo solo nei casi più gravi</p> <p>+ rarissimi edema di Quinck e crisi di tipo anafilattico anche mortali.</p>	<p>+ vari tipi di neoplasie possono comparire anche in animali da laboratorio in seguito all'assunzione di numerosi xenobiotici</p> <p>+ sarebbe pertanto opinabile la completa assenza di tali sostanze negli alimenti ("livello zero").</p> <p>+ possono essere definiti come cancerogeni genotossici o epigenetici a seconda del meccanismo d'azione</p>	<p>+ danni al patrimonio genetico cellulare</p>	<p>+ alterazioni a livello embrionale.</p> <p>+ durante il c.d. "periodo critico della gestazione" è però raro che si riscontrino effetti tossici sull'embrione e sul feto causati da residui presenti negli alimenti e nella maggior parte dei casi riguardano i farmaci.</p> <p>+ poiché la teratogenicità di una molecola è strettamente dose-dipendente, non è possibile definire una dose massima tollerabile negli alimenti sicuramente priva di rischi</p>

Tabella 3 – Molecole imputabili di rischi tossicologici diretti

Fenomeni tossici	Manifestazioni allergiche	Effetti cancerogeni	Effetti mutageni	Effetti teratogeni
<ul style="list-style-type: none"> - CAF - sulfamidici ed aminoglicosidici - tranquillanti - aminoglicosidici - metilmercurio (elevate quantità contenuta nel pesce) - clenbuterolo (0,2-0,5 ppm) (fegati di bovino) 	<ul style="list-style-type: none"> - molecole naturalmente presenti nei cibi (uova, carne, latte, pesce, crostacei, ecc.) - quote residuali di farmaci (antibiotici o chemioterapici) od altri xenobiotici 	<ul style="list-style-type: none"> - farmaci ad uso veterinario - molecole impiegate come “promotori di crescita” - contaminanti ambientali - biocontaminanti - residui aggiunti - residui neoformati 	<ul style="list-style-type: none"> - tossine vegetali - micotossine (A, F, M, ocratossina A, patulina, tossina T-2, zearalenone, ecc.) - residui aggiunti o additivi (acidi formico, benzoico, ortofenilfenolo, biossido di zolfo) - residui neoformati: nitrosamine, idrocarburi aromatici policiclici (come il benzopirene) e amine eterocicliche (IQ, MeIQ, MeIQX). 	<ul style="list-style-type: none"> - residui di antielmintici benzimidazolici (ABZ) presenti nel latte (cambendazolo, parbendazolo, oxifendazolo, albendazolo, febantel, ecc.) responsabili di malformazioni scheletriche nella pecora - DES (assunto da donne in gravidanza può comportare malformazioni a carico dell'apparato genitale maschile come l'ipoplasia testicolare)

VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO DA RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI O.A.

Nel corso degli ultimi decenni la legislazione dei Paesi dell'Unione europea riguardo al rischio tossicologico correlato all'assunzione di residui presenti negli alimenti di o.a. è stata oggetto di costanti e ripetuti cambiamenti per le tenaci richieste portate avanti dall'opinione pubblica e dai movimenti dei consumatori che tendono a prediligere, nelle loro scelte, derrate alimentari di o.a. rispondenti a requisiti qualitativi sempre più sicuri (puntando tendenzialmente all'assenza totale di residui). D'altra parte il legislatore ha anche il dovere di dettare norme che garantiscano la produzione di alimenti salubri, avvalendosi per i controlli di test di tossicità sempre più veloci, sensibili ed attendibili, tenendo tuttavia conto che è alquanto difficile sviluppare in breve tempo metodi di allevamento intensivi contenendo radicalmente l'uso dei farmaci.

Come abbiamo già ricordato la legislazione italiana, e quella di altri Paesi europei, negli anni passati perseguivano il così detto “livello zero o residuo zero” in quanto non ammettevano la presenza di residui di xenobiotici, in particolare modo di farmaci, nelle derrate di o.a. La capacità di misurare con le attuali tecniche analitiche quantità sempre più piccole di residui (fino ai ppt) e la constatazione che la presenza di certe molecole, nonostante la loro pericolosità, non può essere evitata perché o sono

naturalmente presenti negli alimenti o si formano in conseguenza dell'uso di alcuni processi fisici (come il calore per l'affumicamento o la cottura) hanno determinato l'abbandono della ricerca del "livello zero o residuo zero". Il legislatore si è indirizzato quindi verso norme che favoriscono "l'assenza di residui che possono implicare un rischio per la salute del consumatore" ammettendo, per certe molecole, la presenza di una determinata quantità di residuo la cui assunzione giornaliera per tutta la vita sia priva di effetti indesiderati o entro limiti accettabili definendo in questo modo la dose giornaliera tollerata indicata con l'acronimo DGT (o con termini inglesi TDI, Tolerated Daily Intake).

Per la determinazione della DGT è necessario misurare il NOEL (no observed effect level) o NOAEL (no observed adverse effect level) che rappresenta la quantità, misurata in ppm (mg/kg di dieta), di uno xenobiotico che non dà luogo ad effetti biologici apprezzabili se somministrato nella dieta ad animali da laboratorio per lunghi periodi di tempo (intera vita biologica o emivita biologica) scegliendo la specie animale più sensibile. Dopo avere determinato il NOEL per la specie più sensibile, si può trasformare tale valore in ADI animale (acceptable daily intake o DGA, dose giornaliera accettabile), che rappresenta la quantità di xenobiotico (per kg di peso vivo) che può essere assunta per tutta la vita dell'animale senza la comparsa di effetti biologici.

LEGISLAZIONE SUI RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI O.A.

È il Regolamento (CEE) n. 2377/90 che specifica una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale, e che dà la prima definizione di residui di medicinali veterinari e di limite massimo di residui; tali definizioni sono tutt'ora valide nonostante le numerose integrazioni ed i continui aggiornamenti.

Il D. L.gs 6 aprile 2006, n. 193, "Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari" (GU n. 121, 26/05/2006 - SO n. 127), definisce il tempo di attesa come l'*"intervallo di tempo che deve intercorrere tra l'ultima somministrazione del medicinale veterinario agli animali nelle normali condizioni d'uso e secondo le disposizioni del presente decreto e l'ottenimento di prodotti alimentari da tali animali per tutelare la salute pubblica garantendo che detti prodotti non contengono residui in quantità superiore ai limiti massimi di residui di sostanze attive, come stabilito ai sensi del regolamento (CEE) 2377/90"* e i rischi connessi all'utilizzazione del medicinale come *"ogni rischio per la salute animale o umana connesso alla qualità, alla sicurezza ed all'efficacia del medicinale ed ogni rischio di effetti indesiderati sull'ambiente"*.

Il 16 marzo 2006 è stato emanato il D. L.gs n. 158 in attuazione della direttiva 2003/74/CE (GURI n. 98, 28/04/2006) concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali nonché le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti. Questa norma, che abroga il D. L.gs 4 agosto 1999, n. 336 (che aveva sostituito integralmente il D. L.gs n. 118/92) (GURI n. 230, 30/09/1999), e la legge 3 febbraio 1961, n. 4, ha la finalità di esaminare ed evidenziare le ragioni dei rischi di residui (intesi come "residuo di sostanze ad azione farmacologica, di loro prodotti

di trasformazione, nonché di altre sostanze che si trasmettono ai prodotti animali e che possono essere nocivi per la salute umana”) negli animali e nei prodotti di o.a. a livello di allevamenti, macelli, stabilimenti di produzione e trasformazione del pesce e dei centri di raccolta e imballaggio delle uova. Stabilisce anche che il Ministero della salute aggiorni entro il 31 marzo di ogni anno il piano per la ricerca delle categorie di residui o di sostanze elencate nell'allegato II ed informi ogni sei mesi la Commissione europea e gli altri Stati membri in merito all'esecuzione e ai risultati del piano.

Il 9 novembre 2007 è stato poi emanato il D. L.gs n. 232 che apporta modifiche al D. L.gs n. 158/2006. Innanzi tutto ne sostituisce il titolo con *“Attuazione della direttiva 2003/74/CE che modifica la direttiva 96/22/CE del Consiglio, del 29 aprile 1996, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali e della direttiva 96/23/CE, del Consiglio, del 29 aprile 1996, concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti, come modificata dal regolamento 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, nonché abrogazione del decreto legislativo 4 agosto 1999, n. 336”*; estende poi il divieto di somministrazione, detenzione in azienda, immissione sul mercato e trasformazione a tutte le sostanze ad azione anabolizzante oltre a tutte quelle previste all'art. 3, comma 1 (*tireostatici, stilbeni e derivati dello stilbene e loro sali ed esteri, estradiolo-17 beta e suoi derivati sotto forma di esteri e sostanze beta-agoniste e per sostanze ad azione estrogena - diverse dall'estradiolo-17 beta e dai suoi derivati sotto forma di esteri - androgena o gestagena*); stabilisce inoltre il divieto di importazione, anche da Paesi terzi inseriti negli elenchi comunitari da cui questa è autorizzata, di animali da azienda o d'acquacoltura cui siano stati somministrati *“sostanze o prodotti contenenti sostanze beta-agoniste, estrogene, ivi compreso l'estradiolo-17 beta ed i suoi esteri, gestagene ed androgene, nonché qualsiasi altra sostanza ad effetto anabolizzante, salvo che tale somministrazione sia stata effettuata nel rispetto delle disposizioni previste dagli articoli 4, 5 e 7 e nel rispetto dei tempi di sospensione previsti dalla normativa vigente”*. Infine sostituisce l'Allegato II, intitolato *“Categoria di residui o di sostanze da ricercare a seconda del tipo di animali, loro alimenti e acqua di abbeveraggio e del tipo di prodotti animali di origine primaria”*.

PIANO NAZIONALE PER LA RICERCA DEI RESIDUI

Le tendenze dell'Unione Europea sono quelle di intensificare controlli mirati sull'intera filiera produttiva per tutelare sempre più la sanità pubblica ed i consumatori in merito ai prodotti di o. a. dalla presenza di residui eccessivi di sostanze ormai dimostrate pericolose. Il Piano Nazionale per la Ricerca dei Residui (PNR), ormai da diversi anni, risulta essere lo strumento scelto dal legislatore a salvaguardia della salute pubblica e della salubrità degli alimenti di origine animale tanto che ciascun Paese dell'Unione Europea elabora entro la fine di ogni anno un proprio PNR da attuare nel corso dell'anno solare successivo rivedendolo costantemente in base alle nuove conoscenze scientifiche o agli aggiornamenti normativi, ad eventuali specifiche richieste della Commissione Europea, alle variazioni della realtà produttiva del territorio, alle capacità analitiche dei laboratori, ai risultati degli anni precedenti. Il PNR stabilisce essenzialmente la natura dei residui da ricercare, il numero di campioni

da esaminare, le modalità di prelievo del campione, i tessuti e/o fluidi biologici sui quali eseguire le analisi in rapporto ai vari tipi di residui e le metodiche analitiche da utilizzare nei laboratori ufficiali preposti all'esecuzione delle analisi (in Italia gli Istituti Zooprofilattici) per assicurare un'effettuazione dei controlli sulla filiera quanto più possibile omogenea e coordinata fra le varie strutture interessate e per l'Italia le AzUSL, gli Assessorati alla sanità delle Regioni e della Provincia Autonoma di Trento e l'Assessorato all'Agricoltura della Provincia Autonoma di Bolzano, il Ministero della Sanità.

Tutte le sostanze farmacologicamente attive impiegate nell'ambito della Comunità nei medicinali veterinari destinati ad essere somministrati agli animali da produzione alimentare devono essere valutate conformemente al Regolamento (CEE) n. 2377/90 che specifica una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale. La norma stabilisce anche che è possibile modificare le disposizioni contenute negli allegati da I a IV per tutelare la salute dell'uomo o degli animali in seguito alla disponibilità di nuove informazioni o ad un riesame delle informazioni esistenti: dal 1990 ad oggi infatti sono stati emanati tutta una serie di regolamenti che hanno inserito nuove molecole negli allegati o che hanno cambiato gli LMR.

Responsabile del coordinamento di tutte le attività relative alla predisposizione e all'attuazione del PNR è la Direzione Generale della Sanità Veterinaria e degli Alimenti del Ministero della Salute che rappresenta l'Autorità amministrativa competente nei confronti della Unione Europea. Il coordinamento tecnico-scientifico è svolto dall'Istituto Superiore di Sanità, in qualità di Laboratorio Nazionale di Riferimento per i residui. Il Ministero, di concerto con le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano, con il Laboratorio Nazionale di Riferimento per i residui e con gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, predispone il PNR, secondo quanto disposto dalla normativa europea in generale o sulla base di eventuali specifiche richieste comunitarie a seguito dell'emergere di nuovi problemi sanitari, e lo dirama alle Regioni che in base alle caratteristiche del proprio territorio, all'entità del patrimonio zootecnico, al numero di macellazioni, alle movimentazioni di farmaci e mangimi, definiscono il **Piano Regionale Residui**, emanato ed inviato ai Servizi Veterinari delle Zone Territoriali, nel quale vengono definiti numero e modalità di esecuzione dei campioni da effettuare annualmente. Le Regioni attuano il coordinamento dell'attività, la raccolta dei dati prodotti ed il loro invio semestrale al Ministero della Salute.

In Italia, oltre a fare riferimento al Regolamento (CEE) n. 2377/90, di fondamentale importanza per la stesura del PNR è il D. L.gs n. 158/2006, con le modificazioni apportate dal D. L.gs n. 232/2007, norma di recepimento delle Direttive n. 96/22/CE e 96/23/CE (GU L 125, 23/05/1996) concernenti il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali e le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti. Nell'allegato I sono specificate le sostanze a effetto anabolizzante e le sostanze non autorizzate (Categoria A) ed i medicinali veterinari (comprese le sostanze non registrate utilizzabili a fini veterinari) e gli agenti contaminanti (Categoria B); nell'allegato III è esposta dettagliatamente la strategia di campionamento e nell'allegato IV sono definiti i

livelli e la frequenza di campionamento stabilendo per ogni specie animale e per i prodotti dell'acquacoltura il numero minimo di animali che devono essere testati. L'allegato II cui ora fare riferimento, nel quale sono elencate le categorie di residui o di sostanze da ricercare a seconda del tipo di animali, loro alimenti ed acqua di abbeveraggio e del tipo di prodotti animali di origine primaria, è quello abbinato al D. L.gs n. 232/2007.

Il PNR prevede la ricerca di talune molecole che rientrano in due precise categorie stabilite a livello europeo e precisamente la **Categoria A**, che comprende prodotti ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate e quindi sostanze che vengono utilizzate fraudolentemente, ad esempio per incrementare oltre natura il peso dell'animale trattato; e la **Categoria B** che comprende sia i medicinali veterinari, cioè farmaci autorizzati per il trattamento degli animali da reddito, per i quali l'Unione Europea definisce un LMR che non può essere superato nei prodotti destinati al consumo sia i contaminanti ambientali, come i metalli pesanti, i composti organoclorurati, ecc.. che, assorbiti dall'ambiente, si possono trovare nei muscoli o negli organi edibili degli animali. Si concretizza con l'analisi di campioni prelevati lungo tutta la filiera di produzione degli alimenti di o.a. ed interessa i vari settori produttivi: bovino, suino, ovi-caprino, equino, avicolo, cunicolo, dell'acquacoltura, della selvaggina, del latte, delle uova e del miele.

I campionamenti vengono effettuati sia in fase di produzione primaria che negli stabilimenti di prima trasformazione degli alimenti di o.a. i cui responsabili devono adottare un piano aziendale di autocontrollo dal momento che l'obbligo di commercializzare solamente prodotti alimentari provenienti da animali non sottoposti a trattamenti illeciti e nei quali, in caso di somministrazione di medicinali veterinari, sia stato rispettato il previsto tempo di sospensione ricade su di loro.

La strategia di campionamento per accertare la presenza di residui negli alimenti di o.a. si compie mediante tre tipi di attività chiamate "Piano", "Extrapiano" e "Sospetto". Il primo, cioè il "Piano" propriamente detto, prevede il prelievo di campioni programmati in base alla quantità di produzioni nazionali nei diversi settori interessati. In aggiunta, in base alle ricerche previste dal PNR e su parere degli Istituti Zooprofilattici, il Ministero, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano possono programmare ulteriori piani di controllo, gli "Extrapiano", che soddisfano particolari necessità locali o nazionali. Infine, possono essere predisposti dei piani su "Sospetto", cioè si possono organizzare dei prelievi di campioni in tutti i casi in cui si sospetti la presenza di residui o a seguito di non conformità analitiche.

I campioni raccolti vengono inviati ai laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali per essere sottoposti alle specifiche analisi. Sulla base dei risultati analitici, se si riscontra la presenza di residui di sostanze il cui uso è vietato o se si rileva un livello di residui di sostanze autorizzate o di contaminanti ambientali superiore ai limiti fissati, la normativa nazionale e comunitaria a cui fa riferimento il PNR prevede l'attivazione adeguati interventi sanzionatori di tipo amministrativo o penale, nel caso di commercializzazioni di prodotti non conformi, a tutela e salvaguardia della salute pubblica.

Il PNR e tutti i dati relativi ai campionamenti effettuati e ai risultati analitici ottenuti, sono oggetto di un consistente flusso informativo, ormai quasi del tutto

informatizzato sia a livello nazionale che comunitario, che interessa il Ministero competente, gli Assessorati regionali, gli Istituti Zooprofilattici e la Commissione Europea. Inoltre i PNR ed i risultati dei controlli ottenuti in tutti i Paesi dell'Unione Europea sono inseriti nel sistema informatico comunitario in modo che siano immediatamente consultabili sia dalla Commissione Europea e da tutti i Paesi membri.

CONCLUSIONI

Ormai da decenni è noto che le patologie degli animali produttori di alimenti di o.a. possono avere importanti conseguenze sull'**alimentazione umana** e su qualità e sanità dei prodotti di origine animale e quindi la tutela della salute umana passa anche attraverso la tutela della salute animale poiché ciò che mangiamo può essere contaminato da varie sostanze e agenti patogeni o per contaminazione diretta, per la possibile veicolazione di patogeni attraverso gli alimenti o per contaminazione indiretta per trattamenti farmacologici sugli animali. Le sostanze ad azione farmacologicamente attiva vengono impiegate in campo zootecnico non solo per prevenire e curare le diverse patologie ma anche per favorire l'incremento ponderale. A prescindere dallo scopo del loro impiego essi costituiscono comunque un problema igienico sanitario per gli eventuali residui che possono essere evidenziati negli alimenti di o.a. e che possono causare patologie a carico del consumatore.

Individuare i limiti di tolleranza di residui nelle derrate di o.a., oltre al vantaggio di assicurare la libera circolazione dei prodotti alimentari in ambito comunitario, può avere come conseguenza una significativa diminuzione dell'impiego di farmaci ed additivi. È comunque sperabile continuare con l'attuazione di norme che prevedano controlli sempre più incisivi e rigorosi su principi attivi e mangimi impiegati nel bestiame, al fine di contrastare il mercato clandestino dei farmaci, l'uso illecito di sostanze ausiliarie, il mancato rispetto dei tempi di sospensione prima della macellazione e/o dell'utilizzo dei prodotti di o.a., ecc., e per limitare all'origine la presenza di residui negli alimenti a tutela della salute pubblica.

I controlli ufficiali sui prodotti alimentari devono essere effettuati lungo tutta la filiera produttiva e cioè dalla produzione primaria alla trasformazione, magazzinaggio, trasporto, e commercio, fino alla somministrazione e al consumo e devono riguardare tutti i prodotti e gli additivi alimentari, nonché i materiali destinati a venire a contatto, commercializzati nel territorio nazionale o destinati all'esportazione. Devono essere predisposti accertamenti completi sui vari prodotti, attraverso ispezioni, campionamenti e analisi di laboratorio, sopralluoghi nell'ambito dell'ambiente di produzione e indagini sul personale addetto, nonché controlli sull'applicazione dei programmi di HACCP che le aziende predispongono per l'individuazione dei punti critici della catena produttiva. A questa necessità di controllo risponde il PNR, che altro non è che un piano di sorveglianza emanato per ricercare i residui di sostanze vietate illecitamente somministrate agli animali ed a verificare il rispetto di conformità dei residui di medicinali veterinari, antiparassitari e agenti contaminanti con i limiti massimi di residui fissati dalla pertinente normativa comunitaria.

Terminiamo questa nota riportando quasi integralmente le conclusioni della

relazione finale 2007 del PNR pubblicata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione, Ufficio III. Dalla lettura si evince che in applicazione del PNR 2007 sono stati analizzati 32428 campioni pari al 105% del numero di campioni programmati ed al 115% del numero minimo calcolato sulla base dei livelli produttivi. In particolare, in base alla classificazione delle sostanze da ricercare riportata nella Direttiva 96/23/CE, sono stati analizzati 15848 campioni per la ricerca di sostanze della Categoria A (Sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate) e 16580 per la Categoria B (Medicinali veterinari e agenti contaminanti).

Dai dati si deduce che sono state riscontrate 72 non conformità (pari allo 0,2% dei campioni esaminati) di cui 31 per sostanze della Categoria A (pari allo 0,2% dei campioni esaminati per tale categoria) e 41 per la Categoria B (pari allo 0,2% dei campioni esaminati per tale categoria). Per quanto attiene la categoria A, nel 2007 sono state riscontrate non conformità per cortisonici nei bovini e cloramfenicolo in suini, volatili da cortile e prodotti dell'acquacoltura. In particolare, va evidenziato che i cortisonici rappresentano un "ingrediente" fondamentale per i "cocktail" anabolizzanti. Nell'ambito dei trattamenti illeciti, inoltre, va evidenziato che il cloramfenicolo, anche se in un limitato numero di casi, si riscontra ogni anno in diversi settori produttivi.

Inoltre, dall'analisi dei risultati ottenuti negli ultimi tre anni, dalla relazione si desume una progressiva riduzione del numero di non conformità riscontrate: infatti si è scesi dallo 0,63% del 2005 allo 0,47% del 2006, fino allo 0,2% del 2007; ciò è principalmente correlato ad una riduzione delle non conformità per sostanze di categoria B, in particolare contaminanti, conseguente tra l'altro all'attuazione di specifiche attività di monitoraggio (es. aflatossine, diossine, cadmio) volte a limitare la contaminazione degli alimenti di origine animale.

Per rispondere a specifiche esigenze locali o nazionali è stata poi predisposta un'attività "extrapiano", nel cui ambito sono stati analizzati complessivamente 8047 campioni (1264 per sostanze della categoria A e 6783 per la categoria B): sono state riscontrate 79 non conformità (1% dei campioni esaminati) rispetto alle 139 non conformità del 2006 (1,55% su 8955 campioni esaminati).

Le attività mirate a specifiche problematiche territoriali hanno riguardato la ricerca di ormoni nei bovini, di contaminanti ambientali, tra cui metalli pesanti (cadmio) negli equini e composti organoclorurati (PCB, diossine e DL-PCB) nel latte, sostanze vietate e coccidiostatici nei conigli e sostanze antibatteriche nel miele. Delle 79 non conformità, 16 hanno riguardato il riscontro di sostanze della categoria A (pari all'1,3% dei campioni esaminati per tale categoria) e 63 della categoria B (pari all'1% dei campioni esaminati per tale categoria).

La Relazione fa notare anche che 32 delle 63 non conformità per la categoria B, cioè il 51% di esse, è legato al riscontro di sostanze contaminanti e non è imputabile, quindi a trattamenti illeciti con sostanze vietate o all'uso improprio di sostanze autorizzate.

Infine vogliamo fare un richiamo al Sistema Rapido di Allerta Comunitario (RASFF, Rapid Alert System for Food and Feed) che consente di conoscere in tempo reale, in ambito europeo, le contaminazioni degli alimenti e mangimi e la

loro incidenza. Per l'anno 2007 ha registrato 2.933 notifiche di alimenti contaminati successivamente a controlli di cui soltanto 70 su prodotti italiani. Il nostro sistema di allerta ha effettuato ben 501 notifiche di cui 481 per prodotti irregolari provenienti da altri Paesi di tutto il mondo e 20 su prodotti italiani risultando, come nel 2006, il primo Paese membro per numero di segnalazioni inviate. Dopo l'Italia, per numero di notifiche vi è la Germania, la Gran Bretagna seguite dalla Spagna, l'Olanda, Danimarca, Polonia e Francia. La tipologia delle infrazioni è risultata comunque abbastanza eterogenea, comprendendo sia contaminazioni di natura microbiologica (salmonella, listeria), chimica (micotossine, in particolare fumonisine, residui di antiparassitari) e fisica (presenza di corpi estranei). Nel 2008 il numero delle notifiche si è attestato a 468 e l'Italia risulta complessivamente coinvolta in 99 casi.

Questi dati hanno permesso al Sottosegretario Francesca Martini di affermare che “La Commissione europea ha promosso a pieni voti la sicurezza dell'agroalimentare italiano, designando l'Italia come il Paese più scrupoloso nel fare i controlli” perché guardando i “numeri del rapporto 2007 l'Italia primeggia grazie all'attenzione dimostrata nel compiere i controlli sugli alimenti”.

USE OF NICARBAZINEE IN THE CONTROL OF URBAN PIGEON COLONIES IN ITALY IN 1990-2007

FERRI M.¹, FERRARESI M.¹, GELATI A.¹, ZANNETTI G.², UBALDI A.²,
CONTIERO B.³, BURSI E.²

Abstract

Objectives. Verify the effects of Nicarbazinee in birth control in urban pigeons from the early 1990 and following a series of trials with pigeons bred for racing. **Methods.** The treatment, which involved 552 colonies (85562 pigeons), consisted of 8-10 g of maize grains enriched with 800 ppm of Nicarbazinee per day and per pigeon, 5 days a week from March to October. **Results.** The resulting infertility (which was complete in dovecot pigeons) can explain the significant reduction (from 28% to 71%) of the number of pigeons in urban colonies from the first treatment. In treated urban colonies the dispersion of a significant number of pigeons possibly involves the sub-adults and non dominant individuals that may be attracted by non-treated colonies with young birds in the nests. The positive results of the tests soon resulted in a veterinary drug with no effects on the environment, non-target species and birds of prey. The regular use of this drug could be part of a cheaper and more effective management of problematic colonies of urban pigeons.

Keywords: Nicarbazinee, pigeon, *Columba livia*, control, birth

Introduction

Nicarbazine is a drug that is widely used to control coccidiosis in poultry and whose side effects on egg laying precluded its use in laying hen holdings (Sherwood et al., 1957; Weiss et al., 1960; Hurwitz et al., 1975; Mc Loughlin et al., 1978; Polin, 1978; Hughes B.L. et al, 1991; Valfré et al, 1990). The fertility of captive pigeons was verified in preliminary experimental pharmacotherapy studies (Martelli et al., 1992, 1993) and its use on urban pigeons was proposed (Zannetti, 1992). The purpose of this presentation is to highlight the results of studies and field applications carried out by the AA. in the pharmacological control of the reproductive activity of urban pigeons.

In Italy many towns have significant problems caused by the excessive numbers of urban pigeons. By evaluating the costs associated with the impact of urban pigeons, Zucconi et al. (2003) calculated the cost of cleaning out guano from pavements and other places in about € 7.75-10.5/pigeon/year, while the cost of restoring monuments amounted to € 16-23/pigeon/year and estimated additional annual costs of €3.4-4.5 million for 103 Italian towns. Other costs (€ 20-43 million/

ASL, Servizio Veterinario (Local Health Authority, Veterinary Service) - Via M. Finzi 211, 41100 Modena, Italy Corresponding author: e-mail: m.ferri@ausl.mo.it

² Department of Animal Health – University of Parma, Via del Taglio 10, 43126 Parma, Italy

³ Department of Animal Science, University of Padua, viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy.

year) result from damage caused by pigeons to farming production, with an average loss of 0.5-1% of cereal crops.

No data are available on the total cost in terms of public health and hygiene, despite the fact that the risk of zoonoses from urban pigeons is high (Haag-Wackernagel *et al.*, 2004; Haag-Wackernagel, 2005, Gelati *et al.* 2007).

There are many methods for the control of overabundant urban pigeons, some of which cannot be applied in urban environments (shooting with firearms, etc.); for such purposes, some urban authorities rely on the capture and surgical sterilisation or translocations while some others rely on the “capture and euthanasia” of pigeons, which generates some negative reaction in the population and involves elevated costs with poor results (Sol & Senar, 1995). Fertility control using Nicarbazine, a well-known drug, could offer a humane, effective method to manage overabundant populations of urban pigeons.

Materials and Methods

Nicarbazine. Nicarbazine-treated food to be administered to free-living urban pigeons was formulated as maize grains containing 800 ppm of Nicarbazine (Ovistop® ACME). The drug is attached to the grains by means of a patented process that prevents its release into the environment and is delivered in doses of 8-10 g per pigeon per day.

Methods. This treatment has been applied on urban pigeons in different Italian cities and towns, in accordance with the following guidelines:

- The choice of colonies to be treated with Nicarbazine was fixed on the basis of problems for urban hygiene and monument protection referred by local municipalities and due to pigeons pollution
- Identification, localisation and quantitative assessment of urban pigeons and their colonies (Bibby and Burgess, 1988);
- Locations of the points of urban areas where the drug is to be distributed and the times and intervals of administration;
- Staff training for distribution of Nicarbazine and for data finding and monitoring from the colonies of pigeons during the treatment;
- Distribution of 6.4-8 mg of Nicarbazine per pigeon per day, 5 days a week, from mid March to mid October, thus covering the whole reproductive cycle of urban pigeons.

Drugs were generally distributed in the corners of squares, in pavements, flowerbeds or restricted areas of public parks where the pigeons were already used to gathering, although in some cases platforms (and also raised platforms) were used in order to avoid the usual types of disturbance generally found in squares and to ensure that the birds ingested the dose of medicine both quietly and quickly. The best time for administration was identified as shortly after sunrise; in any case, 6:00 a.m. was a suitable time because of the absence of both disturbing passers-by and traffic and because it preceded the possible arrival of people willing to provide urban pigeons with food (bread, pasta, rice and grain). The drug was distributed directly on the ground so as to ensure ease of access, which ensured the complete and rapid intake of the scheduled dose. This method (Ferraresi *et al.*, 1997) also eased the tasks of the

staff, i.e. spotting any drug residue 20-30 min. after baiting and noting any substantial variation in the consumption and time. This point is pivotal to ensure that the dose provided is adjusted on a daily basis according to the numbers of pigeons feeding at the location. The drug was administered 5 days per week and was suspended at weekends.

Data collection and processing. Data on the number of treated colonies was collected immediately prior to treatment with Nicarbazine; in many cases, we collected data at the end of treatment and, in some cases, we collected data also during post-treatment.

Pigeon counts were carried out prior to the start of treatment, by visiting colonies in the areas of high pigeon concentration (where pigeons were attracted by food provided by passers-by) immediately after dawn, in order to determine the correct dose of Nicarbazine preparation to be administered. In certain cases, counts were repeated at the end of October, upon termination of the seasonal program. In some cities, data on colony density was collected every 12 months (once a year, prior to the start of treatment) while in other cities, it was possible to repeat the count every 6 months (at the start and at the end of the yearly treatment). A graph showing the historic pigeon counts in the cities monitored over various years has been created. Data on the six-monthly or annual pigeon counts between cities was interpolated with regression lines in order to estimate change trends in population numbers, as observed over the course of time. Analyses were carried out using the SAS 1999/2000 SAS/STATtm statistical package. For those cities for which pluriannual pigeon quota statistics were not available, we used the t test for paired data to test the statistical significance of pre/post-treatment numerical variations. Counts of pigeons were square root-transformed to normalize the data (Fowler *et al.* 1986).

Results

Besides monitoring the use of Nicarbazine to control fertility in dovecot pigeons, its use on urban pigeon colonies in many cities and towns was also monitored, often over extended periods (**Fig. 1, 2, 3, 4**), thus permitting us to acquire data on 552 treated colonies. During the 1996-2007 period, the pre-treatment count of pigeons in such colonies was 85562. The pre- and post-treatment counts of many monitored cases in the same calendar year (27054 pigeons in 400 colonies) are also available, while in some cases counts are taken just once a year (58508 pigeons in 152 colonies); These counts were usually taken immediately prior to administration of the drug, particularly in cities and towns with very complex technical or human situations whose census-related difficulties require some modification of the management protocol.

In general, we observed that there were consistent numerical reductions in treated colonies in the initial phase of administration, while subsequent treatment stabilised the average size of the pigeon colonies of the observation interval.

For some cities, a series of pluriannual colony monitoring data is available, with both six-monthly and annual data (**Tab. 1**). In such cases, we used the regression coefficient to express the reduction in the number of pigeons for every 6-month and yearly period, analysing how this occurred in a consistent manner and confirming a

significant negative trend for the timeframe in question. Some cities in particular, such as Mantova and Como, recorded reductions in excess of 200 units over a one-year period and Florence recorded changes in excess of 1000 units. In relating such variations to the average size of the entire pigeon population in the periods in question, we obtained the average reduction percentages, net of the various pigeon community numbers. The average variation was in excess of 10% in all cities except Carpi and Udine.

The significance of the statistical analysis models adopted is attested by the values of regression coefficients. Moreover the values of R^2 (model goodness-of-fit index), included between 40% and even 80%, are relevant. In one particular case (city of Como), the regression coefficient turned out to be insignificant due to the fact that it was estimated on the basis of 3 data sources, and therefore with a non significant number of observations, in order to attain statistical significance, considering that even in such a case the average reduction was highly significant (39%). Furthermore, even in the first 18 months of treatment (2 seasonal cycles of treatment, **Tab. 2**), the average expected variation was of 30 % (35% average of the 4 variations): in these cases the t test for paired data equaled 7.21 with $P < 0.01$ (result not reported in table), therefore with average variations that significantly differed from 0 and which indicate that treatment with Nicarbazine was significant in reducing the average pigeon numbers.

In some cities the effects of the suspension or interruption of the administration of Nicarbazine were also recorded, and in these cases, such as in the city of Carpi (**Fig. 1**), it was found that the pigeon populations increased in number; the graph showing the number of pigeons in these cities during the timeframe in question shows the abrupt increase in pigeon numbers during the period in which treatment was suspended (1998, 1999), from just under 400 units as recorded in October 1997 to more than 1200 units in March 2000. Similar results were also found in the city of Mantova (**Fig. 2**), where the interruption of treatment in October 2004 determined an abrupt increase in the number of pigeons, confirming the fact that if treatment tends to reduce the number of pigeons, interrupting treatment determines a return of fertility, which tends to restore initial pigeon numbers.

Discussion

The data provided clearly shows the efficacy Nicarbazine in urban pigeon fertility treatment. Our overall experience of the pharmacological treatment with this drug in dovecot and in urban pigeon colonies (Ferraresi et al., 1997; Ferraresi et al., 1998; Gelati et al, 2000; Ferraresi et al., 2000; Zannetti, 2000; Bursi et al., 2001; Ferraresi and Gelati, 2001), spanning several years (1996-2007), highlighted some peculiarities that deserve individual mention:

Efficacy: The initial tests (Martelli et al., 1992,1993) with the Nicarbazine in the pigeons highlighted differences in individual susceptibility in terms of efficacy in reducing pigeon fertility with Nicarbazine doses ranging from 50 ppm to 230 ppm in pelleted (extruded) feed, whereas the overall fertility (living and lively nestlings / expected nestlings) of the pairs treated with 400 ppm was 0%. Anatomico-pathological examinations underlined morpho-functional alterations of the reproductive system

(hypoplasia of spermatogonial cells, follicles without oocyte), but without jeopardising the overall health of the pigeons

In the successive researchs, a substantial drop in the number of pigeons in the colonies treated was recorded and, particularly, the density recorded over that time was much lower than that of pre-treatment levels. Furthermore, in a few cases, treated and non-treated colonies were simultaneously monitored, revealing that, while the number of pigeons in treated colonies were reduced, non-treated colonies (control colonies) remained stable or saw an increase (in Carpi, Ferraresi *et al.*, 1997; in Genoa, Albonetti *et al.*, 2003), while in the event of interruption or suspension of the administration of Nicarbazine, an increase or stabilisation of colony numbers was noted (**fig. 1, 2**). The evaluation of a regression coefficient in the reduction of pigeon numbers in the towns where annual or six-monthly counts are taken, confirm a significant negative trend (**tab. 1**) during this period. Some towns, such as Mantova and Como, reported reductions of more than 200 units in the space of one year; in Florence, changes by more than 1000 have been reported. Comparison of this data to the average size of the entire population shows that the average reduction percentage over all towns taking part in the trial is consistently above 10%, with the exception of Carpi and Udine. The statistical significance of the models was confirmed (**tab. 1**) by r^2 values of between 40% and even 80%. The regression coefficient for the town of Como is not significant since it is calculated on the basis of just 3 data sources, and does not attain sufficient significance, although the average reduction in pigeons numbers is significant (39 %). Finally, some towns with a series of six-monthly data records, are evaluated on the regression coefficient and r^2 in the first 18 months of treatment with Nicarbazine (**tab. 2**), confirming that during this time the numerical reduction effect on the treated pigeon colonies is more active; subsequently, there is a marked tendency to the stabilisation of an average number of pigeons in the same colonies, with a characteristic plateau in the more advanced periods of post-treatment observation

Toxicity: No toxic effects were observed during the above mentioned research and the mortality in the treated colonies remained within usual and predictable limits in all the moments of the single tests, as is confirmed with numerous tanatological controls in pigeons died pre-, post- and during treatments with Nicarbazine.

These findings are in accord with the pharmacological and pharmacokinetic observations of Ubaldi and Fusari (2000), which revealed the following:

- the highest Nicarbazine concentration in blood is recorded 9 hours after ingestion;
- the absorption rate is so high that 14% of the drug ingested is absorbed within one hour;
- 70% of the drug is absorbed from the digestive tract into the blood within T_{max} (9 hours);
- 8 hours after ingestion, half of the drug absorbed has already been eliminated;
- after 56 hours, over 99% of the drug has been eliminated.

More toxicity studies (ACME dossier for commerce authorisation, 1997-2002) on this drug highlighted that with a daily supply of 8-10 g per head, which means providing 6.4-8 mg of Nicarbazine per head per day, a good tolerability was

recorded for correctly performed interventions throughout the peak reproductive period (180 days). In addition, trial monitoring showed no change in mortality as regards treatment with a Nicarbazine dose of 24 mg per head per day, equivalent to 30 g of commercial product (Ovistop®) for 180 days, which by far exceed the recommended dose; the highest non-lethal dose was estimated to be 430 mg/kg, equivalent to about 210 g of Ovistop® per pigeon per day. Consequently, so long as it is used as recommended, the drug could be considered well tolerated by and harmless to the pigeon colonies undergoing the treatment..

Effects reversibility: the population increase recorded after suspension of the programme (Carpi, Florence, Mantova; **fig. 1,2,5**) once again proves the reversibility of the pharmacological effect of Nicarbazine. . This is an important element for a pharmacological approach to birth control in a wildlife population, also crucial for assure the safe use for any product or drug to be used on the wild or non domestic animals without negative environmental impact, also as regard the EU and italian rules and laws.

Treatment failure and unexpected results: in a few cases, not only did fertility not decrease as expected, but in fact increased (**figures 1,2,5**), but other observations gived good explanations for these failures as, for example, delay in initiating administration programme due to unexpected logistic and organisational problems (for example, discontinuous or irregular distribution of Nicarbazinee during the established period or errors in evaluation of pigeon population or location of the colonies: Giunchi *et al.*, 2007).

In some cases (about 60 % of the colonies treated with Nicarbazinee), we observed a dramatic drop (up to 71 %) in the relative pigeon populations, also in absence of real increase in mortality rates, as if the same colonies partially “disintegrate” (Ferraresi *et al.*, 1997). The AA. believe that this partial disintegration” of a treated colony can be attributed to migration and to the non-migration of many young and subdominant pigeons, that usually account for the majority of the population (Johnston and Janiga, 1995). The resulting infertility and the absence of nestlings in colonies treated with Nicarbazinee, presumably eliminates or greatly reduces reproductive and social stimulation and competition, in pigeons whose physical conditions are likely to have been improved by the antiparasitic effect of the drug. A lack of interest in the colony and abandonment of the colony without fertile eggs and chicks have already been observed in the ring-billed gull (*Larus delawarensis*) during trials involving of “egg oiling” for demographic reduction (Pochop *et al.* 1998) and it has generally been noted that birds leave areas where survival or reproductive prospects are poor, searching other areas where conditions are better (Newton, 1998).

References

1. Albonetti P., Bozzano M., Causa A., Fidora S., Orecchia S., Petroni P., Zanardi S., Zanoni G. (2003), *Argomenti S.I.Ve.M.P.*, 6, 5, 47-48.
2. Bibby C. J., Burgess N. D. (1988): *Bird Census Techniques* - Academic Press, London.
3. Bursi E., Gelati A., Ferraresi M., Zannetti G. (2001): *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria Università di Parma*, 97-116.

4. Dossier ACME per AIC (1997-2002). ACME dossier for drug marketing authorisation in Italy, European Agency for the evaluation of drugs, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Bruxelles
5. EMEA/CVMP/055/96 (1996). "Note for guidance: Environmental Risk Assessment for veterinary drugs other than GMO-containing and immunological products", Annex II Cap. 3, "Estimation of PEC in soil from drug residues excreted outdoors".
6. Ferraresi M., Ferri M., Gelati A., Zannetti G.. (1997): In Proceedings of the 1° Convegno Nazionale sulla Fauna Urbana , Rome,, 189-192,
7. Ferraresi M., Gelati A. (2001). In: Proceedings of Congresso Nazionale su "Il controllo della fauna per la prevenzione dei danni alle Attività Socio-Economiche", Vercelli, . 71-78.
8. Ferraresi M., Vezzani E., (2000): In: Proceedings of Congresso Nazionale su "Il controllo numerico delle popolazioni del colombo di città tramite trattamento con Nicarbazinea", Florence 27.06.2000.
9. Fowler, J., Cohen L.(1986): Statistics for Ornithologists - British trust for Ornithology, Tring, England.
10. Gelati A., Calzolari , Ferraresi M., Ferri M., (2007): Infestazione umana da Acaro rosso *Dermanyssus gallinae* De Geer - *Igiene degli alimenti*, 24, 1, , 46-48
11. Gelati A., Lebboroni M., Nannetti G. (2000): In : Proceedings del Congresso Nazionale su "Il controllo numerico delle popolazioni del colombo di città tramite trattamento con Nicarbazinea", Florence
12. Gaillard J.-M., Pontier D., Allaine D., Lebreton J. D., Trouvilliez J., Clobert J., (1989): *An Analysis of Demographic Tactics in Birds and Mammals - Oikos*, 56 (1), 59-76.
13. Giunchi D., Baldaccini N. E., Sbragia G., Soldatini C. (2007): *Wildlife Research*, 34, 306-318.
14. Haag-Wackernagel D. (1995): *Regulation of the street pigeon in basel - Wildlife Society Bulletin*, 23 (2), 256-260
15. Haag-Wackernagel D., Moch Hag (2004): Health hazards posed by feral pigeons - *J Infect.* 48(4):307-13.
16. Haag-Wackernagel D. (2005): Parasites from feral pigeons as a health hazard for humans - *Annals of Applied Biology*, 147, 2,, 203-210
17. Hughes B. L. et al. (1991): *Poultry Sciences*, 70 (3), 476.
18. Hurvitz D.S., Bornstein G., Ley Y. (1975): *Poultry Sciences*, 54 (4), 415.
19. Lebboroni M., Scoccianti C., Gualcherani T. (2000): Il censimento dei colombi di città a Firenze. In: Proceedings of Convegno Nazionale su "Controllo numerico delle popolazioni del colombo di città tramite trattamento con Nicarbazinea", Florence.
20. Lebboroni M., Ferraresi M., Gelati A. Gualcherani T. (2002): Il contenimento delle popolazioni di colombo di città a Firenze tramite uso di Nicarbazinea - In: Proceeding of "Specie ornitiche problematiche: iniziative di gestione in Toscana e altre regioni", LIPU, Florence.
21. Murton, R. K, Thearle R. J. P., Thompson J. (1972): Ecological studies of the

- feral pigeon, *Columba livia* - *J. Appl. Ecol.*, 9, 835-874.
22. Murton R. K., Thearle R.I.P., Coombs C.F.P. (1974): *Ecological Studies of the Feral Pigeon Columba Livia Reproduction and Plumage Polymorphism - The Journal of Applied Ecology*, 11, (39), 841-854
 23. Johnston R.F., Janiga M. (1995): *Feral pigeons* - Oxford University Press, Oxford.
 24. Mc Loughlin D. K. et al. (1978): *Poultry Sciences*, 36 (5), 880.
 25. Martelli P., Bonati L., Gelati A., Ferraresi M., Montella L., Cabassi E., Zanetti G. (1992): *Atti SISVet*, 47, 1283.
 26. Martelli P., Bonati L., Gelati A., Ferraresi M., Montella L., Corradi A., Zannetti G., (1993): *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma*, 13, 249-257.
 27. Newton I. (1998): *Population limitation in birds*. Academic Press, London, 597.
 28. Polin D. (1978): *Poultry Sciences*, 36 (3), 831.
 29. Pochop P. A., Cummings J.L., Yoder C. A., John E. Steuber, (1998): Comparison of white mineral oil and corn oil to reduce hatchability in ring-billed gull eggs - *Proceedings of the Eighteenth Vertebrate Pest Conference (1998)*. University of Nebraska, Lincoln NE.
 30. Rose E., Nagel P., Haag-Wackernagel D., (2006): Spatio-temporal use of the urban habitat by feral pigeons (*Columba livia*) - *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60, 242-254.
 31. SAS 1999/2000 SAS/STAT™. Guide for Personal computers: Version 8.1 - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
 32. Sol D., Senar J.C. (1995): Urban pigeon populations: stability, home range, and effect of removing individuals - *Canadian Journal of Zoology*, 73, 154-1160
 33. Shochat E. (2004): Credit or debit? Resource input changes population dynamics of city-slicker birds- *Oikos*, 106, 622-626.
 34. Sturtevant J. (1970): Pigeon control by chemosterilization: population model from laboratory results - *Science*. 170, 322-324.
 35. Sherwood D.H. et al. (1957): *Poultry Sciences*, 35 (2), 1171.
 36. Ubaldi A. Fusari A., (2000). In: *Proceedings of the Convegno "Il controllo numerico delle popolazioni del colombo di città tramite trattamento con Nicarbazina"*, Florence, 170
 37. Valfré F., Moretti V.M., Macri A., De Felip G. (1990): *Obiettivi & Documenti Veterinari*, 10, 11-16.
 38. Weiss H.S. et al. (1960). *Poultry Sciences*, 39 (4), 1221.
 39. Zannetti G. (1992). In: *Proceedings of the Corso Ann. Perf. "Il Rischio Tossicologico in Medicina Veterinaria"*, 105, Università di Parma
 40. Zannetti G., (2000): In: *Proceedings of the Convegno "Il controllo numerico delle popolazioni del colombo di città tramite trattamento con Nicarbazina"*, 170, Florence
 41. Zucconi S., Galavotti S., Deserti R., (2003): Valutazione dei costi economici e sociali dei colombi in ambiente urbano - *Nomisma*, Bologna.
 42. Weiss H.S. et al. (1960): *Poultry Sciences*, 39 (4), 1221.

TABLE 1: Regression analysis results on the number of pigeons in the timeframe in question, broken down by city.

CITY	TIME INTERVAL	REGRESSION COEFFICIENT	R ² MODEL %100	Average population	Average % reduction
6-monthly data					
Carpi	2000-2007 a	-38**	46	410	9
Mantova	2000-2004 b	-125**	59	781	16
Senigallia	2004-2007	-82*	65	468	18
Udine	2000-2007	-32**	42	510	6
Annual data					
Florence	1999-2004	-1478*	74	9390	16
Como	2005-2007	-280	85	722	39

a: the pre-2000 period is not included in the analysis (suspension of treatment)

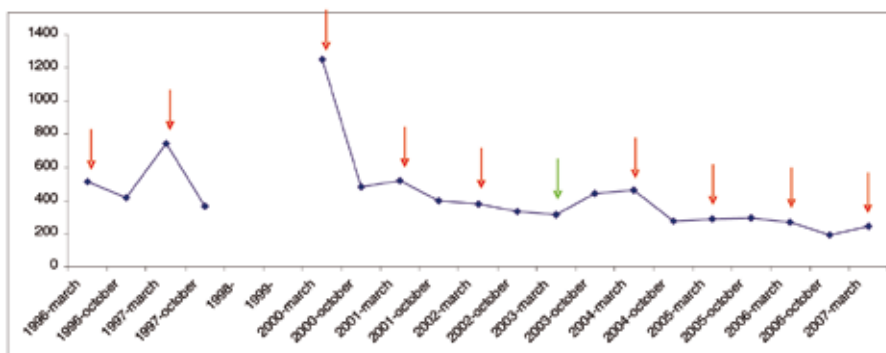
b: the post-2004 is not included in the analysis (interruption of treatment)

*: P<0.05; ** P<0.01

Table 2 Effect of the treatment in the first 18 months (2 treatment cycles).

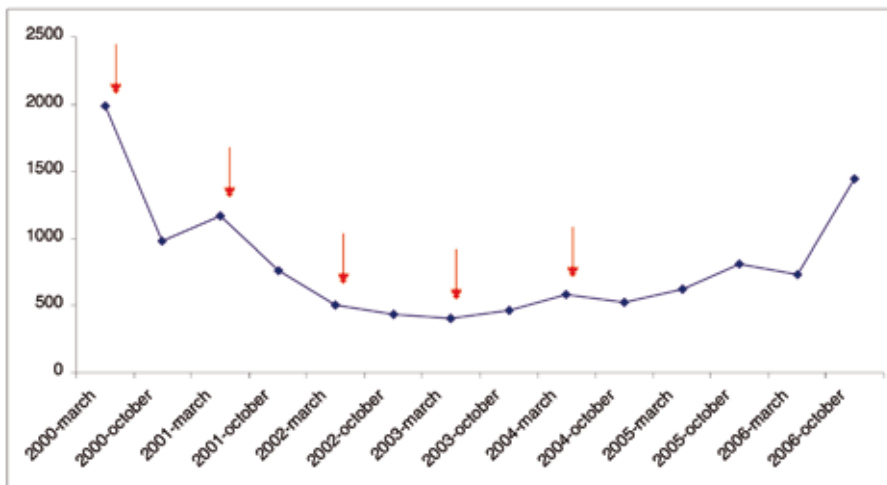
City	Time interval	Regression coefficient	R ² model %100	AVERAGE POPULATION	AVERAGE % REDUCTION
CARPI	2000-2001	-252	68	510	50
MANTOVA	2000-2001	-348*	71	1224	28
SENIGALLIA	2004-2005	-177	80	556	32
UDINE	2000-2001	-197	52	623	32

*: P<0.05

FIGURE 1: Pigeon number trend in the period in question (city of Carpi – six-monthly data). estimated equation: $y = -38.082x + 714.72$ 

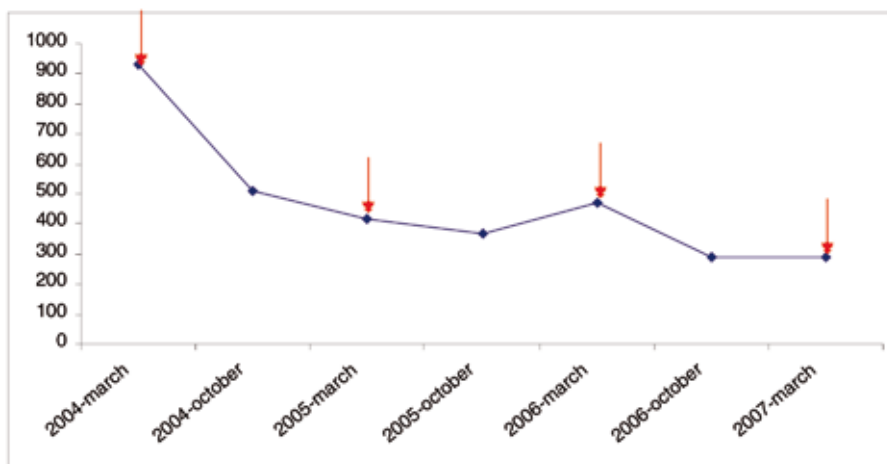
Note: black arrows: treatment starts with Nicarbazine gray arrow: some problems of Nicarbazine distribution to pigeons

Figure 2 Graph of the pigeon number trend in the period in question (city of Mantova – six-monthly data). Estimated equation: $y = -124.85x + 1467.5$



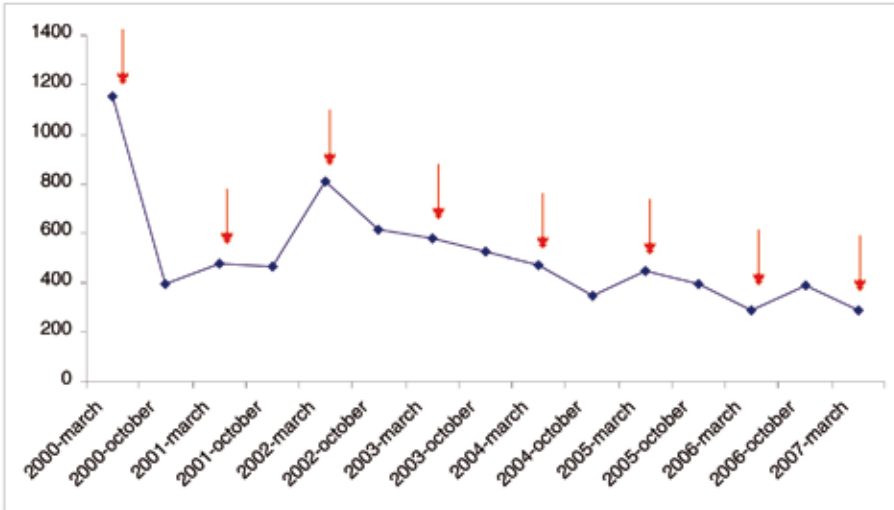
Note: black arrows: start of treatment with Nicarbazine

FIGURE 3 Pigeon number trend in the period in question (city of Senigallia – six-monthly data). estimated equation: $y = -82.25x + 797.14$



Note: black arrows: start of treatment with Nicarbazine

FIGURE 4 Pigeon number trend in the period in question (city of Udine – six-monthly data). estimated equation: $y = -32.189 x + 768.05$



Note: black arrows: start of treatment with Nicarbazine

FIGURE 5. Pigeon number trend in the time interval (city of Florence – annual data). treatment is commenced immediately after the annual count. estimated equation: $y = -1471.8 x + 14563$

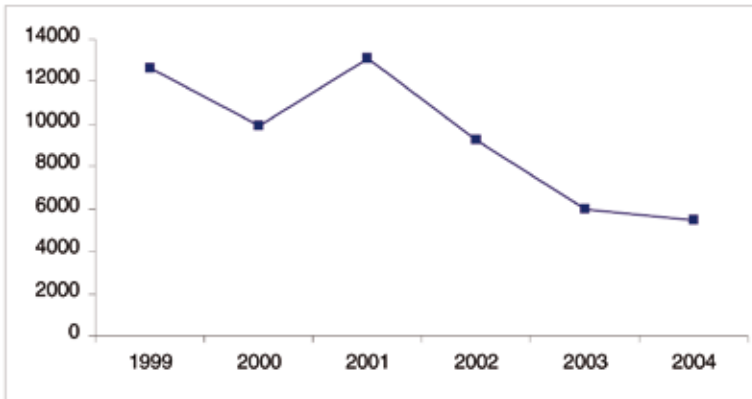
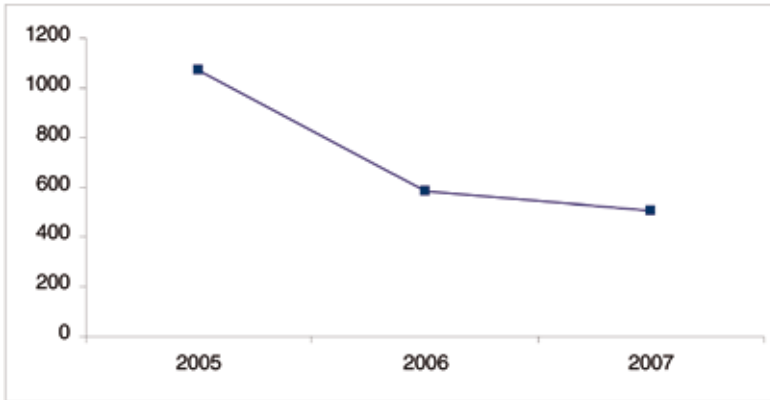


Figure 6 Pigeon number trend in the time interval (city of Como, annual data)). Treatment is commenced immediately after the annual count. Estimated equation: $y = -280 x + 1283$



**MUCOKYNETIC DRUGS:
IN VITRO RHEOLOGICAL STUDY ON HORSE MUCUS
FARMACI MUCOCINETICI:
ATTIVITÀ REOLOGICA IN VITRO SUL MUOCO DI CAVALLO**

QUINTAVALLA Fausto¹, SKERT Stefano², PINI Paolo³

Structured Summary

Objectives - To evaluate the mucolytic activity of N-acetylcysteine (NAC) at different concentrations (2.5%, 5%, 10%, 20%) by measuring, *in vitro*, variations in viscosity and elasticity of mucus samples using a dynamic viscosimeter.

Methods - Mucus samples were collected from 60 adult saddle horses (9-17 years old, mean 14.6) belonging to different breeds, with clinical signs of IAD (inflammatory airway disease), destined for slaughter. The activity of mucolytic agent on rheological properties and viscoelasticity of tracheobronchial secretions was evaluated in comparison to physiological saline solution. Further evaluations were carried out comparing parameters with Bromhexine (0.3%) and with Dembrhexine (0.5%).

Results - Equine mucopurulent tracheobronchial secretions are characterized by high viscosity and elasticity. Mucus viscoelasticity was greatly reduced by 0.9% physiological saline solution: 39-49% viscosity vs 31-43% elasticity. NAC resulted in a significant difference ($p < 0.05$) between the samples diluted with mucolytic solutions at higher concentrations in comparison to the samples diluted with saline solution alone; the trend for elasticity was similar. Bromhexine and Dembrhexine caused a drop in viscosity and elasticity in the samples diluted with either saline solution or other drugs, however, compared to that of 0.9% physiological solution, no significant difference was observed (Physiological sol. vs Bromhexine: $p = 0.336$; Physiological sol. vs: Dembrhexine: $p = 0.503$). The same trend was observed with the elasticity data (Physiological sol. vs Bromhexine: $p = 0.260$; Physiological sol. vs: Dembrhexine: $p = 0.560$).

Clinical Significance - The endotracheal administration of mucokinetic agents may be recommended for an improved therapeutic response aimed at eliminating stasis and accumulation of mucus. The choice should, however, be made for direct acting mucolytic agents, such as N-acetylcysteine, and at high concentrations.

Keywords: horse; N-acetylcysteine; bromhexine; dembrhexine; respiratory diseases.

¹ Sezione di Clinica Medica Veterinaria – Dipartimento di Salute Animale - Università degli Studi di Parma - Via del Taglio 10 - 43126 Parma, Italy. E-mail: fausto.quintavalla@unipr.it

² DVM Practitioner – Salsomaggiore Terme – Parma, Italy

³ Chemifarma S.p.A. - Forlì, Italy.

INTRODUCTION

The term “mucus” describes the heterogeneity complex viscoelastic gels that are present in the airways and available for sampling and rheological analysis (Gerber *et al* 2000). Airway mucus normally contains 95 per cent water and 5 per cent of a combination of glycoproteins, proteoglycans, lipids, carbohydrates, minerals and variable amounts of epithelial and inflammatory cells (Dixon 1992; Gerber *et al* 2003a). Tracheobronchial mucus is characterized by non-linear and time-dependent viscoelasticity in addition to physical properties of adhesiveness and wettability (Pietra *et al* 2000). In fact, mucus quantity scores did not correlate with mucus quality scores (Gerber *et al* 2003b). The high viscosity of these secretions is due primarily to their content of mucoprotein and deoxyribonucleic acid. Accumulation of mucus within the airways is characteristic of most equine lung diseases associated with airway inflammation. Many pulmonary diseases are associated with impaired mucokinesis. This can be due to the disruption of effective ciliary activity, or to changes in the quantity or quality of the mucus or periciliary fluid, or to combinations of these factors (Dixon 1992).

Inflammatory airway disease (IAD) describes a heterogeneous group of inflammatory conditions of the lower respiratory tract that appear to be primarily non-infectious, as perhaps could be compared to “post infectious” pulmonary disease (Rush 2003; Dixon *et al* 2003). Mucus accumulation in IAD probably is associated with alterations in inflammatory cytokine (IL-13 and IFN- γ) and epithelial gene (CLCA1, EGFR, Bcl-2 and MUC5AC) profiles, although some studies not support this hypothesis (Ryhner *et al.* 2008). Changes of viscoelastic properties of mucus result in changes in its clearability by ciliary and cough mechanisms (King 1987). Rheological properties unfavourable for mucociliary clearance may lead to excessive mucus accumulation in the airways, which in turn can contribute to obstruction and impair lung function and be associated with poor racing performance in racehorses (Holcombe *et al.* 2006). It is also important to note that apart from viscosity and elasticity, other physical properties of mucus, such as surface tension, spinnability and adhesivity, can influence its clearability (Richardson & Phipps 1978). These properties are considered to be strictly correlated with the macromolecular structures of mucus (Lopez-Vidriero *et al* 1977) and with mucociliary clearance (Dulfano & Adler 1975; Puchelle *et al.* 1980; Litt 1981). These macromolecules are randomly coiled, entangled and crosslinked by disulfide bridge bonds, and further attracted to each other by hydrogen electrostatic bonds with water, ions, and lipids, all arranged in a three-dimensional gel network. Due to this particular molecular structure, tracheobronchial secretions behave as non-Newtonian viscoelastic materials: thus, when a force is applied to mucus, it behaves neither as a solid nor as a liquid, but as a combination of the two. Modification of the molecular structure can therefore influence the rheological behavior of mucus and condition the activity of the mucociliary escalator which functions effectively only within a certain range of viscosity and when elasticity is limited (King 1987).

The viscosity of pulmonary secretions may be reduced by hydration (water or sterile saline), raising the pH (sodium bicarbonate), the increase of ion concentrations (sodium bicarbonate or saline) or the breaking of bridges disulfide (SS) of mucus

(acetylcysteine or iodine). Mucolytic drugs are used to render excess, thickened mucus more fluid and more easily expectorated. Mucokinetic drugs facilitate the removal of respiratory secretions from the tree and are indicated in all conditions which noted increased viscosity of pulmonary secretions (Adams, 1999). Dixon (1992) reported that the term “mucokinetic” agent is more accurate for all drugs that act on tracheobronchial secretions. These drugs, other than play an important role in the therapy of respiratory diseases characterized by substantial production of mucus secretions, effectively support the use of antibiotics, antiinflammatory and, more recently, immunomodulant drugs.

Mucokinetic therapy in such instances could improve abnormal rheological properties of mucus and may improve mucociliary clearance, thus helping to break the vicious cycle.

N-Acetylcysteine (NAC), Bromhexine and Dembrhexine are the most widely used respiratory systemic agents in veterinary medicine in Europe. Acetylcysteine, a N-acetyl derivate of L-cysteine, is used in veterinary medicine as both a mucolytic agent in bronchopulmonary disease, for mucinolytic action in some ocular diseases (KSC, keratitis), in the treatment of retained meconium and in treatment of acetaminophen toxicity. Additionally, NAC is a potent free radical scavenger as a result of its nucleophilic reaction with ROS (reactive oxygen species). In endotoxic animals, NAC decrease neutrophil-aggregating activity, reduced pulmonary hypertension, and attenuated vascular permeability (Chavko *et al* 2009). The free sulfhydryl group on the compound is believed to reduce disulfide linkages in mucoproteins. When administered into the pulmonary tree, acetylcysteine reduces the viscosity of both purulent and nonpurulent secretions and expedites the removal of these secretions (Ballarini *et al.* 1971).

Bromhexine hydrochloride [*N*-cyclohexyl-*N*-methyl-2-(2-amino-3,5-dibromo) benzylammonium] is the synthetic form of vasicine, an alkaloid that occurs naturally in the leaves of *Adhatoda vasica*, a plant indigenous of India, and *Peganum harmala*. Bromhexine accumulates within type II pneumocytes, without depositing in bronchi (Kopitar & Leder 1971). Bromhexine is a mucokinetic agent with a mechanism of action similar to the to the iodides, but the mode of action of this drug on mucus producing cells is unknown (Dixon 1992). It has been suggested that it is able to depolymerize mucopolysaccharide chains and to modify ionic concentrations (Gogny 1995; Hasegawa *et al* 2006). It is also effective in achieving liquefaction and improved flow characteristics of mucus by increasing its volume and decreasing its viscosity. Bromhexine also produces anti-tussive effects, enhances antibody titres in respiratory mucus and has a marked bronchodilator effect (Pearce *et al.* 1979). In horses bromohexine has poor bioavailability and a short half-life (Dixon 1992).

Dembrhexine is a phenolic benzylamine of more recent introduction into the equine market which alters the carbohydrate side chains of mucin (Dixon 1992). The proposed effect is an alteration of the constituents and viscosity of abnormal respiratory mucus and an improved efficiency of respiratory clearance mechanisms. It also has an antitussive action and enhances concentrations of antibiotics in lung secretions (Aiello 1998). Sasse and Deegen (1984) reported an apparent decrease

in the volume and viscosity of respiratory secretions with this drug in horses with chronic pulmonary disease.

Few studies have been conducted *in vitro* effects of mucokinetic drugs on the rheological properties of equine mucus. The aim of this study was to evaluate the activity of these drugs by measuring, *in vitro*, variations in viscosity and elasticity of samples of tracheobronchial secretions. We decided to investigate the direct behaviour on mucus of NAC at different concentrations, and to compare the rheological activity of NAC with Bromhexine and Dembrhexine, also on the basis of the data published on pharmacokinetic studies in racehorse De Backer *et al* (1980).

MATERIALS AND METHODS

Mucus samples were collected from 60 adult saddle horses (9-17 years old, mean 14.6) belonging to different races and sex, with cough, nasal discharge, dyspnea, destined for slaughter and on which no pharmacological treatments had been carried out over the last 180 days.

All animals presented clear signs of productive respiratory disease which was confirmed at necropsy. Mucus was scored based on scoring system verified by Gerber *et al* (2004). All horses enrolled had tracheal mucus scores of 2-3.

All animals presented clear signs of productive respiratory disease which was confirmed at necropsy. Mucus was scored based on scoring system verified by Gerber *et al* (2004). All horses enrolled had tracheal mucus scores of 2-3.

Mucus samples were collected with a spatule from ventral and dorsal of distal trachea, following incision of the soft tissue of the distal trachea, and placed in a sterile tube. Samples were maintained at 37°C and measurements were carried out within an hour of collection. In order to investigate the rheological activity, viscoelasticity values were determined for each sample at basal conditions and then after dilution 1:1 with 0.9% physiological saline solution. Afterwards, the same measurements were carried out with NAC at different concentrations (2.5%, 5%, 10%, 20%), and with Bromhexine (0.3%) and with Dembrhexine (0.5%), the latter according to concentrations of commercially available formulations and used as an additional control group.

Viscoelasticity was measured using a dynamic viscosimeter (*Mucometer*® ESLAB – Milan, Italy) consisting of a rheometer with two coaxial concentric cylinders: one (the cup), holds the mucous sample, the other (the bob) is connected to a complex electromechanical device that turns and oscillates in order for viscoelasticity data to be obtained.

The results were analyzed statistically by use of the Anova Test for repeated measurements. Comparison of values obtained in different groups was performed by Student's t test (two tailed), using the software SPSS v. 10.0. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

NAC ACTIVITY. A drop in viscosity was observed in the samples diluted with both saline solution and NAC solution (table 1).

Table 1: NAC activity.

PARAMETER	BASAL CONDITION	0.9% PHYSIOLOGICAL SOLUTION (dilution 1:1)	NAC			
			2.5%	5%	10%	20%
Viscosity (mPas)						
X						
SD	34174.99	16685.66	15682.85	13692.01	7968.90	5173.20
SE	18842.07	11043.61	10657.72	8843.83	6665.55	4781.19
	4213.22	2469.43	2383.14	1977.54	1490.46	1069.11
Elasticity (mPa)						
X						
SD	3322.66	1350.53	1308.29	905.80	414.39	300.60
SE	2662.70	1424.65	1446.47	1169.61	568.86	395.12
	595.4	318.56	323.44	261.53	127.20	88.32
Comparison of values (p)	Viscosity		Elasticity			
	Basal vs Phys. Sol.: 0.020		Basal vs Phys. Sol.: <0.001			
	Phys. Sol. vs NAC 2.5%: 0.772		Phys. Sol. vs NAC 2.5%: 0.927			
	Phys. Sol. vs NAC 5% : 0.350		Phys. Sol. vs NAC 5% : 0.287			
	Phys. Sol. vs NAC 10% : 0.004		Phys. Sol. vs NAC 10% : 0.010			
	Phys. Sol. vs NAC 20% : <0.001		Phys. Sol. vs NAC 20% : 0.003			

There was a significant difference between the samples diluted with mucolytic solutions at 10% and 20% in comparison to the samples diluted with 0.9 per cent NaCl solution alone (respectively $p=0.004$, $p<0.001$ and $p=0.020$). The trend for elasticity was similar: although its value decreased in the samples with NAC at 10% and 20%, significant differences were observed only when the basal samples were compared to the samples diluted either with NAC or with 0.9% saline solution (respectively $p=0.010$ and $p=0.003$). These results suggest that NAC *in vitro* has a clear capacity to decrease the viscosity of horse tracheobronchial secretions, and this activity is not due to the effect of simple dilution.

BROMHEXINE AND DEMBRHEXINE ACTIVITY. Tests with Bromhexine and Dembrhexine indicate that the two drugs behave similarly (table 2).

Table 2: 0.3% Bromhexine and 0.5% Dembrhexine solution activity.

PARAMETER	BASAL CONDITION	0.9% PHYSIOLOGICAL SOLUTION (dilution 1:1)	BROMHEXINE (0.3%)
<i>Viscosity (mPas)</i>			
X	24320	9584	7918
SD	8871	5982	4761
<i>Elasticity (mPa)</i>			
X	1736	750	569
SD	994	463	535
PARAMETER	BASAL CONDITION	0.9% PHYSIOLOGICAL SOLUTION (dilution 1:1)	DEMBRHEXINE (0.5%)
<i>Viscosity (mPas)</i>			
X	39590	18580	16980
SD	10320	6758	8140
<i>Elasticity (mPa)</i>			
X	3676	1144	792
SD	776	2532	860
<i>Comparison of values (p)</i>	<p>Viscosity Bromhexine Group Basal vs Phys. Sol.: <0.001 Phys. Sol. vs Bromhexine: 0.336</p> <p>Viscosity Dembrhexine Group Basal vs Phys. Sol.: <0.001 Phys. Sol. vs Dembrhexine: 0.503</p> <p>Elasticity Bromhexine Group Basal vs Phys. Sol.: <0.001 Phys. Sol. vs Bromhexine: 0.260</p> <p>Elasticity Dembrhexine Group Basal vs Phys. Sol.: <0.001 Phys. Sol. vs Dembrhexine: 0.560</p>		

In fact, there was a very significant drop in viscosity and elasticity in the samples diluted either with 0.9 per cent NaCl solution or with the drugs. However, when the effect of Bromhexine on viscosity was compared to that of 0.9% physiological solution, no significant difference was observed ($p=0.336$). The same trend was observed with the elasticity data ($p=0.260$). When Dembrhexine was compared to 0.9% physiological solution, similar behavior was observed with regard to viscosity ($p=0.503$), and elasticity ($p=0.560$). These results do not permit us to claim an effective action on viscoelasticity aside from that due to simple dilution.

DISCUSSION

According Winder & Von Fellenberg (1987), respiratory diseases are one of the most frequent findings in the slaughter of horses and concern mainly adult animals.

Tracheal mucus accumulation is frequent in recurrent airway obstruction

(RAO) and equine inflammatory airway disease (IAD) (Ryhner *et al.* 2008). Mucus accumulation within the airways to the tracheal bifurcation is a hallmark of IAD in horses (Holcombe 2005). Mucus accumulation is partly caused by a increased number of mucus cells and is associated with airway inflammation (Lugo *et al.* 2006) and, in RAO-affected horses, the surfactant is abnormal (Christmann *et al.* 2008). Over 60% of examined horses in the present study showed moderate mucus accumulation in the trachea, similar to results reported by Gerber *et al.* (2003a). There were no significant differences in sex distribution. As is clear from the basal viscosity and elasticity of the various samples, the quality of mucus was very different among enrolled horses, likely due to the differences in duration of disease which was unknown for the lack of a past history. Gerber *et al.* (2004) report that measurements of viscoelasticity and other physical properties that influence clearability are technically demanding and often unavailable. Furthermore, a non-homogeneous sample is not representative of any one segment of the lung (Hodgson 2003) and mucus viscoelasticity can vary between the dorsal and ventral aspects of the trachea (Gerber *et al.* 2004). In addition, the amount of mucus-polysaccharide fibres is markedly increased in the sputum of patients with bronchial disease. The basal viscosity values observed here confirmed the mucopurulent character of the mucus as described by Dulfano & Adler (1975).

The data on physiological solution confirms the rheological property seen with infusion-therapy. It changes the grade of viscosity of tracheobronchial secretions (Sass 1985) but, as observed by us, also markedly affects the elasticity of the mucus. Viscosity is reduced by 39-49%, while elasticity decreases by 31-43%, confirming the effects of a 1:1 dilution with 0.9% physiological saline solution.

The most effective action of NAC occurs at the highest concentrations; viscosity decreases drastically as reported by Sheffner (1963). Ballarini *et al.* (1971) reported that the mucolytic effect of NAC was immediate and intense in subjects with dense and viscous secretions and that the mucolytic effect following systemic administration was comparable to aerosol dosing. Indeed, Keller *et al.* (2001) have shown that the best results on mucus viscosity are achieved with NAC at a daily dose of 20 mg/kg PO, especially if administered for several weeks. This data is in agreement with other *in vitro* and *in vivo* investigations performed on human sputum (Lieberman 1968), dog sputum (Martin *et al.* 1980), and on mini-pig secretions (Walters & Marriott 1987). The reduced viscosity, as well as being time-dependent, is also concentration-dependent, as postulated by Sheffner (1963) on porcine gastric mucin. This fact is in perfect agreement with the well-known chemical action of NAC: the free sulfhydryl group of this molecule breaks the disulfur bridges that link the mucoprotein chains to each other, permitting easier laminar flow in the gel layer of mucus. Analysis of elasticity data does not allow us to assert whether this drop in value is due to some action of NAC on the mucus macromolecular structure, or if it is merely an effect of dilution. In any case, a significant decrease in elasticity values does not always entail better mucociliary transport (Puchelle *et al.* 1980). NAC have been shown to protect pulmonary cells from oxidative injury and ameliorate inflammation (Chavko *et al.* 2009).

The behaviour *in vitro* of Bromhexine and Dembhexine is rather different. Our observations confirm to some extent the mechanism of action of the two drugs: that is,

they do not have a direct lytic effect on the mucofibrillar structure of tracheobronchial secretion; instead, they regulate the metabolism of mucus, modifying its molecular structure and hence its rheological properties. In fact, Bromhexine stimulates the synthesis of sialomucin (the most hydrophilic mucoprotein) (Morandini *et al* 1986), and, at the same time, reduces the total amount of glycoprotein (Walters & Marriot 1987). These two effects are perhaps supported by vagal stimulation that causes a further increase in the water content of mucus (Quintavalla & Signorini 1992). Dembrhexine seems to have some effect on the synthesis of lateral oligosaccharidic chains (Dixon 1992), and this would lead to a drop in mucus viscosity. The activity of these two mucoregulators cannot be investigated with the method described in this study, although it would be possible to measure the variation in viscoelasticity of samples of horse tracheobronchial secretions taken at the beginning and end of therapy with Bromhexine and Dembrhexine, as carried out by Walters and Marriot (1987) on the mini-pig. *In vitro* study of mucus viscoelasticity with our method is a reliable means to assess the rheological activity of a mucolytic drug. However, more detailed information might be obtained if biochemical studies were associated so as to permit correlation between rheological modification and mucoprotein content in surfactant, phospholipids, glycolipids, substance P, immunoglobulins, proteins derived from blood and airway epithelial genes that are able to influence the rheological behaviour of mucus (Puchelle *et al.* 1973; Marriott & Irons 1974; Sonea *et al.* 1999).

CONCLUSION

Any therapy used during ongoing bronchopulmonary disease, particularly where hyperdyscrinism is involved, must necessarily set out to break this vicious circle in the qualitative alterations of the mucus. This is the necessary condition for any real recovery of mucociliary clearance mechanisms (Zannetti *et al* 1993). Knowledge of regulatory pathways controlling mucus production and secretion is essential to development of new treatments. An *in vitro* rheological test is a good method to quantify mucolytic activity of drugs. It enables correlations with clinical observations, and with the study on mucociliary clearance, assisting the practitioner to plan more rational therapy for equine respiratory diseases. In addition, the endotracheal administration of mucolytic agents may be suggested to obtain a therapeutic response aimed to eliminate stasis and accumulation of mucus.

Not only that, there is always a lag time between the start of treatment and the clinical signs of mucolysis. Feeding with aerosols is 10-12 hours, for injecting the dose of 2-3 days (Ballarini *et al* 1971). In addition, drug losses in the ventilator circuit reduce the efficiency of drug delivery (Dhand 2007). The route of administration endotracheal allows certainly reach directly targeted by reducing the latency time. The choice should, however, laid on mucolytic agents acting directly and at high concentrations. Acetylcysteine is the most effective of the 3 agents used in this study in lowering viscolasticity. NAC to 20% is ideal for this purpose.

REFERENCES

1. Adams H.R. (1999): *Farmacologia e terapeutica veterinaria*. 2° edizione italiana. EMSI, Roma
2. Aiello S.E. (1998) *The Merck Veterinary Manual. Eighth ed.*, pp. 1730. Merck & Co. Whitehouse Station, N.J.
3. Anon (2001): International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. *Equine Veterinary Journal* 33, 5-19
4. Ballarini G., Signorini G.C., Zannetti G. (1971): Osservazioni cliniche sull'impiego in medicina veterinaria dell'N-Acetil-L-cisteina, un nuovo mucolitico ad azione topica e sistemica. *La Nuova Veterinaria* 3, 151-167
5. Chavko M., Adeeb S., Ahlers S.T., McCarron R.M. (2009): Attenuation of pulmonary inflammation after exposure to blast overpressure by N-Acetylcysteine amide. *Shock* 32(3), 325-331
6. Christmann U., Wells E.G., Waldrige B.M., Schumacher J., Grier B.L., Hite R.D. (2008): Abnormalities in lung surfactant in horses clinically affected with recurrent airway obstruction (RAO). *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1452-1455
7. De Backer P., Vandercastele-Thienpont L.M.R., Jonckheere J.A.A., Belpaire F.M., Debackere M., De Leenheer A.P. (1980): Bioavailability of bromhexine in the horse. *Zbl. Vet. Med. A* 27(9-10), 740-745
8. Dhand R. (2007): Inhalation therapy in invasive and noninvasive mechanical ventilation. *Curr. Opin. Crit. Care* 13, 27-38
9. Dixon P.M. (1992): Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. *The Veterinary Record* 131, 229-235.
10. Dixon P.M., McGorum B.C., Pirie R.S. (2003): Inflammatory airway disease: European clinicians' perspective. In Havemeyer Foundation Monograph Series N°9. Eds A. Hoffman, N.E. Robinson and J.F. Wade. *Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: defining the syndrome*. 30th sept.-3rd oct. 2002, Boston. R & W Publications, Newmarket, 7-8
11. Dulfano M.J. & Adler K.B. (1975): Physical Properties of Sputum (VII) Rheologic Properties and Mucociliary Transport. *Am. Rev. Resp. Dis.* 112, 341-359.
12. Gerber V., King M., Schneider D.A., Robinson N.E. (2000): Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal* 32(5), 411-417
13. Gerber V., Jefcoat A.M., Hotchkiss J.A., King M., Robinson N.E. (2003): Quantifying and characterising mucus in the airways. In Havemeyer Foundation Monograph Series N°9. Eds A. Hoffman, N.E. Robinson and J.F. Wade. *Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: defining the syndrome*. 30th sept.-3rd oct. 2002, Boston. R & W Publications, Newmarket, 59-61
14. Gerber V., Robinson N.E., Luethi S., Marti E., Wampfler B., Straub R. (2003): Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. *Equine Veterinary Journal* 35(5), 491-495
15. Gerber V., Straub R., Marti E., Hauptman J., Herholz C., King M., Imhof A., Tahon L., Robinson N.E. (2004): Endoscopic scoring of mucus quantity and

- quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal* 36(7), 576-582
16. Gogny M. (1995): *Thérapeutique en pathologie respiratoire*. Encyclopédie Vétérinaire, Paris, Pharmacologie-toxicologie 0300, 1-9
 17. Hasegawa I., Niisato N., Iwasaki Y., Marunaka Y. (2006) : Ambroxol-induced modification of ion transport in human airway Calu-3 epithelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(2), 475-482
 18. Hodgson J.L. (2003): Significance of tracheal inflammation. In Havemeyer Foundation Monograph Series N°9. Eds A. Hoffman, N.E. Robinson and J.F. Wade. *Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: defining the syndrome*. 30th sept.-3rd oct. 2002, Boston. R & W Publications, Newmarket, 49-51
 19. Holcombe S.J. (2005): Epidemiology of airway inflammation and mucus in horses. *AAEP Proceedings* 51, 337-341
 20. Holcombe S.J., Robinson N.E., Derksen F.J., Bertold B., Genovese R., Miller R., de Feiter Rupp H., Carr E.A., Eberhart S.W., Boruta D., Kaneene J.B. (2006): Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal* 38(4), 300-304
 21. Keller H., Faulstich A., Elker M., Grell M., Wuschko S., Rehders J.H. (2001): Klinische Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von N-Acetylcystein bei der Behandlung del COB/COPD del Pferdes. *Der Praktische Tierarzt* 82(2), 108-117
 22. King M., Gilboa A, Meyer F, Silberberg A. (1974): On the transport of mucus and its rheologic simulants in ciliated systems. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 110, 740-745.
 23. King M. (1987): Viscoelasticity of Respiratory mucus and transport by cough. *Inserm Seminar Reims*, 24, 4-8.
 24. Kopitar Z., Leder O. (1971): Autoradiographic studies on the distribution of 14 C-labelled Bisolvon in the rat and mouse. *Arzneimittelforschung* 21(7), 914-918
 25. Lieberman J. (1968): Measurement of sputum viscosity in a cone plate viscometer. II) An Evaluation of Mucolytic Agent *in vitro*. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 97, 654-662.
 26. Litt M. (1981): Mucous secretions in the Respiratory tract. *Chest*. 80 (number 6 suppl.), 847.
 27. Lopez-Vidriero M.T., Das I., Reid L. (1977): Airway secretion: Source, biochemical and rheological properties. In: *Respiratory Defence Mechanism (part 1)*, Ed. by J.D. Brain, D.F. Proctor d L. Reid - Marcel Dekker, New York, pp. 289-365.
 28. Lugo J., Harkema J.R., deFeijter-Rupp H., Bartner L., Boruta D., Robinson N.E. (2006): Airway inflammation is associated with mucus cell metaplasia and increased intraepithelial stored mucosubstances in horses. *The Veterinary Journal* 172, 293-301
 29. Marriott C., Irons L. (1974): A study of the rheology and biochemistry of saliva and tracheobronchial mucus gels. *Biorheol.* 11, 119-128.
 30. Martin R. Litt M., Marriott C. (1980): The effect of mucolytic agents on the

- rheologic and transport properties of canine tracheal mucus. *Am. Rev. Resp. Dis.* 121, 495-500.
31. Morandini G.C. *et al.* (1986) Recent advances of knowledge on the mechanism of action of drugs modifying the bronchial secretions. *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, 6, 415-423.
 32. Pearce H.G., Wyburn R.S., Goulden B.E. (1979): Uber den klinischen Einsatz von Bisolvon bei einigen Erkrankungen der Atemwege des Pferdes. *Tierarztl. Umschau* 34, 48-55
 33. Pietra M., Guglielmini C., Forni M., Cinotti S. (2000) *In vitro* mucolytic activity of recombinant human deoxyribonuclease on equine tracheobronchial mucus. *Veterinary Record* 147, 627-629
 34. Puchelle E., Zahm J.M., Girard F., Bertrand A., Polu J.M., Aug F., Sadoul P. (1980): Mucociliary transport *in vivo* and *in vitro*. Relations to sputum properties in chronic bronchitis. *Eur. J. Resp. Dis.* 61, 254-264.
 35. Puchelle E. *et al.* (1973) Données biochimiques et rhéologiques dans l'expectoration. III-Relation des protéines et mucines bronchiques avec les propriétés réologiques. *Bull. Physiopath. Respir.*, 9, 237-256.
 36. Quintavalla F., Signorini G. (1992): *Il Medicinale Veterinario: terapia e legislazione*. Edizioni SBM - Noceto (PR) pp 123-127
 37. Richardson P.S. & Phipps R.J. (1978): The anatomy, physiology, pharmacology and pathology of tracheobronchial mucus secretion and the use of expectorant drugs in human disease. *Pharmacol. Ther. B* 3, 441-479
 38. Rush B.R. (2003): Inflammatory airway disease: a clinician's view from North America. In Havemeyer Foundation Monograph Series N°9. Eds A. Hoffman, N.E. Robinson and J.F. Wade. *Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: defining the syndrome*. 30th sept.-3rd oct. 2002, Boston. R & W Publications, Newmarket, 3-6
 39. Ryhner T., Muller N., Balmer V., Gerber V. (2008): Increases mucus accumulation in horses chronically affected with recurrent airway obstruction is not associated with up-regulation of CLA1, EGFR, MUC5AC, Bcl-2, IL-13 and INF-gamma expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 125(1/2), 8-17
 40. Sass B.O. (1985): Lungenfunktionanalysen vor und nach massiver Infusionsbehandlung bei Pferden mit Chronischen Bronchialerkrankungen. *Inaugural Dissertation* – Hannover. Sasse W. & Deegen E. (1984): Zur Wirksamkeit von Sputolysin bei Pferden mit chronischen Bronchialerkrankungen. *Tierärztliche Umschau* 39, 941-945
 41. Sheffner A.L. (1963): The *in vitro* reduction in viscosity of mucoprotein in solution by a new mucolytic agent N-acetylcysteine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 106, 298-310.
 42. Sonea I.M. *et al.* (1999) Distribution of substance P binding sites in equine airways. *Equine Veterinary Journal*, 31 (3), 238-242.
 43. Walters C.R., Marriott C. (1987): Effect of S-carboxy-methylcysteine, N-acetylcysteine and bromhexine on tracheal mucus secretions in the mini-pig. *J. Pharmac. Pharmacol.*, 39: suppl. 1, 144.
 44. Winder N.C., Von Fellenberg R. (1987): Chronic small airway disease in horses

- slaughtered in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 129, 585-593
45. Zannetti G., Dondi M., Predieri P., Vecchietti L. (1993): Terapia delle broncopneumopatie del cavallo con N-acetilcisteina ad alto dosaggio. *Ippologia* 4(3), 69-78

**MOLECULAR TYPING OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*
STRAINS ISOLATED FROM DOGS BY TOXIN GENE
AMPLIFICATION**
*TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM*
PERFRINGENS ISOLATI DA CANI*

ZERBINI Laura, OSSIPRANDI Maria Cristina

Summary

Clostridium perfringens is common in the environment and in the intestinal tract of humans and domestic and wild animals. Probably, this microorganism is one of the most widespread pathogenic bacteria and it is undeniably the most important cause of clostridial disease in humans and animals. The species is classified into five types (A to E), based on the possession of one or more of four major toxin genes (α , β , ϵ , and ι). However, *C. perfringens* can produce up to 15 toxins in various combinations, responsible for the pathogenesis of the disease.

In the present study, a total of 95 canine faecal samples (36 from diarrhoeic and 59 from non-diarrhoeic dogs), collected from July 2006 to March 2007, were analyzed by culture assay. Some dogs were shelter dogs, others belonged to students or staff of the Veterinary Medicine Faculty of Parma, and others were dogs admitted to the Faculty Veterinary Hospital.

Fourteen faecal samples (14.7%) were positive for *C. perfringens* presence. All isolates were screened for identification of enterotoxigenic strains and characterization of the toxinotype, utilizing (a) a duplex PCR, which amplify simultaneously the phospholipase C gene (*plc*) and the enterotoxin gene (*cpe*) fragments, and (b) a multiplex PCR, which detect alfa, enterotoxin, beta, epsilon, iota, and beta2 (*cpa*, *cpe*, *cpb*, *etx*, *iap*, and *cpb2*) toxin-encoding genes.

All 14 isolates screened by duplex PCR were *plc*-positive and *cpe*-negative. The result was confirmed by multiplex PCR (*cpa*+/*cpe*-). In particular, 13 strains (92.9%) were type A (*cpa*+) and 3 of them (23.1%) also possessed the beta2 toxin (CPB2)-encoding gene. One isolate (7.1%) was type D (*cpa*+/*etx*+) and possessed CPB2 gene. On the whole, 4 of the 14 strains (28.6%) tested *cpb2*-positive.

The results of this study highlight that the majority of our *C. perfringens* isolates belonged to type A and a relatively high percentage of strains carried the CPB2 gene, that varies with the genotype, but that was detected especially in type A.

We can conclude that multiplex PCR may provide a useful and reliable tool for *C. perfringens* genotyping in routine veterinary diagnostics.

Key Words: *Clostridium perfringens*, dog, multiplex PCR

Department of Animal Health, Section of Veterinary Microbiology and Immunology. Faculty of Veterinary Medicine - University of Parma Via del Taglio, 10 43126 Parma – Italy, Correspondence: mariacristina.ossiprandi @ unipr.it

INTRODUCTION

Clostridium perfringens is an important enteropathogenic agent in veterinary medicine. It is a normal inhabitant of the gastrointestinal tract of humans and animals and is commonly found in the soil. Probably, this microorganism is one of the most widespread pathogenic bacteria and it is undeniably the most important cause of clostridial disease in humans and animals. It causes gas gangrene and food poisoning in humans and several enterotoxaemic diseases in domestic [13] and wild animals [16].

The species is classified into 5 toxinotypes (A, B, C, D, and E) according to the production of 4 major typing exotoxins, namely α (CPA), β (CPB), ϵ (ETX), and ι (ITX) (Table 1) [16]. However, *C. perfringens* can produce up to 15 toxins in various combinations, including lethal toxins such as perfringolysin O, enterotoxin (CPE), and beta2 toxin (CPB2), which are not used in the typing of this microorganism [16].

The different toxinotypes cause different forms of enteritis and enterotoxaemia in various hosts [2].

Clostridium perfringens is an anaerobic, encapsulated, Gram-positive, rod-shaped bacterium with blunt ends that occur singly or in pairs. Bacteria are non-motile, reduce nitrate, ferment glucose, lactose, maltose, sucrose, and other sugars, and liquefy gelatin. The microorganism, first described by William Welch and George Nuttall in 1892 as *Bacillus aerogenes capsulatus*, has also been commonly known as *C. welchii*, especially in Great Britain. Spores of *C. perfringens* usually are rare or absent in cultures grown in ordinary media, so it must be recognized by its other characteristics. It grows vigorously at temperatures between 20 and 50°C, with an optimum of 45°C for most strains. Colonies of all toxinotypes of *C. perfringens* after 24 hours of incubation are usually 3-5 mm in diameter, grayish, and circular. On blood agar they usually show a characteristic double-zone haemolysis around the colony: an inner clear zone due to θ toxin, and an outer hazy zone due to α toxin [7].

Table 1: The major toxins of *Clostridium perfringens*

<i>Clostridium perfringens</i>	Major toxins			
Type	Alpha	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TOXIN AND ENZYME GENES

The α toxin gene, *cpa*

All strains of *C. perfringens* (types A to E) carry the α toxin gene (*cpa*, sometimes referred to as *plc*). Unlike many of the virulence genes of *C. perfringens* that are located on plasmids, the CPA gene is located on the chromosome. *C. perfringens* CPA is a zinc-metallophospholipase C sphingomyelinase that hydrolyzes phospholipids and sphingomyelin, causes disorganization of plasma membranes, and requires calcium ions for interaction with substrate. It is responsible for the lecithinase reaction on egg yolk medium and for the hazy zone of haemolysis on blood agar. Comparative analysis of the deduced amino acid (aa) sequence of the 398-aa CPA precursor polypeptide revealed that it has three distinct domains [13]. The first 28 aa represent a classical signal peptide sequence, as expected for a secreted protein. The second domain, from aa 1 to 248 of the mature protein, has sequence similarity (29.0% identity) to the smaller (245 aa) non-toxic phospholipase C from *Bacillus cereus* and clearly contains the phospholipase C domain. The third domain, from aa 249 to 370, has sequence similarity (29.0% identity) to human arachidonate-5'-lipoxygenase, an enzyme involved in the arachidonic acid cascade. This domain is not present in the *B. cereus* enzyme and, although it has no known intrinsic enzymatic activity, it is necessary for the haemolytic, lethal, and sphingomyelinase activities of the CPA. This latter appears to involve the same active site responsible for phospholipase C activity [13].

Alpha toxin has been shown to affect myocardial contractility, causing hypotension and bradycardia, resulting in shock, a common and often fatal feature of gas gangrene. The toxin also increases vascular permeability, as can be demonstrated by i.d. injection [7].

The β toxin gene, *cpb*

Beta toxin is produced by *C. perfringens* type B and C strains. Like ϵ toxin, it is encoded on a large uncharacterized plasmid [13]. The structural gene, *cpb*, has been cloned and shown to encode a single polypeptide (336 aa) with a 27-aa signal sequence, which upon secretion is cleaved to produce a 309-aa trypsin-sensitive extracellular toxin. Beta toxin has significant sequence similarity (based on 17.0% to 28.0% identity) to other toxins, including the *Staphylococcus aureus* α toxin, components of the γ toxin, components of leukocidin from *S. aureus*, and the cytotoxin K of *B. cereus*. Although these toxins are all classified as pore-forming cytolysins, CPB is not cytolytic and its cytotoxic mode of action remains unknown [13].

Beta toxin is lethal and necrotising. This toxin is sensitive to trypsin and this explains the predilection of types B and C for neonates, as colostrum has anti-trypsin activity. It is a labile toxin which may be destroyed if the transfer to the laboratory of small intestinal specimens, containing the toxin, is delayed. The CPB is the most important factor in the enterotoxaemias caused by type B strains [12].

The ϵ toxin gene, *etx*

Type B and type D strains of *C. perfringens* are characterized by their ability to produce ϵ toxin, which is secreted as an inactive prototoxin (328 aa) and is activated

in the gastrointestinal tract by proteolytic cleavage [13]. The ETX structural gene, *etx*, is encoded on an extrachromosomal element, but little is known about this large host plasmid [11].

The *etx* gene encodes a single polypeptide that has a 32-aa signal peptide sequence; trypsin cleaves another 13 aa from the secreted prototoxin to form an active 283-aa toxin (31.2-kDa). The prototoxin can also be activated by cleavage with *C. perfringens* λ and k toxins. Little is known about the mode of action of ETX. Structure-function studies have led to the identification of several essential amino acids, including the sole tryptophan residue.

The toxin is lethal and dermonecrotic; after entering the blood circulation, it causes swollen hyperaemic kidneys, lungs oedema, and excess pericardial fluid [7]. It is consistent with the pathology observed in both type B and type D enterotoxaemia [13]. The ETX can be regarded as an enterotoxin and a neurotoxin [12]. It is particularly active against hippocampal cells and kidney cells.

The ι toxin genes, *iap* and *iab*

The relatively rare type E strains of *C. perfringens* produce ι toxin which, unlike all other extracellular *C. perfringens* toxins, is a binary toxin that consists of two separate proteins, designed ι -a and ι -b. The ITX genes are located on a plasmid, and both are located within the same stretch of DNA in the same reading frame. The active 47.5-kDa component ι -b is encoded by the *iap* gene and has actin-specific ADP-ribosyltransferase activity, whereas the 71.5-kDa binding component ι -a is encoded by the *iab* gene [13]. The ι -a component has the conserved ADP-ribosylation site found in other ADP-ribosylating toxins and a conserved actin-binding motif. In addition, ι -b has 33.0% sequence identity with the protective antigen component of anthrax toxin, including the central trans-membrane domain that is involved in cell membrane translocation, although the mode of action of these proteins is not identical. The ITX is very closely related to the binary toxin from *C. spiroforme*, in serological, biological, and enzymatic activities. A similar binary toxin is also produced by *C. difficile*. The precise role in virulence of the ι toxin family remains to be determined [13].

In addition to mouse lethality after i.v. injection, ι toxin has dermonecrotic activity. It was found to be activated by trypsin in cultures incubated for up to 5 to 7 hours, but not in older cultures. At subnecrotizing doses, ITX injected intracutaneously increases vascular permeability [7].

The β 2 toxin gene, *cpb2*

A distinct toxin known as β 2 toxin was first cloned and sequenced by Gibert M. et al. (1997) [6] from *C. perfringens* type C strain isolated from a piglet with necrotizing enterocolitis. The CPB2 gene, *cpb2*, is also found on a large plasmid (50-kb) [6] but the amino acid sequence has no significant homologies with *cpb* from the CPB (15.0%) or other known proteins [14, 17].

The *cpb2* gene encodes for a 31-kDa protein which is processed post-translationally to the biologically active 28-kDa toxin [14].

C. perfringens strains harboring *cpb2* (encoding CPB2) have been isolated

from the intestines of several animal species with enteritis. Therefore, a causal relationship with CPB2 toxigenic *C. perfringens* has been postulated [17]. However, existence of toxin genes does not necessarily imply production of the toxins, and CPB2 production *in vivo* has only rarely been documented [17].

The biological activity of the CPB2 is comparable with that of the CPB. It is lethal to mice (minimal lethal dose: 3 µg i.v.) and also causes haemorrhagic necrosis of the intestinal wall in the guinea pig ligated loop model [14].

Throughout the last years several studies have shown a wide distribution of β2 toxigenic *C. perfringens* strains in various animal species. *C. perfringens* harbouring *cpb2* was isolated from various ruminants (sheep, cattle, reindeer), horses, pigs and carnivores (dogs, cats, polar bears and seals), poultry and fish. Beta2 toxin isolation was made both from diseased and healthy animals. The *cpb2* gene was detected in all types (A-E) in different animal species and food isolates [14].

The enterotoxin gene, *cpe*

The *C. perfringens* enterotoxin was isolated and purified and found to be a protein with a molecular mass of 35-kDa and an isoelectric pH of 4.3. The amino acid sequence has been determined (319 aa). The peptide has one free sulfhydryl group. The activity of the enterotoxin is enhanced threefold by treatment with trypsin [7].

C. perfringens strains that carry a chromosomal *cpe* are primarily associated with human food-borne disease, whereas strains with plasmid *cpe* gene are associated with disease human non-food-borne diseases and animal diseases, including canine diarrhoea [9].

The mechanism of action of the enterotoxin seems to involve direct binding of the toxin to receptors on the surface of intestinal epithelial cells. Binding is followed by insertion of the entire molecule into the cell membrane, without internalization into the cell. A sudden change of ion fluxes occurs, affecting cellular metabolism and macromolecular synthesis. As intracellular calcium ion levels increase, morphological damage occurs, resulting in greatly altered membrane permeability and loss of cellular fluid and ions and moderate sized molecules up to 3.5-kDa. Under some conditions, a loss of protein molecules may occur, but this may reflect cell death. Based on rabbit studies, the CPE is most active in the ileum, moderately active in the jejunum, and essentially inactive in the duodenum [7].

The CPE is a well-characterized virulence factor whose production is coregulated with sporulation [8]. However, the nature of the regulatory mechanisms that prevent *cpe* expression in vegetative cells and activate expression in sporulating cells is not known [13].

This toxin has been identified in approximately 5% of all *C. perfringens* isolates, with the highest prevalence of production by type A strains. It has been established that type C and D strains also can produce CPE. There is evidence that most type E strains of *C. perfringens* carry *cpe* in a plasmid; however only a few strains of types B and E have been tested for enterotoxin production, and all were negative [7].

The θ and κ toxin genes, *pfoA* and *cola*

The genes encoding the θ and κ toxins are located within an approximately 10-kb region on the *C. perfringens* chromosome. These genes, *pfoA* and *cola*, which encode a haemolysin (perfringolysin O) and a collagenase, respectively, are separated by the *pbg* gene, which encodes a β -galactosidase, and an operon whose products have sequence similarity to proteins involved in arginine metabolism.

The *pfoA* gene encodes a polypeptide that consists of a 27-aa signal peptide and the mature 500-aa perfringolysin O protein (θ toxin). The crystal structure of perfringolysin O has been determined. The protein has an unusually elongated shape and contains four discontinuous domains. Biochemical studies have suggested that aggregation of perfringolysin O on the membrane is essential for haemolytic activity [13].

This toxin is responsible for the clear zone of haemolysis produced by at least some strains of all toxinotypes. It is an oxygen-labile, thiol-activated cytolysin, similar but not identical (40.0 - 70.0% identity) to some haemolysins produced by other species (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *C. tetani*, and *C. novyi*) [7]. In effect, the toxin has 65.0% homology with streptolysin O and 42.0% with pneumolysin. All three haemolysins share an identical region of 12 aa residues that include the single cysteine residue of the molecule, which is involved in the thiol activation.

The θ toxin, activated by cysteine, is lethal for mice (i.v. injection), and the lethality is reportedly due to the cardiodepressant effect of toxin-induced release of endogenous mediators such as platelet-activating factor [7].

The *cola* gene from a *C. perfringens* type C strain has been cloned and sequenced. It encodes a 126-kDa preprocollagenase, which is cleaved to produce a 116-kDa extracellular collagenase that is closely related (36.4% identity) to the collagenase from *C. histolyticum* [13]. As expected for a zinc metalloprotease, the mature collagenase protein contains a consensus zinc-binding domain. The role of the collagenase in virulence remains to be determined.

The sialidase genes, *nanH* and *nanI*

Like many pathogens, *C. perfringens* produces extracellular sialidases or neuraminidases, which have the ability to hydrolyze the sialic acid residues located on many mammalian cell membranes. Two distinct *C. perfringens* sialidase genes, *nanH* (which encodes the small sialidase), and *nanI* (which encodes the large sialidase) have been cloned and sequenced.

The *nanH* gene encodes a 382-aa or 42.8-kDa polypeptide that does not have a typical hydrophobic leader sequence. The resultant small NanH sialidase is closely related to sialidases from *C. sordellii* and *C. septicum*, although the latter enzyme is significantly larger.

The *nanI* gene encodes a 694-aa polypeptide that includes a 41-aa hydrophobic signal sequence, leading to secretion of the mature 73.0-kDa large sialidase enzyme. This enzyme, which is often called the large NanH sialidase, has 26.0% sequence identity to the small *C. perfringens* sialidase and is most closely related to the large *C. septicum* enzyme. The *C. perfringens* sialidases differ in their pH and temperature optima and substrate specificity [13].

Both the *nanH* and the *nanI* genes are chromosomally determined [13].

Neuraminidase, or sialidase, serves many microorganisms as a pathogenicity factor in a variety of ways. Its action on erythrocytes may render them panagglutinable, resulting in increase of blood viscosity and promoting capillary thrombosis. Its modification of gangliosides on host cell surfaces may allow more direct contact of pathogens with the host, or it can provide suitable receptors for other toxins produced by the same or other microorganisms [7].

Genes encoding other extracellular toxins or enzymes

C. perfringens also encodes other extracellular enzymes and toxins, whose roles in virulence are unknown. Some of these genes have been cloned and analyzed. The *nagH* gene is located within 30 kb of *colA* on the *C. perfringens* chromosome and encodes a 114-kDa secreted endo- β -N-acetylglucosaminidase, or hyaluronidase, which is also known as the μ toxin. The deduced protein contains several repeated motifs, which is typical for a carbohydrate-binding protein [13]. This toxin strengthens the action of other virulence factors such as CPA [10].

A caseinase gene, *lam*, which encodes a 36-kDa thermolysin-like zinc metalloprotease, has been cloned from a type B strain and designated as the λ toxin. The *lam*-encoded protease appears to be secreted as a proenzyme that contains a long 200-aa precursor sequence. The mature protein not only contains the expected zinc-binding motif, but also has consensus sequences of the thermolysin protease family. Although the *lam* gene is clearly located on a 70-kDa plasmid in this strain, other studies have reported the presence of a much smaller plasmid that also carries a caseinase-encoding gene. Lambda toxin may have a role in the activation of ETX [13]. It is associated with *C. perfringens* types B, D, and E but has not been detected in type A and C strains. It is a proteinase that digests gelatin, haemoglobin, and casein to some extent, but not collagen [1, 7].

Delta toxin is a haemolysin produced by type B and C strains, but not by type A, D, and E strains.

It has a molecular mass of 42-kDa and an isoelectric pH of 9.1. It has high haemolytic activity for erythrocytes from sheep, goats, and pigs, but is relatively inactive against those from humans, horses, rabbits, mice, and other mammals. The activity is inhibited by gangliosides (especially GM2), but not by other lipid compounds such as sphingomyelin, lecithin, or cholesterol [1, 7].

Aim of the study

The typing of *C. perfringens* strains was originally established on neutralization of the pathological effect of each major toxin, both trypsin-treated and untreated, with appropriate antisera in laboratory animal models [2]. In diagnostic laboratories this differentiation has been replaced by rapid and easy to use enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Although the ELISAs allow reliable typing of this *C. perfringens* isolates, they not detect the CPB2. In addition, high levels of enterotoxin CPE have been shown to be present during sporulation only. Nevertheless, the sporulation needs specific cultivation methods [4]. These problems could be solved by genotyping *C. perfringens* strains.

The detection of *C. perfringens* toxinotypes and subtypes is critical for a better understanding of the epidemiology of *C. perfringens* infections, and may be helpful in the development of effective preventive measures. Therefore, various PCR protocols including multiplex PCR assays have been established to genotype *C. perfringens* isolates [2].

The objective of this investigation was to evaluate by duplex and multiplex PCR assays the molecular toxin gene profile of *C. perfringens* strains isolated from faecal samples, belonging to diarrhoeic and healthy dogs and collected at the Veterinary Medicine Faculty of Parma.

MATERIALS AND METHODS

Samples. Ninety-five faecal samples were collected over an 8 month period (20th July 2006 - 20th March 2007) from diarrhoeic (n=36) and non-diarrhoeic (n=59) dogs. Thirty-eight were shelter dogs (diarrhoeic n=3, non-diarrhoeic n=35), 47 were privately-owned dogs (diarrhoeic n=26, non-diarrhoeic n=21) belonging to students or staff of the Veterinary Medicine Faculty of Parma, and another 10 dogs were patients at the Faculty Veterinary Hospital (diarrhoeic n=7, non-diarrhoeic n=3).

Assays were performed on specimens collected within 3 hours after natural voiding. After analysis, samples were immediately stored at -20°C.

Isolation and identification of *C. perfringens* strains. All faecal samples were cultured onto prereduced blood agar plates, containing vitamine K, sheep blood and haemin (Schaedler agar, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), and at the same time inoculated in cooked meat broth (Oxoid, England). Plates were incubated anaerobically at 37°C for 48-72 hours. After 72 hours of incubation in cooked meat broth, the samples were subjected to heat shock for spore selection and then cultured onto Schaedler agar. Preliminary *C. perfringens* identification was made based on colony morphology (circular-to stellate and smooth), presence of a distinctive double zone of haemolysis, and Gram staining (Gram-positive short, plump rods with blunt ends, "box cars") (Figure 1a and 1b). The species identification was confirmed through the Rapid ID32A assay (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). All isolates were stored on cryopreservation beads (MAST Diagnostics, D.I.D, Diagnostic International Distribution S.p.A., Italy) at -70°C.

Reference strains. *C. perfringens* *cpa*+/*cpe*+, kindly provided by Istituto Superiore di Sanità in Rome (Italy), was utilized as positive control for duplex PCR. *C. perfringens* ATCC12917, NCTC8346, ATCC373, and ATCC27324 were used as *cpa*+/*cpe*+, *cpa*+/*etx*+, *cpa*+/*cpb*+/*cpb2*+ and *cpa*+/*iap*+/*cpe*+/*cpb2*+ controls, respectively, for multiplex PCR.

Isolation of *C. perfringens* DNA. For each *C. perfringens* strain, a 100- μ l suspension of cells in sterile water was vortexed, incubated at 100°C for 5 min., and centrifuged at 12,000 g (Microliter Centrifuge, Hermle Z 233 M-2, Delchimica Scientific Glassware s.r.l.) for 2 min. Five μ l of this preparation were used as the DNA template for all PCR assays.

Duplex PCR for the *C. perfringens* phospholipase C and CPE encoding genes. Two sets of primers which amplify simultaneously the 283 bp *C. perfringens* phospholipase C gene (*plc*) and the 426 bp enterotoxin gene (*cpe*) fragments, were

used, as previously described by Fach P. and Popoff M.R. [5]. Amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis (120 V, 1 h) and visualized by ethidium bromide staining and ultraviolet light exposure.

Multiplex PCR for the *C. perfringens* toxins encoding genes. All *C. perfringens* isolates were also PCR-screened for the detection of alfa (*cpa*), beta (*cpb*), epsilon (*etx*), enterotoxin (*cpe*), iota (*iap*), and beta2 (*cpb2*) toxin encoding genes, as described by Baums C.G. et al. [2] (Table 2). The reaction products were subjected to agarose gel electrophoresis as mentioned above.

Figure 1: (a) Typical colonies of *Clostridium perfringens* onto Schaedler agar showing characteristic dual haemolytic zones and (b) characteristic Gram-positive short, plump rods with blunt ends, “box cars” of *C. perfringens* by Gram staining (x1000)

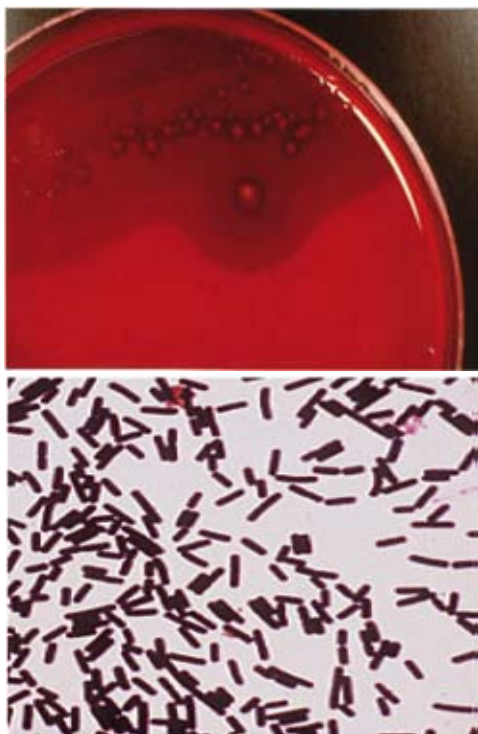


Table 2: Target toxin gene, toxin, oligonucleotide primer sequences and length of amplification products of the *Clostridium perfringens* multiplex PCR [2]

Toxin gene	Toxin	Primers	Sequence (5' 3')	Length of amplification product (bp)
<i>cpa</i>	α	CPA5L CPA5R	5'- AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA -3' 5'- TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC -3'	900
<i>cpb</i>	β	CPBL CPBR	5'-TCC TTT CTT GAG GGA GGA TAA A -3' 5'- TGA ACC TCC TAT TTT GTA TCC CA -3'	612
<i>cpe</i>	CPE	CPEL CPEP	5'- GGG GAA CCC TCA GTA GTT TCA -3' 5'- ACC AGC TGG ATT TGA GTT TAA TG -3'	507
<i>etx</i>	ϵ	CPETXL CPETXR	5'- TGG GAA CTT CGA TAC AAG CA -3' 5'- TTA ACT CAT CTC CCA TAA CTG CAC -3'	396
<i>iap</i>	ι	CPIL CPIR	5'- AAA CGC ATT AAA GCT CAC ACC -3' 5- CTG CAT ACC CTG GAA TGG CT -3'	293
<i>cpb2</i>	β_2	CPB2L CPB2R	5'- CAA GCA ATT GGG GGA GTT TA -3' 5'- GCA GAA TCA GGA TTT TGA CCA -3'	200

RESULTS

Overall, 14 canine faecal samples were positive for *C. perfringens* (14/95: 14.7%; I.C. 95.0%: 8.6 to 23.0). The isolation rate from diarrhoeic dogs (6/36: 16.7%) was similar to the isolation rate from healthy dogs (8/59: 13.6%). The difference is not statistically significant ($P=0.170$, Upton's Chi-square test). In one dog, affected by megaesophagus and treated with antibiotics for enteritis, *C. difficile* was also isolated.

None of the 14 strains were enterotoxin-positive (*plc+/cpe-*) by duplex PCR (Figure 2). This result was confirmed by multiplex PCR assay (*cpa+/cpe-*). In particular, 13 isolates (13/14: 92.9%) were type A (*cpa+*), of which 3 (3/13: 23.1%) possessed the CPB2 toxin-encoding gene. Finally, 1 strain (1/14: 7.1%) was type D (*cpa+/etx+*) and possessed CPB2 gene (Figure 3). On the whole, 4 of the 14 strains (28.6%) tested *cpb2*-positive.

Six type A strains (3 *cpa+*, and 3 *cpa+/cpb2+*) were isolated from faecal samples of dogs with enteritis. The other 7 type A isolates and the type D strain were from canine non-diarrhoeic faeces (Table 3).

Figure 2: Duplex PCR of selected *Clostridium perfringens* isolates

Lane 1: negative control (“0 DNA”); lanes 2-7: *C. perfringens* isolates; lane 8: *C. perfringens* positive control, *plc*+/*cpe*+; lane 9: molecular size markers (100 bp Molecular Ruler, Biorad, Italy).

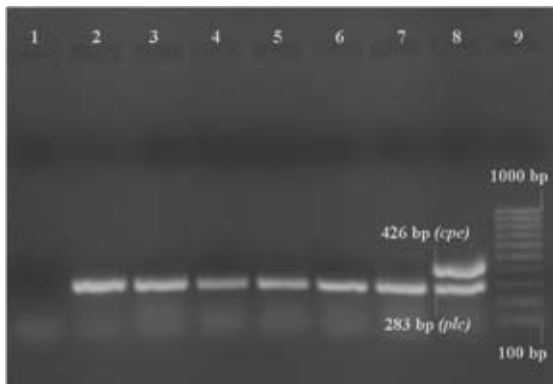


Figure 3: Multiplex PCR typing of selected *Clostridium perfringens* isolates

Lanes 1, 3, 4 and 8: type A strains (*cpa*+); lanes 2, 5 and 7: type A, *cpb2*+ strains; lane 6: type D, *cpb2*+ strain; lane 9: *C. perfringens* positive control (*cpa*+/*cpb*+/*cpe*+/*etx*+/*iap*+/*cpb2*+); lane 10: negative control (“0 DNA”); lane 11: molecular size markers (100 bp Molecular Ruler, Biorad, Italy).

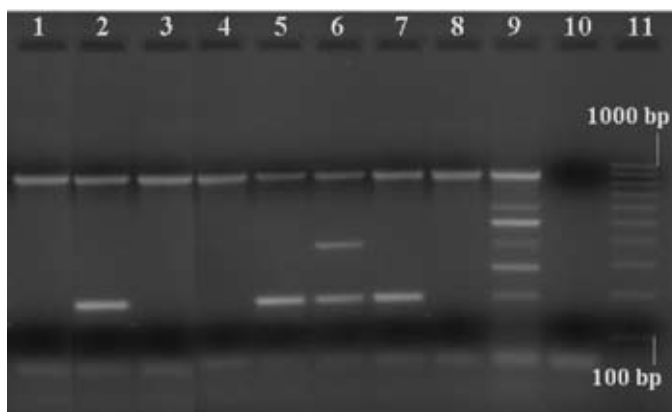


Table 3: Relationship between the genotype obtained by multiplex PCR and the phenotype of the 14 *C. perfringens* isolates

<i>C. perfringens</i> strains N0.	Genotype	Toxin	Toxinotype	Dog faeces
13	3 <i>cpa</i>	α		Diarrhoeic
	3 <i>cpa</i> , <i>cpb2</i>	α , $\beta 2$	Type A	Diarrhoeic *
	7 <i>cpa</i>	α		Non-diarrhoeic
1	<i>cpa</i> , <i>etx</i> , <i>cpb2</i>	α , ϵ , $\beta 2$	Type D	Non-diarrhoeic

* *Clostridium difficile* was also isolated from one dog.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

C. perfringens is commonly found in soil samples and is also readily found in intestinal contents of healthy humans and other animals [7]. This bacterium is a part of the normal canine intestinal flora and is readily cultured from more than 80% of both diarrhoeic and non-diarrhoeic dogs.

C. perfringens type A, that is often responsible for gas gangrene (myonecrosis) and foodborne illness in humans [7], produces CPA but can also produce several of the non-typing toxins, including CPE and CPB2. CPE is responsible for human gastrointestinal disease and also has been associated with diseases in dogs, horses, pigs, and several other animal species, including one case of enteritis caused by *C. perfringens* type A *cpe*-positive in a goat [17]. Virtually all strains isolated from dogs are type A, with only one published report documenting a type C infection in five cases of canine peracute lethal haemorrhagic enteritis [9]. Diarrhoeal diseases associated with *C. perfringens* in the dog have primarily been attributed to CPE, which has been shown to induce fluid accumulation and diarrhoea in a canine model when administered orally or directly in the intestinal lumen [9]. Although several studies have shown an association between the immunodetection of CPE in faecal specimens and canine diarrhoea, the pathogenesis of *C. perfringens*-associated diarrhoea in the dog is not fully understood, because CPE is also detected in up to 14% of non-diarrhoeic dogs. Isolation of non-enterotoxigenic type A strains from a diarrhoeic specimen does not preclude involvement in disease, because there is a plethora of other virulence factors that have not been evaluated. One of these virulence factors is the recently characterized *C. perfringens* CPB2, which has been also associated with both necrotic enteritis in piglets and equine typhlocolitis [2, 3].

There is currently no gold standard for the diagnosis of canine *C. perfringens*-associated diarrhoea. It has been well documented that culture isolation of *C. perfringens* can not be considered of diagnostic value for canine *C. perfringens*-associated diarrhoea. Culture may be useful in procuring isolates for neutralization tests of each toxin and molecular techniques like PCR to detect specific toxin genes,

or molecular typing of strains to establish clonality in suspected outbreaks. Two commercially available immunoassays are currently used in veterinary diagnostic laboratories for CPE: a reverse passive latex agglutination assay (PET-RPLA, Oxoid, England) and an enzyme-linked immunoassay (*C. perfringens* Enterotoxin Test, TechLab, Inc., Blacksburg, VA). It is important to note that the performance characteristics for these assays have not been analyzed in the dog, and there are concerns about their sensitivities and specificities. Moreover, they not detect the CPB2 or other toxins. On the contrary, PCR genotyping [16] provides a useful alternative to *in vivo* toxin neutralization tests for typing of *C. perfringens* isolates. Genotype can, in many cases, provide the final piece of information needed to establish a diagnosis.

In this molecular study, we assessed the toxinotype of 14 *C. perfringens* isolates from 95 canine diarrhoeic and non-diarrhoeic faecal samples (14.7%). Percentages of positive cultures were similar in diarrhoeic and healthy dogs (16.7% versus 13.6%). This difference was not statistically significant ($P=0.170$, Upton's Chi-square test).

All 14 *C. perfringens* strains, except for one isolate tested type D, were type A by multiplex PCR. None strain resulted *cpe*-positive, but a high percentage of strains (28.6%: 4/14) were *cpb2*-positive. Three of the 6 *cpb2*-positive type A strains (50.0%) were from diarrhoeic animals. The type D isolate, positive for *cpb2*, came from a healthy dog.

We can not conclude that CPB2 is responsible for the enteritis in our strains because we didn't verify the $\beta 2$ protein expression *in vitro*. Therefore, care should be taken when interpreting the PCR results alone in the diagnosis of disease. It may be important to consider the use of an additional method for the detection of CPB2 in *cpb2*-positive isolates, such as neutralization test. Preferably, detection of CPB2 should be performed directly from the tissue in enteritis cases where CPB2 may be expected to play a role.

Probably, the high rate of occurrence of *cpb2*-positivity among strains isolated from animals with enteritis could be consistent with the contention, that CPB2 plays a role in pathogenesis of the disease [3, 15]. On the contrary, the detection of strains harbouring *cpb2* in healthy animals is not necessary a risk in itself, although $\beta 2$ -toxicogenic *C. perfringens* can become an emerging health threat if circumstances appear which provoke enteric dybiosis or immunosuppression [14].

We can conclude that multiplex PCR may provide a useful and reliable tool for *C. perfringens* genotyping in routine veterinary diagnostics. However, a phenotypic characterizations is required before drawing conclusions about the functionality of a particular toxin in the disease.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mrs. Cinzia Reverberi and Mr. Roberto Lurisi for their technical support.

REFERENCES

1. Alouf J.E., Jolivet-Reynaud C. (1981) Purification and characterization of *Clostridium perfringens* delta-toxin. Infect. Immun., 31: 536-546.
2. Baums C.G., Shotte U., Amsberg G., Goethe R. (2004) Diagnostic multiplex

- PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol., 100: 11-16.
3. Bueschel D.M., Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Songer J.G. (2003) Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. Vet. Microbiol., 94: 121-129.
 4. Duncan C.L., Strong D.H. (1986) Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol., 16: 82-89.
 5. Fach P., Popoff M.R. (1997) Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. Appl. Environ. Microbiol., 63: 4232-4236.
 6. Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R. (1997) Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. Gene, 203: 65-73.
 7. Hatheway C.L. (1990) Toxigenic Clostridia. Clin. Microbiol. Rev., 3: 66-98.
 8. Marks S.L. (2003) Bacterial gastroenteritis in dogs and cats. In: Proceedings of 28th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Bangkok, Thailand, October 24-27, 2003.
 9. Marks S.L., Kather E.J. (2003) Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. Vet. Clin. Small Anim., 33: 1029-1060.
 10. Okabe A., Cole S.T. (1997) Extracellular enzymes from *Clostridium perfringens* and *Clostridium histolyticum* that damage connective tissue. In: The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. Rood J.I., McClane B.A., Songer I.G., Titball R.W. Des, Academic Press, San Diego, 411-420.
 11. Payne D., Oyston P. (1997) The *Clostridium perfringens* ϵ -toxin. In: The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. Rood J.I., McClane B.A., Songer I.G., Titball R.W. Des, Academic Press, San Diego, 439-445.
 12. Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. (1994) *Clostridium* species. In: "Clinical Veterinary Microbiology", Ed. Wolfe, 191-208.
 13. Rood J.I. (1998) Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Ann. Rev. Microbiol., 52: 333-360.
 14. Schotte U., Truyen U., Neubauer H. (2004) Significance of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors - A Review. J. Vet. Med., 51: 423-426.
 15. Thiede S., Goethe R., Amtsberg G. (2001) Prevalence of β 2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs. Vet. Rec., 149: 273-274.
 16. Uzal F.A., Songer J.G. (2008) Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J. Vet. Diagn. Invest., 20: 253-265.
 17. Uzal F.A., Fisher D.J., Saputo J., Sayeed S., McClane B.A., Songer G., Trinh H.T., Fernandez Miyakawa M.E., Gard S. (2008) Ulcerative enterocolitis in two goats associated with enterotoxin- and beta2 toxin-positive *Clostridium perfringens* type D. J. Vet. Diagn. Invest., 20: 668-672.

PREDICTING LIVEWEIGHT FROM BODY MEASURES IN NERO DI PARMA PIGS

STIMA DEL PESO VIVO DALLE MISURE BIOMETRICHE NEL SUINO NERO DI PARMA

BERETTI Valentino¹, SUPERCHI Paola¹, MANINI Raffaele², CERVI Claudio²,
SABBIONI Alberto¹

Structured summary

Objectives. To define accurate and easy-to-use equations for the prediction of body weight from body measures in “Nero di Parma” pig.

Methods. 1178 pigs between 1 and 1585 d of age (606 females, 32 males and 540 castrated males), group reared in 18 herds and fed commercial standard diets given ad libitum and integrated with pasture in the brushwood, were weighted and the hearth girth (HG) was measured by a tape measure; on 190 pigs out of them the height at withers (HW) and at rump (HR), the length of the body (LB), the fore-rear width of the thigh (WT) and the width of the rump (WR) were also recorded. Data were submitted to stepwise regression analysis, by introducing the independent variables (body measures and age) in the linear, quadratic and cubic form. The ability of the models to fit the raw data was evaluated by means of R² and SE of the dependent variable. Equations for live weight (LW) estimation were calculated for all animals and for each sex-grouped subset, by submitting to analysis all body measures and age (n=190) or by using HG (n=1178) only.

Results. For all animals the following equations are proposed:

$LW = 9.035 + 0.006696 * HG^2 - 0.454 * HR + 0.000120884 * HR^3 + 0.00159 * LB^2 - 0.172 * HW$; SE = 2.39 kg; R² = 0.995; P<0.001.

$LW = 3.367 - 0.339 * HG + 0.01098 * HG^2$; SE = 1.83 kg; R² = 0.988; P<0.001.

Both equations showed high R² values and low SE of the dependent variable. The actual and the estimated weights, obtained by applying the two equations resulted highly correlated (0.997 and 0.994, respectively). The equations proposed for each sex resulted sometimes more precise and accurate than those calculated for all animals. In conclusion, the proposed equations allow, from a practical point of view, a better management of pigs. The equations calculated starting from HG are slightly less accurate (lower values of R²) but more reliable (lower values of SE of the dependent variable) than those calculated from all body measures, and they are much more easy to apply to field conditions.

Key words: pig, “Nero di Parma”, live weight, biometric measures, prediction.

¹ Department of Animal Production, Veterinary Biotechnology, Food Quality and Safety – Faculty of Veterinary Medicine - University of Parma Via del Taglio, 10 43126 Parma – Italy. Corresponding Author: valentino.beretti1@unipr.it

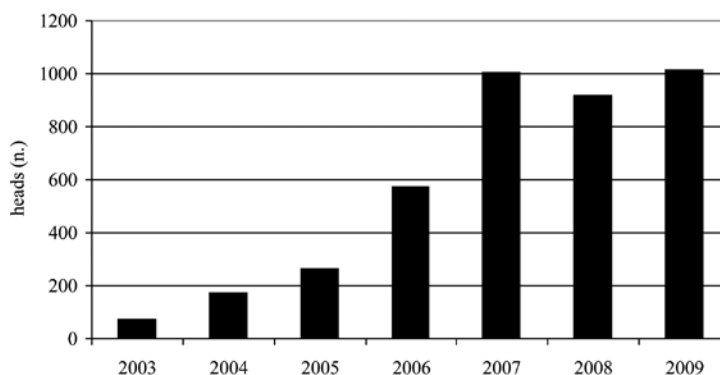
² Associazione Provinciale Allevatori, Parma - Italy

INTRODUCTION

Swine rearing in Parma province is a strongly embedded activity; the first documented news about it date at the XV century (AA.VV 1881). The breeding of black coated pigs in Parma province probably dates at the second half of XVIII century, when the Borbone family governed in Parma and imported in the area some Iberic pigs. The local breed, named Nera Parmigiana, was bred in purity until the half of the XIX century, when it began to reduce its number because crossed with other pig breeds (especially Large White, Berkshire, Middle White, Large Black and Tamworth), to join the robustness and the good meat quality of the autochthonous breed to the daily gain of the improved breeds; the crosses took place above all in the plain part of the province, as in the mountain territory the substitution of the breed with more productive pigs took place slower (Bonadonna 1946; Guardasoni 1954); more recently the reduction of the number of purebred Nera Parmigiana pigs became dramatic and the breed was considered as extinct. During last years '90s a preservation programme was planned, thanks to the contribution of several local Institutions, with the aim to develop and enhance the genetic type in the area of origin. This programme took into account the selection of boars and sows within the local crossbred population, spread in the mountain area of the province of Parma, directly derived from, and genetically connected to, Nera Parmigiana breed; the so obtained founder black coated population, named Nero di Parma pig, was then collected and raised in some herds under the supervision of the local Breeders Association and of the University of Parma (Sabbioni 2009b). During 2006 Nero di Parma genetic type was approved by the Ministry of Agriculture (D.M. no. 20196, 24/1/2006). Since year 2003, a total of 1766 females and 99 males have been registered by the local Breeders Association as hybrid breeding pigs approved by ANAS (National Swine Breeders Association).

The number of farms that raise this genetic type developed quickly in the last years in Northern Italy (actually they are about 50, 38 of them in Parma province) and the number of registered animals is stated at about 1000 per year (Figure 1).

Figure 1 – Demographic parameters of Nero di Parma pig population



The great part of Nero di Parma herds are outdoor and of little dimension. This kind of herds are quickly spreading in Italy and in Europe, because they are able to increase the value of hill and mountain lands, they have low structural costs, and they meet people feeling toward animal wellness. They contribute also to maintain the genetic variability, because of the high reproductive male number they allow to keep, and the consequent higher effective population number (Beretti 2009).

Recent researches (Sabbioni 2007) have shown that those herd often lack management and highlight low productive and reproductive efficiency. To the aim of a correct herd management it is important that the pig breeder knows the correct weight of the animals in the different phases of the cycle (Delate and Babu 1990), to allow the evaluation of the feeding scheme, to determine the correct dose of supplements and to establish the moment of slaughtering.

In most cases the herds do not possess the equipment to weight animals, in particular in outdoor systems. Moreover in these conditions weighing pigs could be dangerous for operators and stressful for animals. As a consequence pig breeders actually point to a visual estimate of the weight or to the use of equations studied for different breeds. A body measure can be taken more easily, directly on animals or with the aim of image analysis (Brandl and Jorgensen 1996).

The aim of the research was to define accurate and easy-to-use equations for the prediction of body weight from body measures in “Nero di Parma” pig, and to compare the results with other equations found in literature for different genetic types.

MATERIALS AND METHODS

The trial was carried out on the weight of 1178 Nero di Parma pigs between 1 and 1585 d of age (606 females, 32 males and 540 castrated males), group reared in 18 herds and fed commercial standard diets given *ad libitum* and integrated, in the outdoor system, with pasture in the brushwood. During weighing, the hearth girth (HG) was also measured on all the animals, while on 190 pigs (115 females, 12 males, 63 castrated males) the height at withers (HW) and at rump (HR), the length of the body (LB), the fore-rear width of the thigh (WT) and the width of the rump (WR) were also recorded.

Pigs were weighted by a mobile system moved in the different farms (0.1 kg threshold). Body measures were taken by a tape measure (1 cm threshold), as HW and HR were taken by a Lydtin stick (Magliano 1950), in the following way (see also Figure 2):

HG (hearth girth): found behind the rear edge of the shoulders at the point of least perimeter;

HW (height at withers): from the top of the withers to the ground;

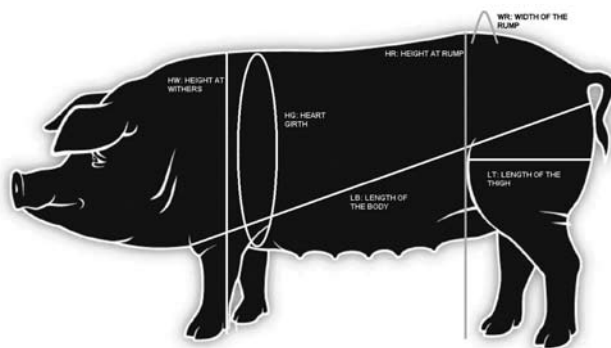
HR (height at rump): from the highest point of the sacrum to the ground;

LB (length of the body): also known as the length of the trunk and found from the tip of the shoulder to that of the buttock;

WT (width of the thigh): represents the rear-front length of the thigh and it is measured from the femoral-tibial-patellar articulation to the posterior edge of the thigh;

WR (width of the rump): we considered the bis-iliac breadth taken between the two iliac tuberosity.

Figure 2: Body measures on Nero di Parma pig



Data were submitted to multiple regression analysis. The choice of the independent variables was obtained by the stepwise procedure (SAS, 2003), by introducing body measures and age in the linear, quadratic and cubic form. The ability of the models to fit row data was evaluated by means of the R^2 and SE of the dependent variable. Two series of equations for live weight (LW) prediction from body measures were obtained: the first one (equations 1-4, Table 3) was obtained by introducing all measures and age ($n=190$) as the second one (equations 5-8, Table 4) by introducing only HG ($n=1178$). Correlation analysis was performed between actual weights and those estimated from equations proposed in the present study and those found in literature.

RESULTS

Table 1 shows the main descriptive statistics of the parameters taken into account.

Table 1 – Descriptive statistics for live weight, age and body measures of the complete dataset and of each sex class.

			n	Mean	±	SD	Minimum	Maximum
Live weight	kg	All	1178	33.68	±	61.44	1.25	381
		Females	606	32.81	±	61.11	1.25	381
		Males	32	18.80	±	25.88	2.20	150
		Castrated males	540	35.40	±	63.06	1.30	266
Age	d	All	1178	105.81	±	180.59	1	1585
		Females	606	105.68	±	191.82	1	1585
		Males	32	56.15	±	61.25	2	330
		Castrated males	540	108.63	±	172.08	1	891
Height at withers	cm	All	190	35.41	±	11.88	14	76
		Females	115	36.79	±	12.57	17	76

		Males	12	35.62	±	8.99	23	49
		Castrated males	63	32.84	±	10.77	14	67
Height at rump	cm	All	190	39.35	±	13.73	18	82
		Females	115	40.93	±	14.20	21	82
		Males	12	40.31	±	10.17	27	55
		Castrated males	63	36.38	±	13.17	18	80
Hearth girth	cm	All	1178	44.65	±	15.85	21	141
		Females	606	45.84	±	17.34	22	141
		Males	32	47.75	±	13.37	26	73
		Castrated males	540	43.10	±	14.00	21	134
Body length	cm	All	190	49.02	±	16.79	23	108
		Females	115	50.14	±	16.90	24	108
		Males	12	52.31	±	13.26	34	75
		Castrated males	63	46.36	±	17.11	23	100
Width of the tight	cm	All	190	14.35	±	5.91	5	38
		Females	115	14.69	±	6.05	6	38
		Males	12	15.21	±	3.97	10	20
		Castrated males	63	13.58	±	5.98	5	35
Width of the rump	cm	All	190	12.98	±	5.56	4	34
		Females	115	13.46	±	5.82	5	34
		Males	12	14.57	±	3.69	10	21
		Castrated males	63	11.82	±	5.25	4	28

The measurements were taken on animals from birth to maturity of somatic development, especially for females and castrated males. In the case of adult males, however, the surveys were completed at the age of 11 months and a weight of 150 kg, at about 70% of the mature body weight (Sabbioni *et al* 2009a; Sabbioni *et al* 2009b).

All linear measures and age were highly correlated with live weight, both in the sample of all animals and within the categories of sex ($P < 0.01$) (Table 2).

Table 2 – Simple correlations between live weight, age and body measures in the complete dataset and of each sex class (number of observations within brackets).

	All	Females	Males	Castrated males
Age	0.952 (1178)	0.949 (606)	0.961 (32)	0.960 (540)
Height at withers	0.901 (190)	0.917 (115)	0.931 (12)	0.877 (63)
Height at rump	0.905 (190)	0.913 (115)	0.970 (12)	0.908 (63)
Hearth girth	0.924 (1178)	0.926 (606)	0.973 (32)	0.923 (540)
Body length	0.870 (190)	0.879 (115)	0.960 (12)	0.882 (63)
Width of the tight	0.895 (190)	0.905 (115)	0.932 (12)	0.896 (63)
Width of the rump	0.895 (190)	0.917 (115)	0.936 (12)	0.876 (63)

All correlations resulted significant ($P < 0.01$).

The equations proposed in Table 3 were obtained by including all body

measures and age in linear, quadratic and cubic form as independent variables, and applying the stepwise regression procedure. Some measurements, despite high values of simple correlation, have been rejected from the analysis in the linear (LB, WT, WR), quadratic (age, HW, WT, WR) or cubic form (LB, WT, WR) in all equations.

The predictive ability of the calculated equations was very high, considering the high values of R^2 (from 0.989 for males to 0.996 for castrated males) and low standard error values of the dependent variable (from 1.32 kg for males to 2.54 kg for females).

Table 3 – Prediction equations of LW from body measures and age in linear, quadratic and cubic form in the complete dataset and of each sex class.

	Equation 1	Equation 2	Equation 3	Equation 4
	All	Females	Males	Castrated males
n.	190	115	12	63
Intercept	9.035	13.354	1.411	-0.715
HG	-	-0.670	-	-
HG ²	0.006696	0.010763	-	0.006041
HG ³	-	-	0.000156694	-
HR	-0.454	-	-	-
HR ²	-	-	-	-0.009735
HR ³	0.000120884	0.000058132	-	0.000247433
LB ²	0.001590	0.001665	-	0.002439
HW	-0.172	-	-	-
HW ³	-	-	-	-0.000130522
Age	-	-	-0.209	-
Age ³	-	-0.000000144	-	-
R ²	0.995	0.995	0.989	0.996
SE	2.39	2.54	1.32	1.63
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Given some difficulties to take all body measures from animals in field conditions, we considered it useful to calculate another set of equations, taking into account only the HG, that is considered as strongly correlated with weight (Grosbeck *et al* 2002). Also in our study, the HG (Table 2) was the body measure most associated with weight, as well as a measure easily detectable in animals. The equations thus obtained (Table 4) were characterized by a slightly less accuracy than the previous (R^2 ranging between 0.984 for castrated males and 0.991 for females), while residual variability (not related to the regression) was reduced (SE of the dependent variable varying between 1.34 in males and 1.91 in females). It should however be borne in mind that the equations of Table 4 were drawn from a dataset considerably wider than those of Table 3.

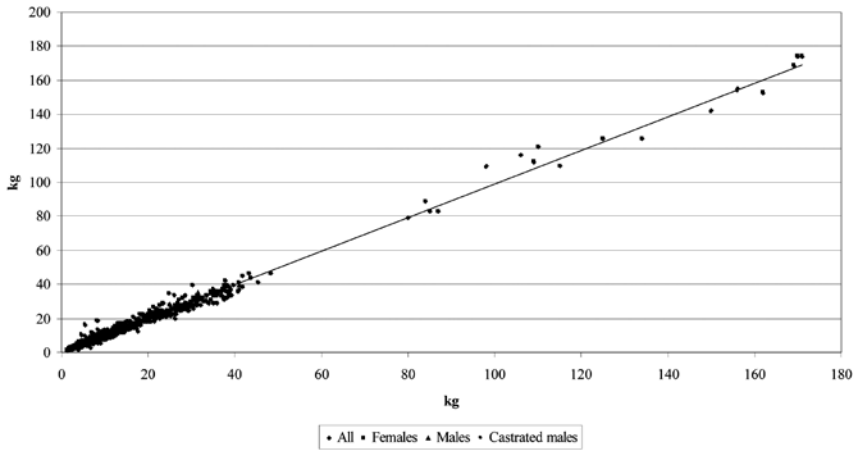
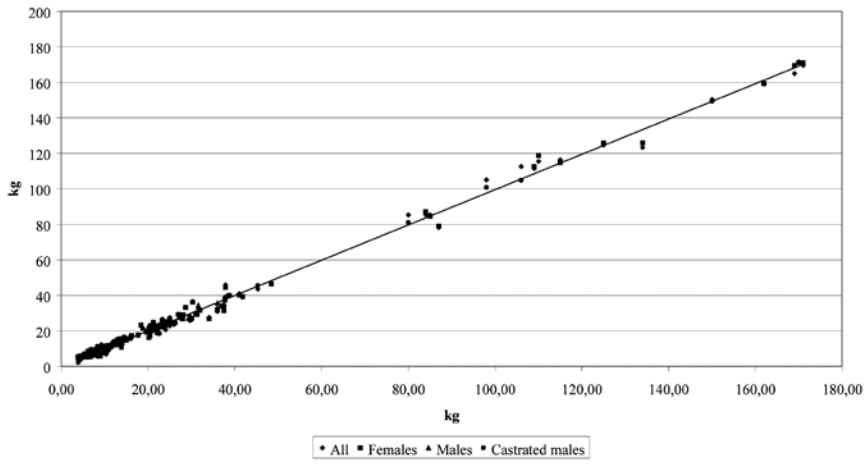
Figures 3 and 4 (see also Table 5) show that the data obtained by applying the equations proposed, both in the case they are applied to all animals and broken down by sex, are strongly correlated to the real ones; in addition, this correlation remains high in whole range of weight.

Table 4 – Prediction equations of LW from hearth girth in linear, quadratic and cubic form in the complete dataset and of each sex class.

	Equation 5	Equation 6	Equation 7	Equation 8
	All	Females	Males	Castrated males
n.	1178	606	32	540
Intercept	3.367	3.618	0.678	2.880
HG	-0.339	-0.351	-	-0.315
HG ²	0.010980	0.011084	-	0.010749
HG ³	-	-	0.000100169	-
R ²	0.988	0.991	0.986	0.984
SE	1.83	1.91	1.34	1.75
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Table 5 – Regression equations of estimated (y) on actual (x) LW.

	Equations from all body measures	Equations from HG only
All	$y = 0,9948x + 0,1345$ $R^2 = 0,9948$	$y = 0,9885x + 0,1498$ $R^2 = 0,9885$
Females	$y = 0,9957x + 0,1409$ $R^2 = 0,9954$	$y = 0,9906x + 0,1394$ $R^2 = 0,9905$
Males	$y = 0,9923x + 0,1767$ $R^2 = 0,9912$	$y = 0,9864x + 0,1935$ $R^2 = 0,9864$
Castrated males	$y = 0,9963x + 0,0724$ $R^2 = 0,9963$	$y = 0,9843x + 0,196$ $R^2 = 0,9839$



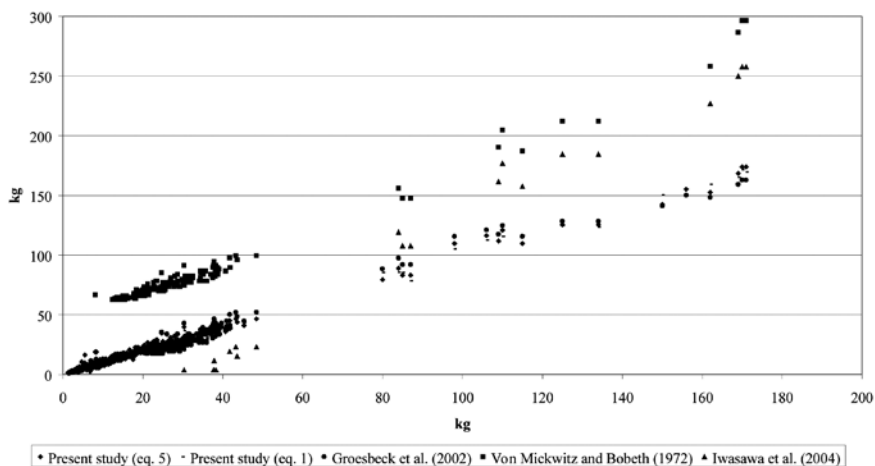
DISCUSSION

Equations for estimating live weight from the somatic measures have been previously proposed by several authors in cattle (Branton and Salisbury 1946) and in different pig breeds (Von Mickwitz and Bobeth 1972; Delate and Babu 1990; Brandl and Jorgensen 1996; Brongniart *et al* 1998; Groesbeck *et al* 2002; Iwasawa *et al* 2004; Oke *et al* 2006; O'Connell *et al* 2007; Beretti *et al* 2009). The correlation coefficients between actual values and those estimated with the equations proposed by us or found in the literature were high (Table 6) and highly significant ($P < 0.01$).

Table 6 – Simple correlations between actual LW and those estimated with the proposed equations and some equations from literature.

	Actual weight
Present study (equation 1)	0.997
Present study (equation 5)	0.994
Iwasawa <i>et al.</i> (2004)	0.993
Von Mickwitz and Bobeth (1972)	0.991
Groesbeck <i>et al.</i> (2002)	0.986

Figure 5 presents the evolution of the relationship between the estimates obtained with equations proposed by us and those obtained from some of the cited authors.



The values calculated with the equations proposed by Von Minkwitz and Bobeth (1972) and Iwasawa *et al* (2004) applied to Nero di Parma pigs, generally shows a strong overestimation, while those obtained by applying the equation of Groesbeck *et al* (2002) were more adherent to real values. This is likely to be related to the different fatness of the breeds used in the studies, which determines the need to apply in practice equations directly studied for each genetic type.

These outcomes indicate that the proposed equations are a valid additional tool for pig farmers, that could be useful in their short-term decisions regarding

management and could be included in Nero di Parma pig farm weight control programs. Because the availability of a balance is often impossible, if not with a sharp cost increases, especially in outdoor rearing conditions, the management of the animals could benefit from the use of the equations proposed. However, it is essential to use equations designed specifically for each genetic type and for each sex, to avoid incorrect estimates. The equations calculated from the chest circumference were only slightly less accurate (lower values of R^2) but more reliable (lower values of SE of the dependent variable) than those calculated from all available measures; moreover they are also found easier to apply to field conditions.

Acknowledgements

The research was conducted with funding from the Region Emilia Romagna and the Province of Parma.

REFERENCES

1. A.A.V.V. (1881): *L'ambiente rurale Valtarese alla fine dell'Ottocento*. Associazione Ricerche Storiche Valtaresi "A. Emmanuelli", Borgotaro, Italy.
2. Beretti V. (2009): Allevamento all'aperto no all'improvvisazione. *Rivista di Suinicoltura* 9, 62-65.
3. Beretti V., Superchi P., Manini R., Cervi C., Sabbioni A. (2009): Liveweight estimation from body measures in "Nero di Parma" pigs. *Italian Journal of Animal Science* 8(suppl.2), 565 (abstr.).
4. Bonadonna T. (1946): *Zootecnica Speciale*. Istituto Editoriale Cisalpino, Varese, Italy.
5. Brandl N., Jorgensen E. (1996): Determination of live weight of pigs from dimensions measured using image analysis. *Computers and Electronics in Agriculture* 15, 57-72.
6. Branton C., Salisbury G.W. (1946): The estimation of the weight of bulls from hearth girth measurements. *J.Dairy Sci.* 29(3):141-143.
7. Brongniart I., Guyonvarch A., Maguer R., Kersalè P. (1998): Détermination d'équations baryométriques sur des truies in gestation, a l'entrée et a la sortie de maternité. *Journees Rech. Porcine en France* 30, 195-199.
8. Delate J.J., Babu R. (1990): Détermination d'équations baryométriques sur des porcs rustiques en milieu tropical. *Journees Rech. Porcine en France* 22, 35-42.
9. Groesbeck C.N., Goodband R.D., DeRouchey J.M., Tokach M.D., Dritz S.S., Nelsen J.L., Lawrence K. R., Young M.G. (2002): Using heart girth to determine weight in finishing pigs. Swine day Proceedings Kansas State University, pp 166-168.
10. Guardasoni M. (1954): *Appunti di Zootecnica Speciale*. Casanova Editore, Parma, Italy.
11. Iwasawa T., Young M.G., Keegan T.P., Tokach M.D., Dritz S.S., Goodband R.D., DeRouchey J.M., Nelssen J.L. (2004): Comparison of hearth girth or flank-to-flank measurements for predicting sow weight. Swine day Proceedings Kansas State University, pp 17-22.
12. Magliano A. (1950): *Ezoognosia Generale*. Ed. Vallardi, Milano

13. O'Connell M.K., Lynch P.B., Bertholot S., Verlait F., Lawlor P.G. (2007): Measuring changes in physical size and predicting weight of sows during gestation. *Animal* 1, 1335-1343.
14. Oke U.K., Ibe S.N., Ologbose F.I., Amaefula K.U. (2006): Effect of breed of sire on growth performance of exotic crossbred pigs in a humid tropical environment. *J. of Animal and Veterinary Advances* 5(9), 744-748.
15. Sabbioni A., Beretti V., Manini R., Cervi C., Superchi P. (2009a): Application of different growth models to "Nero di Parma" pigs. *Italian Journal of Animal Science* 8(suppl.2), 537-539.
16. Sabbioni A., Beretti V., Manini R., Cervi C., Superchi P. (2009b): Effect of sex and season of birth on Gompertz growth curve parameters in "Nero di Parma" pigs. *Italian Journal of Animal Science* 8, 719-726.
17. Sabbioni A., Beretti V., Zanon A., Superchi P., Manini R., Cervi C. (2007): Reproductive parameters of "Nero di Parma" sows reared outdoor and indoor. *Italian Journal of Animal Science* 6(suppl.1), 712.
18. SAS (2003): *SAS/Stat User's Guide*, ver. 9.03. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
19. Von Mickwitz G., Bobeth K. (1972): Estimation of bodyweight from body measurements in pigs. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 79, 241-244.

NATURAL WHEYSTARTER IN THE PARMIGIANO-REGGIANO CHEESE PRODUCTION, WITH PARTICULAR REFERENCE TO THE ACIDIFICATION OF THE WHEEL IN THE EARLY HOURS AFTER THE EXTRACTION FROM THE VAT: AN OVERVIEW

IL SIEROINNESTO NELLA PRODUZIONE DEL FORMAGGIO PARMIGIANO-REGGIANO, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALLA ACIDIFICAZIONE DELLA FORMA NELLE PRIME ORE DOPO L'ESTRAZIONE DALLA CALDAIA: STATO DELL'ARTE

FORMAGGIONI Paolo ¹, VECCHIA Paola ², SUMMER Andrea ¹, FRANCESCHI Piero ¹, MALACARNE Massimo ¹, MARIANI Primo ¹

Summary

The technology of many Italian and foreign DOP cheeses, provide, before the coagulation, to add to the milk selected “starter cultures”, known as wheystarter. The wheystarter is constituted by a lactic flora perpetuated day after day, fermenting the cooked whey of the previous day cheesemaking. The characteristic of productions that use the natural wheystarter, especially Parmigiano-Reggiano and Grana Padano cheeses, is represented by this uninterrupted “microbiological link” that, through the whey, comes from the cheesemaking of the previous day and move to the next day. These natural cultures play a fundamental role in the natural acidification process which must lead to complete degradation of lactose in the first hours of life of the cheese. The organoleptic characteristics of long ripening cheeses, especially those made from raw milk, depend not only on the processing technology and properties of milk, but also largely on the type of wheystarter, because the lactic acid bacteria contribute to the complex biochemical phenomena that occur during ripening.

Some emerging problems in the production of Parmigiano-Reggiano cheese, regarding the scarce fermentation activity manifested by wheystarters, lead to consider the following topics: 1) Birth and evolution of bacterial microflora from the origin to the present days; 2) Early studies on the wheystarter microflora for Parmigiano-Reggiano cheesemaking and on the trends of pH, titratable acidity and microbial count during the maturation of wheystarters; 3) Bacterial strains present in wheystarter; 4) Wheystarter and typicality; 5) Importance and functions of the wheystarter; 6) Kinetics of the degradation of lactose; 7) Effect of wheystarters with low or high acidity; 8) Diversity of production of wheystarters; 9) Considerations on the “precious” wheystarters; 10) Problems arising in Parmigiano-Reggiano cheese

¹ Section of Dairy Science and Technology. Department of Animal Production, Veterinary Biotechnology, Food Quality and Safety, University of Parma, 10 Via del Taglio, 43126 Parma, Italy.

² Animal Production Research Center, Reggio Emilia (RE), Italy

production; 11) High titratable acidity and low bacterial count (some hypotheses to explain); 12) Paucimicrobial milks (milks with low bacterial count).

Keywords:

Natural wheystarter, acidification of the wheel, lactic acid bacteria, Parmigiano-Reggiano cheese.

INTRODUCTION

The technology of many Italian and foreign DOP cheeses, provide, before the coagulation, to add to the milk selected “starter cultures”, known as wheystarter. The wheystarter is constituted by a lactic flora perpetuated day after day, fermenting the cooked whey of the previous day cheesemaking [1]. The characteristic of productions that use the natural wheystarter, especially Parmigiano-Reggiano and Grana Padano cheeses, is represented by this uninterrupted “microbiological link” that, through the whey, comes from the cheesemaking of the previous day and move to the next day [2, 3]. These natural cultures play a fundamental role in the natural acidification process which must lead to complete degradation of lactose in the first hours of life of the cheese [4]. The organoleptic characteristics of long ripening cheeses, especially those made from raw milk, depend not only on the processing technology and properties of milk, but also largely on the type of wheystarter, due to the fact that lactic acid bacteria contribute to the complex biochemical phenomena that occur during ripening [5, 6].

WHEYSTARTER FOR PARMIGIANO-REGGIANO CHEESE

Birth and evolution of bacterial microflora from the origin to the present days

The wheystarter was introduced in the production of Parmigiano-Reggiano, for the first time, in 1890, in Reggio Emilia province, by Notari, in order to reduce the incidence of discarded and undervaluated cheese, mainly due to late blowing (*ital.: gonfiore tardivo*) [7, 8]. Over the years, profound changes occur to the natural culture of wheystarter from a microbiological point of view: from a less acid culture (13-15 °SH/50 mL), consisting of a mesophilic microflora of cocci and lactobacilli, wheystarter is passed to a progressively more acidic culture (20-30 ° SH/50 mL), consisting of thermophilic microflora, in which lactobacilli predominate [3, 9-11]. The selection of this lactic flora, characterised by high thermophilic properties, was determined by some changes in the cheesemaking technology: use of high curd cooking temperatures, acceleration of times during the processing of milk in vats, increasing of the temperature of cheese mass, increased incubation temperature of wheystarter itself, progressive increase in the size of cheese wheels (in the round side (*ital.: scalzo*), in particular), prolonged time of storage of cheese mass under the whey [1, 3, 12, 13]. This phenomenon was already reported in 1961 by Druscovich [14], that noted the near-disappearance of cocci (especially *Streptococcus thermophilus*) from wheystarter, due to environmental conditions that had become too acidic for the growing of these micro-organisms.

Early studies on the wheystarter microflora for Parmigiano-Reggiano cheese and on the trends of pH, titratable acidity and microbial count during the maturation of wheystarters

Early studies on the wheystarter microflora for Parmigiano-Reggiano cheese were performed by Fascetti [15] and Bottazzi [7] which highlighted the species and the number of lactobacilli for each species. Later, Sacchetti and Zambonelli [16] have for the first time revealed the curves of changes over time of the main parameters characterising wheystarter: they have monitored microbial count (both by direct counting with microscope both by plate growth), temperature, pH and titratable acidity from end processing cooked whey to wheystarter when it is added to milk, and beyond. The authors noted that the microbiological conditions of wheystarter are optima at 3 o'clock of the day at which the wheystarter must be used, and even after 3 or 6 hours only minor changes occur. Titratable acidity increases from the initial 3-4 °SH/50mL (cooked whey: time zero) to reach values of 28-32 °SH/50mL at 6 o'clock of the next day and increases again, but less markedly, up to 9 hours, reaching values of 31-34 ° SH/50mL; the limit of 41-42 ° SH/50mL is reached only after several hours. The pH, from a value of 5-6 in the cooked whey, decreases to 3.3 in wheystarter and then remains almost constant. Regarding the total microbial count determined by direct counting (dead bacteria + live bacteria), after a moderate increase, from the initial 10-20 million per mL, a rapid increase is observed until 3 o'clock of the next day, where the value is around 1500-2000 million per mL, and then a slow decrease; a similar trend was determined for the microbial growth on plates, to determine only the living cells, which exhibits a maximum at 3 o'clock of the next day (1000-1500 million mL) and then tends to decrease. The authors conclude that the calculation of the amount of wheystarter to add to the milk can not be based only on both titratable acidity of wheystarter and milk; this practice can lead to significant errors in the evaluation because the titratable acidity of wheystarter is not always correlated in the same way with the microbial count actually present. The assessment of cheesemakers, in the absence of other analytical determinations, should be based primarily on an examination of visual and sensory characteristics of wheystarter (color, smell, taste, turbidity), which in the study by Sacchetti and Zambonelli [16] have proved to be more correlated with the actual quality of the wheystarter themselves.

Other studies [17-20] were devoted to further characterise the microflora of wheystarter for Parmigiano-Reggiano cheese, highlighting the most representative species and also determining the bacterial species other than lactic acid bacteria and yeast that may occasionally be present.

Bacterial strains present in wheystarter

At present, the wheystarter for Parmigiano-Reggiano cheese is a culture formed by thermophilic lactic acid bacteria of species *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and heterofermentative lactic acid bacteria of species *Lactobacillus fermentum* [9, 21]. The ability to the acidification is different among bacterial species: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* appears to adapt better to the conditions of temperature

gradient compared with *Lactobacillus helveticus* [22]. Bottazzi et al. [9] also detected the presence of *Streptococcus thermophilus*, and Nanni et al. [5], in a paper on the lactic microflora of the cheese, show the presence, in a number of whey starter for Parmigiano-Reggiano cheese, of *Lactobacillus ramnosus*, an heterofermentative, mesophilic bacterium. The percentages among the different species of lactic bacteria vary from whey starter to whey starter; the composition of bacteria and lactic acid bacteria strains of different whey starter used to produce Parmigiano-Reggiano revealed a high heterogeneity, which is specific to the individual production units [11, 21], and, as evidenced in a recent study [10] strains isolated from Parmigiano Reggiano whey starter are different from those isolated from whey starters used for the production of Grana Padano cheese.

Whey starter and typicality

From this point of view we can rightly speak of “typicality” of the whey starter. Mucchetti et al. [3] point out, in fact, that the microflora, particularly that of the whey starter, is an important element of the PDO (Protected Designation of Origin), especially for cheeses like Parmigiano-Reggiano and Grana Padano, in which “natural” bacterial cultures are used; if the autochthonous bacterial cultures are respected, this is one of the main forms of relationship with the territory [2, 3]. Bottazzi et al. [23], in this respect, point out that the lactic acid bacteria must not be considered as a link with the environment or territory, but rather representative of a particular cycle or technological process of production, because they are not present in the environment where cheese is made, but are the result of years of natural selection, resulting in a daily use of these bacteria, which led to the creation of specific strains for a particular type of cheese production [1]. What interests to emphasise, however, is the “intimate relationship” between technology and microflora characteristic of a product; milk, curd and cheese are therefore characterised by specific microbial populations, within which are included some bacteria which better than others are adapted to process conditions and, to different extent, according to the characteristics of different species and biotypes, will defend the specific biochemical transformations that characterise each product [6].

Importance and functions of the whey starter

In general, the main functions that the whey starter plays in the production of Parmigiano-Reggiano cheese are the following: 1) directly modulate the acidity of milk to lead it to a pH more suitable for the activity of rennet chymosin; 2) to supply a high number of thermophilic lactic acid bacteria so that the lactic microflora is dominant and able to activate in the cheese mass, already in the early hours, an intense lactic fermentation with an anti-bloating (*ital.: anti-gonfiore*) function and 3) constitute an important source of enzymes useful for the complex biochemical processes of ripening, through autolysis of bacterial cells, enzymes that will give to the cheese its unique structural properties and organoleptic characteristics. This latter point regards mainly the importance that the lactic microflora of whey starter plays in the maturation (proteolysis and lipolysis) of Parmigiano-Reggiano cheese; this is an aspect that is beyond the scope of this paper; to deep this subject, it is possible

to refer to the studies of Addeo et al. [24], Nanni et al. [5] and Coppola et al. [25]. In these papers is evidenced that the thermophilic flora derived from wheystarter dominates in the first period of maturation, but that subsequently takes the upper hand the mesophilic flora resulting from raw milk, which is formed mainly by streptococci (*Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplanarum*) and *Pediococcus acidilactici* [26].

Kinetics of the degradation of lactose

In evaluating the characteristics of the wheystarter is particularly important the kinetics of degradation of lactose. For a good quality of Parmigiano-Reggiano cheese is necessary that the carbohydrates are metabolised very quickly. This depends on several factors: the activity and the type of starter culture, as not all lactic acid bacteria can produce lactic acid from galactose [5, 12, 27-29], the cooking temperature, the chemical and physical properties of the paste and the size and method of cheese moulding [12, 30]. In the Parmigiano-Reggiano cheese, glycolysis has particular characteristics with respect to other cheeses for the high temperature to which the curd is subject and the large size of the wheels. Cooking at 54-56 °C favours the selection of thermophilic lactic flora of wheystarter, but at the same time is also a limiting factor for its growing; moreover, the weight and the shape of the wheel, also, prevent, especially in the inner part, a rapid lowering of the temperature. These conditions determine the insurgence of a temperature gradient between outside and inside of the wheel, which remains for several hours after the cheesemaking [22, 31-35].

The temperature trend in the cheese mass and the modality of growing of lactic acid bacteria can affect the evolution of the acidification of the paste. The thermophilic lactic activity begins at 50-52°C and finds its optimal temperature at 43-47 °C. These conditions are accomplished in only 3-4 hours at the peripheral portion of the wheel and in 14-15 hours at the inner part of the wheel. The pH decreases quickly outside to reach the minimum (4.98) at 6 hours after the extraction from the vat. In the heart of the wheel, the lowering of pH is slow in the first 10 hours, and thereafter decreases sharply and reaches after 24 hours the same minimum values found outside after 6 hours. Subsequently, the pH slowly increases and after 48 hours, the cheese has a pH value around 5.20 in all parts of the wheel [35].

Giraffa et al. [36] observed that different species of lactobacilli have a different distribution in the wheel during the first 48 hours, due to the thermal gradient that is established between the inner and outer: *Lactobacillus helveticus* predominates in the outer zones, while *Lactobacillus delbrueckii* and the heterofermentative species show a more homogeneous distribution.

Effect of wheystarters less acid and of wheystarters very acid

From the above, it is clear the importance of the fermentation activity of lactic acid bacteria in wheystarter in the first hours following the cheesemaking process. Even in the presence of a high enough temperature (about 54°C at the inner part of the wheel, after 6 hours from cheese moulding), the fermenting activity must lower the pH such to prevent the development of any early fermentation by technologically undesirable bacteria, such as those caused by *Clostridium butyricum* and/or

Clostridium sporogenes [13]. These abnormal fermentation, in fact, may develop due to not uniform and slow acidification in the middle of the wheel, just after cheese moulding; when the temperature of the paste in the inner part of the wheel remains too high, the presence of residual fermentable sugars and, consequently, the insufficient lowering of pH, are suitable to the development of technologically undesirable microflora, leading to the formation of large spongy and stretched holes in the cheese by gas of fermentation (*ital.: grosse cavità spugnose e stirate da gas di fermentazione*) [35].

Conversely, a high initial acidification, resulting in excessive demineralisation, may be a source of de-structuring of the paste with the manifestation of “cracks” and “openings” (*ital.: “fessurazioni” e “spacchi”*).

Diversity in the production of wheystarters

The presence in the cheese factories of different types of containers used for the incubation of the end cheesemaking cooked whey - cans, demijohns in glass or in steel, coibented fermenting vat with or without temperature control (*ital.: bidoni, damigiane in vetro o in acciaio, fermentiere coibentate senza o con controllo della temperatura*) - and of differing techniques in their management, contributes to make the typical microflora of wheystarter inhomogeneous [13, 26, 28]. The difference in time management and in the way of incubation of cooked whey, in fact, can affect the number, the vitality and the type of association of thermophilic lactic acid bacteria [35]. Moreover, the production of Parmigiano-Reggiano cheese occurs frequently in small craft structures in which cheesemakers make their choices often guided by criteria of convenience and deep-seated beliefs and convictions related to tradition, but not always supported by a sufficient scientific knowledge.

Bottazzi et al. [28] highlight what are the major differences in the technology of preparation of wheystarter: the volume of cooked whey placed in fermentation (from 50-80 litres up to a maximum of 10,000 litres, depending on the size of the cheese factory); temperature maintained during the fermentation or a natural fermentation temperature gradient or fermentation at constant temperature (42-48°C for 12 hours) followed by a decrease to about 20°C; duration of fermentation and storage time of the wheystarter before its employment. All these methods of preparation have a strong influence on the microbial composition of wheystarters and on the selection of biotypes.

Also the various settings of the cheesemaking process, adopted by the individual cheese factories, may cause important deviations of the glycolytic process. In fact, some variables such as different wheystarter dosage, different associations of bacteria, different temperatures of curd cooking and the different temperatures in the environments in which the wheels are handled, are able to influence the cooling-off curve of the paste and, consequently, the growing of lactic flora, the lactic acid production and the pH lowering of the paste [12, 35].

It was also highlighted a significant variability of the characteristics of wheystarter in relation to seasonal and environmental factors. Tosi et al. [13] showed that the warmest months are critical as regards the possibility of obtaining a wheystarter with good characteristics for what concerns acidity, fermentation activity

and content of thermophilic lactic acid bacteria.

Some considerations on the “precious” whey starters

Dieci et al. [37] conducted an interesting research on whey starter. Whey starters with characteristics particularly valuable in terms of acidity and content of lactic acid bacteria were selected, and were carried out two parallel cheesemakings with normal milk, one using the whey starter of the same cheese factory, the other using a whey starter “precious” from another cheese factory. The results were the opposite of what was expected: the cheeses made with “precious” whey starter were consistently of lower quality (sometimes even with the presence of serious defects) than those produced with “indigenous” whey starter. The authors concluded that each whey starter can find good conditions for growing only in the environmental and cheesemaking conditions where it was naturally selected.

Problems arising in the Parmigiano-Reggiano cheese

Increasingly, in the Parmigiano-Reggiano cheese, occurs the emergence of early blowing (*ital.: gonfiore precoce*) - even before putting the cheese in the brine - even though milk production has no obvious alterations of the normal properties of composition and the operations of cheesemaking (curd formation and cutting, cooking temperature and times, etc...) are correct; this phenomenon is often associated with the use of whey starter with high titratable acidity but low fermentation activity and characterised by low contents of thermophilic lactic acid bacteria [13]. Other times, the analyses show that whey starter is technologically and microbiologically valid.

High titratable acidity and low bacterial count. Some hypotheses to explain

All these elements lead to a rather confused picture; the great variability of whey starters, due to the different conditions of preparation, may require clarity about how to produce whey starters and about the onset of the problems mentioned above. This calls for a scientific answer on the main factors that can affect the “vitality” of lactic acid bacteria themselves.

Regarding whey starter with high titratable acidity, but with low fermentation activity and low content of thermophilic lactic acid bacteria, different answers have been given: Sacchetti and Zambonelli [16] pointed out that when the titratable acidity reaches 41-42°SH and pH reaches the value of 3.20, the acidifying activity of lactic acid bacteria can no longer continue, despite the persistence of lactose in the whey, because the excess of lactic acid is such to stop first and then kill the lactic bacteria themselves. Even Parisi [8] shows that a too high acidity of the whey starter reduces the number of lactic acid bacteria, making them even weaker and less ready to continue the fermentation of lactose.

Pecorari et al. [12] and Tosi et al. [13] attribute the phenomenon to an action «stressful» exercised over the lactic acid bacteria by continuously high temperatures for too long time.

Mariani [38] and Mariani and Colajacomo [39], in two parallel studies aimed to comparing the quality of milk from Italian Friesian and Reggiana cow breeds

in Parmigiano-Reggiano cheese production, show that the whey starters of the two breeds had significant and marked differences for quality and acidifying ability. It was particularly noted that milk of Reggiana breed provides a whey starter with characteristics (sediment content, fermentation capacity and organoleptic qualities) most suitable for Parmigiano-Reggiano cheesemaking. The different mineral composition of milk from the two breeds (greater colloidal calcium phosphate content and lesser percentage of ionic calcium, in Reggiana cow milk), analysed in the same research, could suggest an important role that salt equilibria can exert on the properties of whey starter. This role has partly been confirmed by a research conducted recently on Cheddar cheese by Upreti et al. [40], stating that the contents of calcium and phosphorus and the ratio total salts / moisture exert a significant influence on the fermentation activity of lactic acid bacteria. This aspect related to the mineral component, therefore, certainly deserves to be deepened.

Desmazeaud [41], in a thorough analysis regarding the ability of milk to the growing of lactic flora, consider the use of substrates alternative to lactose. In particular, the author argues that a major substrate is the non-protein nitrogen. This is a fraction representing about 5% of total milk, consisting of urea, nitrogen bases, amino acids and small peptides. Some of these compounds are essential for the lactic fermentation, as having low molecular weights can be absorbed directly from the bacterial cell without undergoing prior processing; but, being present at low concentrations, can quickly become limiting. When these substrates are no longer available, the same bacteria have proteases on the plasmatic membrane that are capable of fragmenting proteins still intact, in order to generate more non-protein nitrogen. Then, there are specific transporters, whose function is to carry the non-protein nitrogen in the cell. These transporters are not able, however, to carry into the cell proteins still intact. Temperature, pH and the concentration of calcium ions operate to control the release or the retention of the proteases in the cell membrane; so, if the protease becomes inactive, lactic acid bacteria are no longer capable of fragmenting the protein and, therefore, of obtaining the substrate necessary for their growth. This phenomenon could be the basis of the presence of whey starters poor of microorganisms even if characterised by high acidity.

Paucimicrobial milks (milks with low bacterial count)

It was suggested that the insurgence of the problems mentioned above is due not so much to the lack of vitality of the whey starter lactic acid bacteria, but rather to the lack of fermentative capacity of milks. As evidenced by Bosi et al. [26], as a consequence of the changed conditions of production of the milk, the reason which ensured the presence of mesophilic microflora of milk are increasingly more weak; the increasingly widespread use of paucimicrobial milk creates the danger that the particular combination of strains, which is a peculiarity of the natural microflora, can become lost. Bottazzi et al. [23], however, point out that also cheese made with paucimicrobial milk, using the current whey starters, can become, all the same, a top-quality cheese. In any case, these observations suggest that it may be useful to conduct further research leading to review not only the quality of the whey starters, but also the quality of milk on which these whey starters must be used.

REFERENCES

1. Pecorari M., Panari G. (2005). La produzione di Parmigiano-Reggiano tra innovazione e tradizione. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 56, 85-103.
2. Neviani E., Mucchetti G., Addeo F. (1998). Importanza della microflora lattica "autoctona" nel definire il legame con il territorio nei formaggi DOP: ruolo del sieroinnesto naturale per Parmigiano Reggiano. *Il Latte*, 23 (2), 90-99
3. Mucchetti G., Addeo F., Neviani E. (1998). Evoluzione storica della produzione di formaggi a denominazione di origine protetta (DOP). I. Pratiche di produzione, utilizzo e composizione dei sieroinnesti nella caseificazione a formaggi Grana Padano e Parmigiano-Reggiano: considerazioni sulle relazioni tra sieroinnesto e DOP. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 49, 281-311.
4. Panari G., Pecorari M. (2004). Peculiarità qualitative e sicurezza igienica del Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 55, 443-448.
5. Nanni M., Coppola R., Iorizzo M., Sorrentino A., Sorrentino E., Grazia L. (1997). La microflora lattica nella maturazione del formaggio Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 48, 211-216.
6. Neviani E. (2004). L'influenza degli starters sulla qualità e sulla sicurezza delle produzioni casearie. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 55, 95-103.
7. Bottazzi V. (1962). Microflora del siero-fermento e sua importanza nel processo di caseificazione del formaggio Grana. *Il latte*, 36, 769-775.
8. Parisi O. (1966). Il siero innesto. *Stem-Mucchi*, Modena, 77-85.
9. Bottazzi V., Coconcelli P.S., Parisi M.G., Rebecchi A. (2000). Caratterizzazione biomolecolare di batteri lattici termofili del siero-fermento per Grana e indicazioni per un loro più razionale impiego. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 51, 291-311.
10. Gatti M., Lazzi C., Rossetti L., Mucchetti G., Neviani E. (2003). Biodiversity of *Lactobacillus helveticus* strains in natural whey starter used for Parmigiano-Reggiano cheese. *J. Appl. Microb.*, 95, 463-470.
11. Lazzi C., Bernini V., Gatti M., Rossetti L., Neviani E. (2004). Biodiversità di *Lactobacillus helveticus* nei sieroinnesti naturali per Parmigiano-Reggiano. *La Rivista del Latte*, nov.-dic., 8-14.
12. Pecorari M., Gambini G., Reverberi P., Caroli A., Panari G. (2003). Andamento della glicolisi nelle prime fasi di maturazione del Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 54, 149-162.
13. Tosi F., Sandri S., Fossa E., Summer A., Mariani M.S. (2006). Variazioni stagionali delle caratteristiche analitiche del sieroinnesto naturale utilizzato nella produzione di Parmigiano-Reggiano durante il 2004. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 57, 87-104.
14. Druscovich B. (1961). Contributo allo studio dei siero-fermenti usati nel Parmense. *Il latte*, 35, 104-107.
15. Fascetti G. (1905). I fermenti selezionati nella fabbricazione del Grana. *L'Italia Agricola*, 42, 183-184.
16. Sacchetti M., Zambonelli M. (1963). Acidità e carico microbico nei sieri-innesto della zona tipica del "Parmigiano-Reggiano". *Il Latte*, 37, 351-360.
17. Sacchetti M., Zambonelli C., Matteuzzi D. (1966). Studi sulla microflora dei sieri

- innesti del formaggio Parmigiano-Reggiano. I batteri non riferibili ai fermenti lattici. I blastomiceti. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 17, 338-350.
18. Matteuzzi D. (1967a). Studi sulla microflora dei siero-innesti del formaggio Parmigiano-Reggiano. I. Identificazione delle specie più rappresentative. *Annali di Microbiologia*, 17, 201-210.
 19. Matteuzzi D. (1967b). Studi sulla microflora dei siero-innesti del formaggio Parmigiano-Reggiano. II. Distribuzione biometrica dei caratteri “potere proteolitico” e “potere acidogeno” nella specie *Lactobacillus jogurti*. *Annali di Microbiologia*, 17, 211-219.
 20. Matteuzzi D. (1969). Studi sulla microflora dei siero-innesti del formaggio Parmigiano-Reggiano. III. Nutrizione di *Lactobacillus jogurti*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 18, 207-214.
 21. Gatti M., Neviani E. (1993). Studio dei sieroinnesti naturali per Grana mediante la tecnica conduttimetrica. *Ind. latte*, 39(1), 3-23.
 22. Neviani E., Divizia R., Abbiati E., Gatti M. (1995). Acidification activity of thermophilic lactobacilli under the temperature gradient of Grana cheese making. *J. Dairy Sci.*, 78, 1248-1252.
 23. Bottazzi V., Battistotti B., Rebecchi A. (1999). Ambiente e microflora del latte: una relazione che cambia. *Il latte*, 24(11), 84-88.
 24. Addeo F., Mucchetti G., Neviani E. (1997). Gli aspetti biochimici della maturazione del formaggio con particolare riferimento alle varietà a pasta dura. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 48, 7-20.
 25. Coppola R., Nanni M., Iorizzo M., Sorrentino A., Sorrentino E., Chiavari C., Grazia L. (2000). Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Lait*, 80, 479-490.
 26. Bosi F., Rebecchi A., Cappa F., Bottazzi V., Battistotti B. (1993). Batteri lattici per la produzione di formaggio Grana. IV parte: distribuzione e caratterizzazione di batteri lattici mesofili. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 44, 205-214.
 27. Bottazzi V., Vescovo M., Dallaglio F. (1973). Ricerche sulla microbiologia del formaggio Grana. IX parte: caratteri e distribuzione dei biotipi di *L. helveticus* nelle colture naturali (il siero fermento). *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 24, 23-39.
 28. Bottazzi V., Scolari G.L., Cappa F., Battistotti B., Bosi F., Brambilla E. (1992). Batteri lattici per la produzione di formaggio Grana. III parte: velocità di acidificazione e comparsa di gonfiore. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 43, 71-93.
 29. Grossiord B., Vaughan E., Luesink E., de Vos M.W. (1998). Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. *Lait*, 78, 77-84.
 30. Mucchetti G., Locci F., Mazzucotelli L., Neviani E. (1995). Evoluzione del processo di acidificazione del formaggio Grana Padano nelle prime 24 ore: influenza delle diverse condizioni di temperatura misurate all'interno della forma. *Atti 2° Congresso Italiano di Scienza degli Alimenti*, 518-529.
 31. Accolas J.P., Hemme D., Desmazeaud M.J., Vassal L., Bouillanne C., Veaux M. (1980). Le levains lactiques thermophiles : propriétés et comportement en technologie laitière. *Lait*, 60, 487-524.
 32. Mora R., Nanni M., Panari G. (1984). Variazioni chimiche, fisiche e microbiologiche nel formaggio Parmigiano-Reggiano durante le prime 48 ore.

- Sci. Tecn. Latt.-Cas., 35, 20-32.
33. Pellegrino L., De Noni I., Mannino S., Resmini P. (1996). Galattosio residuo nel formaggio Grana Padano in fascera e possibile rilevamento mediante biosensore. *Ind. Latte*, 32, 49-62.
 34. Pellegrino L., Battelli G., Resmini P. (1997). Andamento centripeto della maturazione nei formaggi Grana Padano e Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 48, 73-82.
 35. Pecorari M., Gambini G., Reverberi P., Caroli A. (2003). L'influenza di alcuni fattori tecnologici sulla glicolisi del Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 54, 287-299.
 36. Giraffa G., Rossetti L., Addeo F., Neviani E. (1998). Influence of the temperature gradient on the growth of thermophilic lactobacilli used as natural starters in Grana cheese. *J. Dairy Sci.*, 81, 31-36.
 37. Dieci E., Resmini P., Saracchi S. (1970). Ricerche sull'azione svolta nella maturazione del formaggio Parmigiano-Reggiano dai siero-innesti usuali e da quelli pregiati. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 21, 145-165.
 38. Mariani P. (1971). Ulteriori osservazioni sul latte di razza Reggiana e Frisona in relazione alla produzione di formaggio Parmigiano-Reggiano. *Riv. di Zoot.*, 44, 359-374.
 39. Mariani P., Colajacomo A. (1971). Caseificazione del latte di razza Reggiana e Frisona: aspetti tecnologici, resa e caratteristiche dei sieri e dei formaggi. *Riv. di Zoot.*, 44, 207-218.
 40. Upreti P., McKay L.L., Metzger L.E. (2006). Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to moisture ratio on Cheddar cheese quality: changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening. *J. Dairy Sci.*, 89, 429-443.
 41. Desmazeaud M. (1997). Aptitude du lait au développement de la flore lactique. In "Le fromage : de la science à l'assurance-qualité". Ed. Eck A. e Gillis J.-C., Lavoisier, Paris, 212-228.

EFFECTS OF MYCOTOXINS ON FERTILITY OF DAIRY COW

EFFETTI DELLE MICOTOSSINE SULLA FERTILITÀ DELLA VACCA DA LATTE

Rossi Federico, Righi Federico, Fuochi Sara, Quarantelli Afro

Summary

Ruminant species are generally considered to be less sensible to the negative effects caused by mycotoxins included in moldy feeds. This is based on the assumption that the rumen microflora and the liver pathways inactivate mycotoxins. However certain mycotoxins resist to rumen degradation and liver metabolism, causing clinical signs of intoxication and infertility. This review summarized the influence of toxins of reproductive apparatus activities in dairy cows.

It appears that zearalenone, ergotamine and aflatoxin are able to directly affect reproductive performance generating hormonal dysfunction and inducing cells toxicity, while other mycotoxins shows only indirect effects on health and fertility of dairy cows, through reduction of dry matter intake and decrease of gut nutrient absorption.

Key words:

Aflatoxins, Zearalenone, Ergotamine, Deoxynivalenol or Vomitoxin

INTRODUCTION

Molds are filamentous fungi potentially present in animal feed. The action of this organisms on dairy cows health varies according to different species, but it is basically related to three types of activity:

- Reduction of feed flavour with lowering dry matter intake (DMI)
- Reduction of nutrient availability of moldy feeds
- Direct action on metabolic state of dairy cows through mycotoxins production

Mycotoxins are toxic secondary metabolites (therefore not essential for fungine cells metabolism) directly produced on field, during harvesting or food storage. The development of field molds particularly depends on reduced plant resistance to the attack of micro-organism whose spores are ubiquitous in the environment (especially in soil and plant debris from previous harvest). For example, this phenomenon can happen during water stress, heat/cold stress or pursuant to a parasite attack (corn plant attacked by *Ostrinia nubilalis* or Europea Corn Borer). Molds developed during feed storage are especially favoured by high humidity rate in raw materials, through condensation inside silos and poor silage conditions.

Department of Animal Production, Veterinary Biotechnology, Food Quality and Safety -
Section of Food Science and Nutrition. University of Parma Via del Taglio, 10-43126 Parma
- Italy

Molds genus mostly involved in ruminant mycotoxicosis are: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Epichloe*, *Neotyphodium* and *Stachybotrys*.

Mycotoxicosis diagnosis is very difficult considering that all these toxins do not produce pathognomonic symptoms and usually their action leads to chronic or asymptomatic diseases.

Whitlow et Hagler (2005) say that the influence of mycotoxins on animal production depends on the following factors:

- Reduction of DMI
- Decreasing ruminal and gut absorption of nutrients
- Influence on multiple metabolic pathways and alteration of hormonal regulation
- Suppression of immune system activity
- Direct influence on features of specific organs (liver, kidneys, reproductive system)

Mycotoxicosis symptoms depend on the mycotoxin involved, on biological systems interaction and on mutual influence between toxin and stress factors (Whitlow et Hagler, 2002).

Diagnostic difficulties are also increased by interaction between different mycotoxins activity in the same animal, mycotoxins intake, body resistance and finally by some biological aspects that research are not yet been able to specify.

Nowadays mycotoxicosis diagnosis is based on clinical exclusion process: symptoms, epidemiological analysis of atypical clinical signs, toxins research in animal feed (forage, silage, raw materials, milk and dairy products). However it must always be taken under consideration that mycotoxins can be a primary factor for production loss, reproductive disorders and increase in diseases incidence.

Aflatoxins

Aflatoxins (AF) are highly toxic metabolites (difuranocumarine group) produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Four types of toxins have been identified in feeds: AF-B1, AF-B2, AF-G1 and AF-G2.

Aflatoxins B1 is converted in aflatoxicol (less toxic metabolite) in the rumen (Fink-Gremmels, 2008) where ruminal micro-organisms are able to partially reduce aflatoxins toxicity. Westlake et al. (1989) observed that ruminal flora is unable to significantly turn AF-B1 into AF-M1; less than 10% of ingested aflatoxin-B1 is degraded in rumen fluid.

A portion of AF-B1 that escape to ruminal metabolism is absorbed directly by rumen and gut mucosa and it is then partially converted to AF-M1 by liver. AF-B1 bio-trasformation in tissues is mediated by cytochrome-p450 an enzyme mainly present in the liver (Hussein and Brasel, 2001; Coulombe, 1993).

Aflatoxin M1 can pass into milk with a transfer rate of 1-6% (Fink-Gremmels, 2008). This phenomenon depends on several factors: milk production, activity of liver microsomal oxidase, presence of mastitis (Chopra et al., 1999).

AF-B1 toxicity in ruminant depends on:

- Quantity and duration of toxins assumption
- Animal age and physiological state
- Nutritional state and rumen activity

Although the high resistance compared to monogastric mammals, ruminants can present clinical sign of aflatoxicosis as well: decrease in dry matter intake (DMI), reduced milk production and liver damage. Chronic intoxication leads to a decrease of immune response and feed efficiency.

These effects are due to aflatoxin toxic activity on rumen functionality. Cook et al. (1986) observed a decreasing rumen motility after oral administration of 0.2-0.8 mg/kg of AF-B1.

Aflatoxins are certainly able to inhibit T-lymphocyte protein synthesis: this is consistent with one of the most relevant negative effects of aflatoxins that is compromising immune system, especially affecting blood leukocytes (Sharma, 1993).

Aflatoxins can also influence cow reproductive activity. Several cases of third-trimester abortion have been correlated with peanuts AF-B1 in dairy cows eating a diet comprising large proportion of 77 μ g/g aflatoxin contaminated moldy peanut (Ray et al., 1986).

The negative effect of aflatoxins on reproductive performance of dairy cows is not attributable to a direct activity on oocyte or embryo, but it is due to altered maternal homeostasis: reduction of DMI, decrease rumen motility, liver damage and reduction on immune response (Casteel, 2006).

Therefore there is a lack of nutrients and liver disorders that directly interfere with ovarian and uterine activity.

Zearalenone

Zearalenone (ZEN) is a phyto-estrogenic molecule produced by mold *Fusarium*, in particular *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti* e *F. semitectum* (Zinedine et al., 2007).

In animal organism ZEN follows two main metabolic pathways (Olsen, 1989):

- Hydroxylation with formation of α and β -zearalenol (α and β ZOL), catalyzed by 3 α and 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (HSDs)
- Zearalenone conjugation with liver glucuronic acid, catalyzed by uridindiphosphate-glucuronil-transferase (UDPGT)

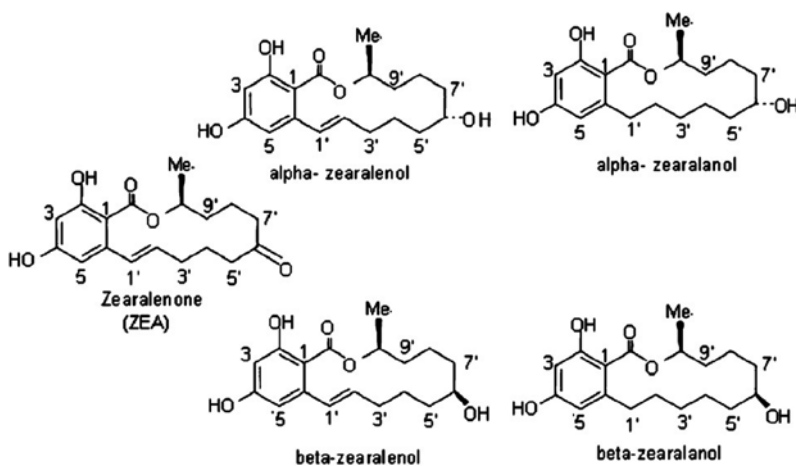
Zearalenone is converted into zeranol by bacterial genus including *Butyrivibrio fibrisolvens* in rumen fluid (Yannikouris et Joauny, 2002). In particular zearalenone is converted by protozoa into α -ZOL and metabolized by rumen bacteria (Kennedy et al., 1998).

As a result of this metabolic step high-polarity compounds that ease gut absorption and enhance zearalenone estrogenic activity are produced. Kiessling et al. (1984) discovered that zearalenone estrogenic activity increases up to three-four times after this metabolic process.

HSDs is an enzyme included in hepatocytes but also in kidney, hypothalamus and reproductive organs. Hepatocytes and ovarian granulosa cells include microsomal 3 β -HSDs and predominantly produce β -ZOL, the most relevant urinary and fecal zearalenone metabolite (Olsen, 1989; Malekinejad et al. I, 2006; Malekinejad et al. II, 2006). Unlike pigs, dairy cows have a peculiar resistance to zearalenone estrogenic

effect. This is due to mycotoxin bio-transformation in liver, that leads to α -ZOL. This metabolic pathway is considered a “bio-activation reaction” in swines, while it is considered as a detoxification process in ruminants (Malekinejad et al. I, 2006). Since the activity of ZEN is connected with their metabolites action, liver metabolism and enteric excretion are essential for the toxicity of zearalenone in dairy cows (D’Mello et al., 1999). Even if liver glucuronic conjugation in cattle is significantly lower than in pigs zearalenone is able to affect ruminants too (Malekinejad et al. I, 2006).

Figure 1: Chemical structure of zearalenone molecule and its metabolite (Fink-Gremmel et Malekinejad, 2007)



Zearalenone metabolic activity is as a competition mechanism on estrogenic cytoplasmatic receptors present on endometrial and ovarian cells.

According to Kiang et al. (1978) *in vivo* zearalenone injection (200 μ g) is enough to fill more than half of uterine estrogenic receptor in mice, and therefore to produce a relevant estrogenic response. This phenomenon depends both on micotoxin receptorial affinity and on very long zearalenone biologic half-life (Kiang et al., 1978). Moreover receptorial affinity of zearalenone to estrogenic receptors is two-three times higher than the natural estrogen one (Blankenship et al., 1982).

Once bound to receptors zearalenone allows receptorial translocation from cytoplasm to cell nucleus where receptor stimulated a peculiar estrogenic responses because of the greater gene expression: increased RNA synthesis, RNA-polymerase activity and uterine protein synthesis (Minervini et al., 2001).

Since estrogen receptors are present in hypothalamus as well, the linkage of zearalenone to hypothalamic estrogen receptors produces a significant prolactin hormone release (Zinedine et al., 2007). It is recognized a close link between blood prolactin hormone level and occurrence of follicular cysts in dairy cows.

Follicular fluid mycotoxin concentration varies accordingly to the duration of follicular exposition to zearalenone: follicular cysts present a higher concentration

of zearalenone than normal follicles (detection rate 35% and 18.8%) (Takagi et al. 2008).

Furthermore, steroids synthesis can partially explain zearalenone effects on fertility of dairy cows. Zearalenone is able to inhibit 3α -HSD activity, an enzyme essential for progesterone and estrogen synthesis in ovarian cells (Olsen, 1989).

Minervini et al. (2006) studied zearalenone effects on mare follicular cells. It was observed that 1×10^{-4} - $1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ zearalenone can increase proliferation of granulose cells.

A high zearalenone dose can also lead to down-regulation of cells proliferation. This is due to enzymatic dysfunction on 3α -HSD whose inhibition follows follicular atresia and energetic metabolic abnormalities. Granulose cells apoptosis is mainly due to zearalenone and α -zearalenol, while β -zearalenol is active at higher follicular doses (Minervini et al., 2006) and $30 \mu\text{g/l}$ of zearalenone are directly responsible for the oocyte development inhibition in meiotic stage M1 and telophase T1 (Minervini et al., 2001). In prepubertal heifers receiving diet contaminated by zearalenone over three estrus cycles (about 65 days) conception rate was reduced up to 62-87% (Weaver et al., 1986).

In an *in vitro* experiment, oocytes were exposed to high concentration of zearalenone for 21 days in order to simulate acute exposure to zearalenone and it was found that ZEA levels in follicular fluid were often low. Despite this result the study showed a reduction of the conception rate (Minervini et al., 2008). This symptom of infertility can be attribute to prolonged zearalenone intake in dairy cows.

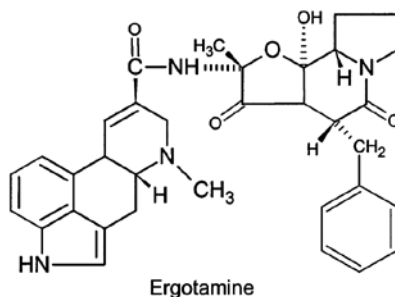
Most of the reproductive dysfunction related to zearalenone mycotoxin probably begin as sub-clinical form and the severity of symptoms depends on cow breed, parity and livestock environment.

Witte et Hooser (2003) attributes to zearalenone various reproductive symptoms: abnormal estrus cycle, vulva wetness, reduced milk production and increased udder size. As a conclusion clinical signs are mainly the result especially of zearalenone estrogenic effects (Haschek et Haliburton, 1986).

Ergotamine (Tall Fescue Alkaloids)

Ergotamine (ERGOT) is produced by *Claviceps purpurea*, *C. paspalli* and *C. fusiformis*, that parasitize of wheat, barley, sorghum, rye and tall fescue.

Figure 2: Ergotamine molecular structure (Hussain et Brasel, 2001).



ERGOT acts as an agonistic molecule on dopamine receptors and this is the main mechanism responsible for clinical signs (Larson et al., 1999).

This alkaloid has significant effects on rumen function. Dairy cows fed 505-620 µg/kg S.S./die of ergotamine show changes in isovalerate, propionate and ammonia nitrogen rumen concentration. Furthermore, an increased rumen indigestible protein and NDF rumen digestibility might suggest some variation in rumen microbial activity (Schumann et al., 2008).

Another typical symptom of ERGOT toxicosis is high temperature intolerance in summer with hyperthermia, lipid tissue necrosis and foot injury also known as “fescue foot” (Al-Tamimi et al., 2003). A diet with high *Claviceps* infestation may cause body temperature increment and decreasing dry matter intake and milk production reduction (Ross et al., 1989; Al-Tamimi et al., 2003).

Ergotamine also influences reproductive function in dairy cows. The toxic effects depend on reproductive stage at the time of intoxication, ergotamine dose and toxin exposure time.

After ergotamine administration some changes in cow metabolic profile can be observed especially in glucose, triglycerides, cholesterol and cortisol with an increasing plasma concentration, while insulin level are reduced (Browning, 2003). This is associated with an increase in blood glucose and triglycerides concentration and direct α -adrenergic activity (Browning, 2003).

A certain decrease in plasma IGF-1 concentration was shown in association with two pathways:

- 1) Increase in plasma cortisol concentration
- 2) Agonistic α -adrenergic activity

IGF-1 is known as one of the most relevant substances determining the expression of ovarian gonadotropin receptors and steroid-genesis enzymes.

ERGOT works as a dopaminergic alkaloid deleting LH secretion and plasmatic prolactin (Mizinga et al., 1992). According to McKenzie et al. (1991) a reduction up to 23% in LH plasmatic level was observed associated with a reduction in prolactin (PRL), FSH and folliculogenesis.

According to Browning et al. (1998) ergotamine inhibiting effect on LH

secretion is present during late luteal stage while absent during follicular period of estrus cycle. This is due to ergotamine negative influence on GnRH production by interaction with dopaminergic, α -adrenergic and serotonergic pathway (Rall et Schleifer, 1980).

According to Browning et al. (1997) LH plasmatic concentration decreases from 0.56 ng/ml to 0.50 ng/ml during three hours after administration of 9.5 mg of ergotamine.

Ergotamine pathological activity becomes especially evident during summer, when temperature above 30°C may influence physiological response to alkaloids action. This environmental conditions can cause a decrease in PRL plasmatic concentration four hours after ergotamine administration returning then to normal level after five additional hours (Browning et al., 1997).

In accordance with Browning et al. (2001) ergotamine influences prostaglandin (PGF) synthesis and myometrium contractility by α -adrenergic receptor agonist activity. This increase in PGFM plasmatic concentration may cause a decrease in reproductive performance of dairy cows interfering with ovulation, luteal function and pregnancy maintenance.

After 30 days of *Claviceps* infested tall fescue forage administration, Mizinga et al. (1992) showed a decrease in progesterone plasmatic level. Ahmed et al. (1990) have suggested that ergotamine causes an increase in PGF2 α luteal sensibility or directly alters luteal structural cells.

According to Burke et al. (2001) grazing beef cattle fed *Claviceps* infested tall fescue may present reduced pregnancy rate (PR) and increased embryo mortality. Further symptoms are increased rectal temperature and breathing rate, decreased PRL and total cholesterol plasma concentration.

Increase in body temperature and PGF synthesis may cause myometrium contraction with abortion outbreaks as observed by Appleyard (1986) in Scottish dairy herds.

Deoxynivalenol or Vomitoxin

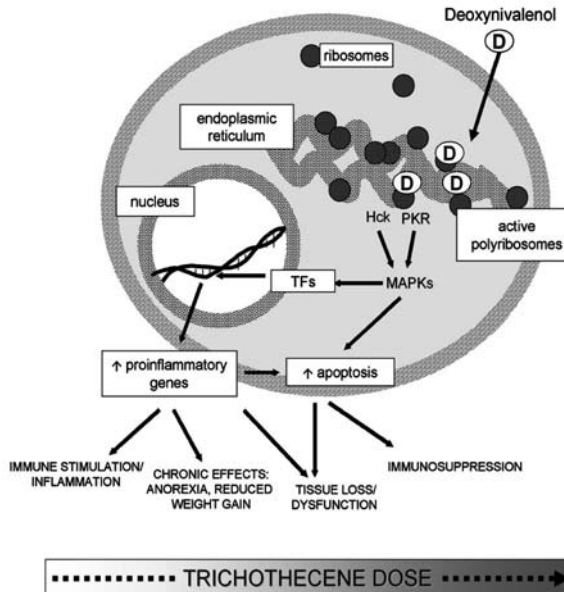
Deoxynivalenol (DON) is a trichothecen mycotoxin produced by *Fusarium* mold, especially *Fusarium roseum*.

Direct effects of deoxynivalenol on fertility of dairy cows are still unknown. However indirect effects on reproductive performance could be related to decreasing dry matter intake, protein rumen utilization, rumen pH and immune response (Pestka, 2007).

Compared to swine and man, cows are not very sensitive to DON toxic effects. After ingestion, DON is rapidly converted to deoxynivalenol-diepoxid (DON-1) by rumen microorganism, but cows with acidosis and microorganism imbalance may lead to incomplete DON rumen detoxification (Swanson et al., 1984).

Mycotoxin adsorption may induce a decrease in milk production of dairy cows (Whitlow et Hagler, 2002). Charmley et al. (1993) observed a 13% decrease in milk production in 18 dairy cows after 2.7-6.5ppm DON administration.

Figure 3: Proposed molecular mechanism of action of deoxynivalenol and other trichothecenes. Deoxynivalenol enters cell and binds to active ribosomes which transduce a signal to RNA-activated protein kinase (PKR) and hemoitopoietic cell kinase Hck. Subsequent phosphorylation of mitogen-activated protein kinases drives transcription factor (TF) activation apoptosis and resultant chronic and immunotoxic effects (Pestka, 2007).



As observed by Seeling et al. (2006), DON administration is followed by a decrease in acetate:propionate ratio. This is probably due to rumen flora dysmicrobia with predominant amylolytic bacteria on cellulolytic ones.

Seeling et al. (2006) also observed a decrease in dietary fiber digestion and in dry matter intake (DMI). Similar results were observed by Keese et al. (2008), while Ingalls (1996) found that cows fed with DON contaminated barley did not present those variations.

Such discordant results may be related to chronic negative effects of deoxynivalenol.

According to Danicke et al. (2005) DON is almost completely metabolized in the rumen, but it can significantly reduce the use of dietary protein by rumen microflora.

Korosteleva et al. (2009) observed that 0.5 mg/kg DON may also reduce phagocytic and neutrophilic activity and consequently determine serious symptoms when mastitis and lameness occurs.

Ocratoxin-A

Mold species involved in ocratoxin-A (OA) production are *Aspergillus alutaceus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus quercins*, *Aspergillus sulphureum* and

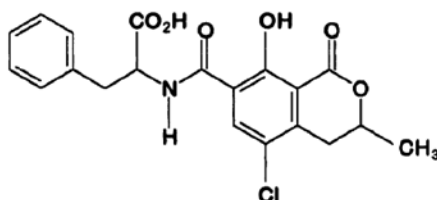
Penicillium verrucosum.

There are no certain data concerning direct effects of ocratoxin-A on reproductive activity of dairy cows. In monogastrics, kidney damage, dehydration, reduce immune response, lower dry matter intake and lower production may be caused by ocratoxin-A (Yiannikouris et Jouany, 2002).

During rumen fermentation ocratoxin-A is hydrolysed to phenylalanine and ocratoxin- α (low toxicity) so ruminants are very resistant to ocratoxin toxic effects.

According to Hult et al. (1976) after OA administration, 50% of ocratoxin is hydrolyzed during in 15 minutes and 95% during the following four hours. The remaining amount is then hydrolyzed while passing through reticulum and omasum.

Figure 4: Chemical structure of ocratoxin-A (Hohler et al., 1999)



Ocratoxin degradation rate in rumen environment is variable from 2 to 12.5 hours (Ozpinar et al., 1999). According to Ribelin et al. (1978) mycotoxin passage in milk is possible when a high dose of ocratoxin- α (13.3 mg/kg in a single administration or 1.66 mg/kg for 4-5 days) is given.

Greater adsorption of ocratoxin-A is observed in case of rumen acidosis when rumen pH decreases as well as protozoa concentration. Rumen degradation extent depends on the time between ingestion and the beginning of protozoa hydrolysis (Kiessling et al., 1984) and on forage-concentrate ratio too. Moreover degradation is decreased by high starch concentration in dairy cows diet (Ozpinar et al., 1999).

Ocratoxin-A absorption occurs in abomasum and duodenum through passive transport mechanism as non-ionized form. This absorption flow only occurs with lower abomasum pH.

After absorption, ocratoxin-A is transported to liver and kidney by small size plasmatic proteins (Marquart et Frohlich, 1992) where ocratoxin-A undergoes biotransformation into hydroxioocratoxin-A (OH-OA).

Therefore in dairy cows there are two different detoxification pathways for ocratoxin-A (Hohler et al., 1999):

- 1) Rumen protozoa hydrolysis to ocratoxin- α
- 2) Liver hydrolysis to HO-OA

Both those metabolites are less toxic than the original forms in dairy cattle as they have lower half-life and faster fecal/urine excretion.

Toxic effects of ocratoxin on cells metabolism is related to an apoptotic stimulus. According to Lioi et al. (2004) lymphocyte apoptosis was observed in cows receiving 0.1-0.5 μ M OA 24 hours.

T2 - Toxin

T2-toxin is produced by *Fusarium* mold, especially *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium poae* (Whitlow et Hagler, 2002).

This mycotoxins are hydrolysed in rumen fluid by *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium* as an additional energetic substrate (Westlake et al., 1987).

Researchers think that toxin rumen adsorbtion may be increased by rumen acidosis when cellulolytic bacteria activity decreases.

Huszenicza et al. (2000) have studied T2-toxin effects on heifers fertility. After T2-toxin administration at the dose of 0.3-0.9 mg/d no abnormality in follicles number and size was observed, while an increase in the duration of the interval between parental PGF2 α administration and ovulation (about two days) was found.

According to Huszenicza et al. (2000) this toxic effects are probably related to direct toxic activity of T2-toxin on granulosa cells and luteal cells and based on Kegl et Vanyi (1991) serious symptoms of acute haemorrhagic enteritis (decrease in dry matter intake and haemorrhagic diarrhea) seem to be related to T2-toxin action on red blood cells.

CONCLUSION

The presence of molds and mycotoxins in feedstuffs may determine a decrease in dairy cow reproductive performances. It appears that at least six kinds of mycotoxins can affect dairy herds fertility: aflatoxin, zearalenone, deoxynivalenol, ergotamine, ocratoxin and toxin T2.

Controlling mycotoxins presence is therefore extremely important for bio-security in livestock industries, especially considering that all this toxins seem to be some of the most relevant causes of infertility in high lactating dairy cows.

REFERENCES

1. Ahmed N.M., Schmidt S.P., Arbona T.R., Maple D.N., Bransby D.I., Carson R.L., Coleman D.A., Rahe C.H. (1990) "Corpus luteum functions in heifers grazieng endophyte-free and endophyte-infected Kentucky 31 tall fescue" *Journal of Animal Science*, vol. 68, suppl.
2. Al-Tamimi H., Rottinghaus G.E., Spiers D.E., Spain J., Chatman D., Eichen P.A., Carson T.L. (2003) "Thermoregulatory response of dairy cows fed ergotized barley during summer heat stress" *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 15, pp. 355-360
3. Appleyard W.T. (1986) "Outbreak of bovine abortion attributed to ergot poisoning" *Veterinary Record*, vol. 118, pp. 48-49
4. Blankenship L.T., Dickey J.F., Bodine A.B. (1982) "In vitro mycotoxin binding to bovine uterine steroid hormone receptors" *Theriogenology*, vol. 17, n $^{\circ}$ 3, pp. 325-329
5. Browing R. (2003) "Effect of ergotamine on plamsa metabolites and insuline-like growth factor-1 concentration in cows" *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 135, pp. 1-9
6. Browing R., Schrick F.N., Thompson F.N., Smith H.M., Landry S.C. (1997)

- “Effect of ergot alkaloids on endocrine profiles in late luteal phase cows” *Journal of Animal Science*, vol. 75, suppl. 1, pp. 294
7. Browning R., Schrick F.N., Thompson F.N., Wakefield T. (1998) “Reproductive hormonal response to ergotamine and ergovine in cows during the luteal phase of the estrous cycle” *Journal of Animal Science*, vol. 76, pp. 1448-1454
 8. Browning R., Schrick F.N., Thompson F.N., Wakefield T. (2001) “Effect of an acute ergotamine challenge on reproductive hormones in follicular phase heifers and progesterin-treated cows” *Animal Reproduction Science*, vol. 66, pp. 135-149
 9. Burke J.M., Rorie R.W., Piper E.L., Jackson W.G. (2001) “Reproductive responses to grazing endophyte-infected tall fescue by postpartum beef cows” *Theriogenology*, vol. 56, n° 2, pp. 357-369
 10. Casteel S.W. (2006) “Reproductive toxicants - Mycotoxins” in *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, ed. Saunders-Elsevier, pag. 425
 11. Charmley E., Trenholm H.L., Thompson B.K., Vudathala D., Nicholson J.W.G., Prelusky D.B., Charmley L.L. (1993) “Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production and its composition” *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 3580-3587
 12. Chopra R.C., Chabra A., Prasad K.S.N., Dudhe A., Murthy T.N., Prasad T. (1999) “Carryover of aflatoxin M1 in milk of cows fed aflatoxin B1 contaminated ration” *Indian Journal of Animal Nutrition*, vol. 16, pp. 103-106
 13. Cook W.O., Richard J.L., Osweiler G.D., Trampel D.W. (1986) “Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1” *The American Journal of Veterinary Research*, vol. 47, n° 8, pp. 1817-1824
 14. Coulombe R.A. (1993) “Biological action of mycotoxins” *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 880-891
 15. Danicke S., Matthaues K., Lebzien P., Valenta H., Stemme K., Ueberschar K-H., Razzazi-Fazeli E., Bohm J., Flachowsky G. (2005) “Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows” *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 89, n° 9-10, pp. 303-315
 16. D’Mello J.P.F., Placinta C.M., McDonald A.M.C. (1999) “Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity” *Animal Feed Science and Technology*, vol. 80, pp. 183-205
 17. Fink-Gremmels J. (2008) “The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows” *The Veterinary Journal*, vol. 176, pp. 84-92
 18. Fink-Gremmels J., Malekinejad H. (2007) “Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone” *Animal Feed Science and Technology*, vol. 137, pp. 326-341
 19. Haschek W.M., Haliburton J.C. (1986) “Fusarium moniliformis and zearalenone toxicoses in domestic animal: a review” in *Diagnosis of Mycotoxicoses*, ed. Richards J.L. and Thurston J.R., pp. 239-245
 20. Hohler D., Sudekum K.H., Wolfram S., Frohlich A.A., Marquart R.R. (1999)

- “Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep” *Journal of Animal Science*, vol. 77, pp. 1217-1223
21. Hult K., Teiling A., Gatenbeck S. (1976) “Degradation of ochratoxin A by ruminant” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 32, n° 3, pp. 443-444
 22. Hussein H.S., Brasel J.M. (2001) “Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals” *Toxicology*, vol. 67, pp. 101-134
 23. Huszenicza G., Fakete S., Szigeti M., Febel H., Kellems R.O., Nagy P., Cseh S., Veresgyhazy T., Hullar I. (2000) “Ovarian consequence of low dose peroral fusarium (T-2) toxin in a ewe and heifer model” *Theriogenology*, vol. 53, pp. 1631-1639
 24. Ingalls J.R. (1996) “Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows” *Animal Feed Science and Technology*, vol. 60, 297-300
 25. Keese C., Meyer U., Rehage J., Spilke J., Boguhn J., Breves G., Danicke S. (2008) “On the effects of the concentrate proportion of dairy cow ration in the presence and absence of a fusarium toxin contaminated triticale on cow performance” *Archives of Animal Nutrition*, vol. 62, pp. 241-262
 26. Kegl T., Vanyi A. (1991) “T-2 fusariotoxicosis in a cattle stock” *Magyar Allatorvosok Lapja*, vol. 46, pp. 467-471
 27. Kennedy D.G., Hewitt S.A., McEvoy J.D., Currie J.W., Cannavan A., Blachflower W.J., Elliot C.T. (1998) “Zeranol is formed from fusarium spp. toxins in cattle in vivo” *Food Additives and Contaminants*, vol. 15, pp. 393-400
 28. Kiang D.T., Kennedy B.J., Pathre S.V., Mirocha C.J. (1978) “Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors” *Cancer Research*, vol. 38, pp. 3611-3615
 29. Kiessling K., Pettersson H., Sandholm K., Olsen M. (1984) “Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 47, n° 5, pp. 1070-1073
 30. Korosteleva S.N., Smith T.K., Boermans H.J. (2009) “Effects of feed naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows” *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 1585-1593
 31. Larson B.T., Harmon D.L., Piper E.L., Griffis L.M., Bush L.P. (1999) “Alkaloid binding and activation of D2 dopamine receptors in cell culture” *Journal of Animal Science*, vol. 77, n° 4, pp. 942-947
 32. Lioi M.B., Santoro A., Barbieri R., Salzano S., Ursini M.V. (2004) “Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes” *Mutation Research*, vol. 557, pp. 19-27
 33. Malekinejad H., Colenbrander B., Fink-Gremmels J. (2006) “Hydroxysteroids dehydrogenase in bovine and porcine granulosa cells convert zearalenone into its hydroxylated metabolites α -zearalenol and β -zearalenol” *Veterinary Research Communication*, vol. 30, pp. 445-453
 34. Malekinejad H., Maas-Bakker R., Fink-Gremmels J. (2006) “Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone” *The Veterinary Journal*, vol. 172, pp. 96-102
 35. Marquardt R.R., Frohlich A.A. (2008) “A review of recent advances in

- understanding ochratoxycosis” *Journal of Animal Science*, vol. 70, pp. 3968-3988
36. McKenzie P.P., Erickson B.H. (1991) “Effects of fungal infected fescue on gonadotropin secretion and folliculogenesis in beef heifers” *Journal of Animal Science*, vol. 69, suppl.
 37. Minervini F., Dell’Aquila M.E. (2008) “Zearalenone and reproductive function in farm animals” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 9, pp. 2570-2584
 38. Minervini F., Dell’Aquila M.E., Maritato F., Minoia P., Visconti A. (2001) “Toxic effects on the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocyte and 17 β -estradiol levels in mural granulosa cell cultures” *Toxicology in Vitro*, vol. 15, pp. 489-495
 39. Minervini F., Giannoccaro A., Fornelli F., Dell’Aquila M.E., Minoia P., Visconti A. (2006) “Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from equine ovaries” *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 4, pp. 61-70
 40. Mizinga K.M., Thompson F.N., Stuedemann J.A., Kiser T.E. (1992) “Effects of feeding diets containing endophyte-infected fescue seed on luteinizing hormone secretion in postpartum beef cows and cyclic heifers and cows” *Journal of Animal Science*, vol. 70, pp. 3483-3489
 41. Olsen M. (1989) “Metabolism of zearalenone in farm animal” in *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity 1st Ed.*, ed. Saunders-Elsevier, pp. 167-177
 42. Ozpinar H., Augonyte G., Drochner W. (1999) “Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an in vitro system” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 7, pp. 1-9
 43. Petska J.J. (2007) “Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks” *Animal Feed and Science Technology*, vol. 137, pp. 283-298
 44. Rall T.W., Schleifer L.S. (1980) “Drugs affecting uterine motility: oxytocin, prostaglandins, ergot alkaloids and other agent” in *Goodman and Gilman’s: The Pharmacological Basis of Therapeutics 6th ed.*, ed. McGraw-Hill, pp. 935-950
 45. Ray A.C., Abbitt B., Cotter S.R., Murphy M.J., Reager J.C., Robinson R.M., West J.E., Whitford H.W. (1986) “Bovine abortion and death associated with consumption of aflatoxin-contaminated peanuts” *Journal of American Veterinary Medical Association*, vol. 188, n° 10, pp. 1187-1188
 46. Ribelin W.E., Fukushima K., Still P.E. (1978) “The toxicity of ochratoxin to ruminants” *Canadian Journal of Comparative Medicine*, vol. 42, pp. 172-177
 47. Ross A.D., Bryden W.L., Bakau W., Burgess L.W. “Induction of heat stress in beef cattle by feeding the ergot of *Claviceps purpurea*” *Australian Veterinary Journal*, vol. 66, n° 8, pp. 247-249
 48. Schumann B., Labzien P., Ueberschar K-N., Spilke J., Holtershinken M., Danicke S. (2008) “Effects of the level of feed intake and ergot contaminated concentrate on ruminal fermentation and on physiological parameters in cows” *Mycotoxin Research*, vol. 24, n° 2, pp. 57-72
 49. Seeling K., Lebzien P., Danicke S., Spike J., Sudekum K-H., Flachowsky G.

- (2006) "Effects of level of feed intake and Fusarium toxin-contaminated wheat on rumen fermentation as well as on blood and milk parameters in cows" *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 90, pp. 103-115
50. Sharma R.P. (1993) "Immunotoxicity of mycotoxins" *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 892-897
 51. Swanson S.P., Nicoletti J., Rood H.D., Buck W.B., Cote L.M., Yoshizawa T. (1984) "Metabolism of three trichothecene mycotoxins, t-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol by bovine rumen microorganisms" *Journal of Chromatography*, vol. 414, pp. 335-339
 52. Takagi M., Mukai S., Kuriyagawa T., Takagaki K., Uno S., Kokushi E., Otoi T., Budiyanto A., Shirasuna K., Miyamoto A., Kawamura O., Okamoto K., Deguchi E. (2008) "Detection of zearalenone and its metabolites in naturally contaminated follicular fluids by using LC/MS/MS and in vitro effects of zearalenone on oocyte maturation in cattle" *Reproductive Toxicology*, vol. 26, pp. 164-169
 53. Weaver G.A., Kurtz H.J., Behrens J.C., Robinson T.S., Seguin B.E., Bates F.Y., Mirocha C.J. (1986) "Effects of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers" *The American Journal of Veterinary Research*, vol. 47, pp. 1395-1397
 54. Westlake K., Mackie R.I., Dutton M.F. (1987) "T-2 toxin metabolism by ruminal bacteria and its effect on their growth" *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, n° 3, pp. 587-592
 55. Westlake K., Mackie R.I., Dutton M.F. (1989) "In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations" *Animal Feed Science and Technology*, vol. 25, pp. 169-178
 56. Whitlow L.W., Hagler W.M. (2002) "Mycotoxin contamination of feedstuff - An additional stress factor for dairy cattle" http://www.cals.ncsu.edu/an_sci/extension/dairy/mycoto-1.pdf
 57. Whitlow L.W., Hagler W.M. (2005) "Mycotoxins in dairy cattle: occurrence, toxicity, prevention and treatment" in *Proceeding of Southwest Nutritional Conference*, pp. 124-138
 58. Witte C., Hooser S. (2003) "The presence, effect and diagnosis of zearalenone in dairy cattle" <http://www.micotoxinas.com.br/boletim48.pdf>
 59. Yiannikouris A., Jouany J. (2002) "Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review" *Animal Research*, vol. 51, pp. 81-99
 60. Zinedine A., Soriano J.M., Moltò J.C., Manes J. (2007) "Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulation and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin" *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, pp. 1-18

PIG FARMING AND BUSINESS STRATEGIES *ALLEVAMENTI SUINI E STRATEGIE D'IMPRESA*

SALGHETTI Andrea¹, FERRI Giovanni¹, DOLFINI Enrica²

Summary

Pig farming is one of the most important livestock production industries in Italy. It is widespread throughout the peninsula, although it is much more intensive in the northern regions. Although the pig farms do not depend on the vegetable productions of the farm businesses themselves for feeding the animals, a certain area of land is, however, required for the disposal of the waste generated by the animal husbandry activities.

From 1970 till now, the national pig population has been stable, but tends to be concentrated in large farms. A distinguishing feature of our farms is the production of heavy pigs specifically raised for processing into DOP (Denomination of Protected Origin) cured meats. Over recent years, the basic price of heavy pigs for slaughtering has continued to fall, creating considerable difficulties for the entire sector.

An analysis of the economic management of a pig farm during the transition from a semi-open cycle to a closed cycle system confirmed the economic viability of the business strategy, which includes all the phases of the production cycle taking place within the farm. Through this strategy, the difficulties connected with cyclical fluctuations in market prices can be dealt more efficiently.

Keywords: Pig farms, market, business strategies.

1. PREMESSA

La produzione di carne suina è da sempre molto diffusa e presente nelle aziende agricole. Tra i pregi di questo animale monogastrico, vi è quello di essere onnivoro e quindi di poter consumare ogni sorta di alimento. Nel passato ha rappresentato una fonte proteica molto importante per le famiglie contadine che lo alimentavano con gli scarti della cucina all'interno di un'economia domestica di sussistenza. Animale molto rustico, è stato selezionato nel corso degli anni puntando sulle sue innate qualità legate all'elevata capacità riproduttiva e ad un'ottima conversione degli alimenti e di resa alla macellazione.

Trova larga diffusione in tutta la pianura Padana, ma anche in zone non particolarmente vocate alla produzione agricola. La tipologia di allevamento attuale non dipende più strettamente dalla produzione vegetale dell'azienda che lo ospita, ma attinge al mercato per il reperimento della quasi totalità degli alimenti. La disponibilità di un buon numero di ettari di terreno risulta comunque fondamentale

¹Sezione di Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma, Via del Taglio 10 – 43126 Parma

²Laureata in Tecnologie delle Produzioni Animali e Sicurezza degli Alimenti.

ai fini della corretta gestione delle deiezioni prodotte dagli animali allevati. Infatti a partire dalla metà degli anni 70 sono stati introdotti dei provvedimenti legislativi comunitari a favore della tutela dell'ambiente che hanno individuato tra le principali fonti d'inquinamento quella derivante dall'azoto proveniente dalle attività di allevamento. Dunque oggi è necessario programmare e documentare l'utilizzo dei reflui prodotti dagli allevamenti secondo schemi ben precisi che portano a non poter eccedere determinati quantitativi di azoto per ettaro.

In Italia, in particolare nelle regioni settentrionali, si è differenziato e sviluppato l'allevamento del suino pesante, un animale macellato ad un peso elevato, circa 160 chilogrammi, le cui cosce sono sufficientemente grandi da poter essere immesse nella filiera di produzione dei diversi prosciutti Dop che vengono realizzati sul territorio nazionale. Normalmente la fase di allevamento si fermerebbe prima, intorno ai 100-110 chilogrammi, portando all'ottenimento del cosiddetto suino leggero le cui carni vengono destinate al consumo diretto anziché alla trasformazione in salumi.

L'evoluzione del comparto suino e l'introduzione di tecnologie innovative ha portato a veri e propri "allevamenti industrializzati", che possono comprendere la fase riproduttiva (ciclo chiuso) oppure che si rivolgono al mercato per l'acquisto dei suinetti da ingrassare (ciclo aperto). Questi ultimi sono sorti soprattutto a partire dal dopoguerra, annessi ai caseifici di trasformazione del latte, al fine di sfruttare nella razione alimentare il siero che rimane dopo la caseificazione, alimento ancora ricco di numerose sostanze nutritive e che diversamente dovrebbe essere smaltito, perché molto inquinante, accrescendo i costi di trasformazione del latte.

Questo lavoro si pone come primo obiettivo di esaminare l'evoluzione del comparto suino in Italia sino ad oggi, a cui seguirà l'esame della gestione economica di un allevamento suino nella fase di transizione da un sistema a ciclo semiaperto a quello di tipo chiuso, che comprende tutte le fasi produttive al suo interno, per meglio affrontare le difficoltà legate agli andamenti congiunturali di costi e prezzi spesso poco soddisfacenti per i produttori. L'analisi delle situazioni ante e post intervento fornirà gli alimenti necessari alla valutazione della convenienza economica della strategia imprenditoriale.

2. ANALISI DEL COMPARTO ZOOTECNICO SUINO IN ITALIA

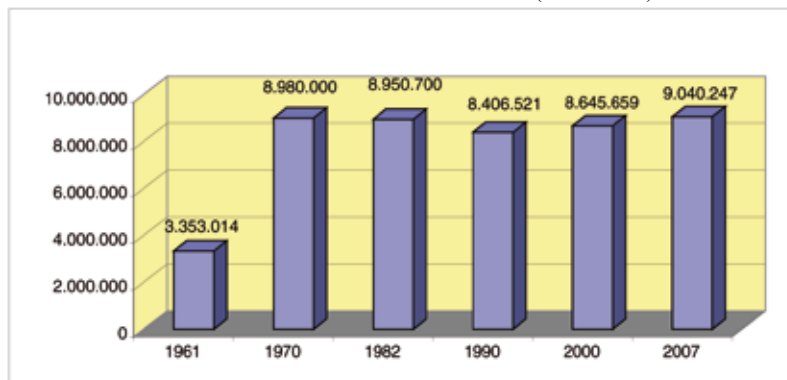
Il comparto suinicolo in Italia incide per circa il 17% sul valore della produzione zootecnica e per circa il 5% su quello dell'agricoltura nel suo complesso, attestandosi ad oltre 2,3 miliardi di euro, con circa 130 mila addetti impiegati a tempo pieno. Il patrimonio di suini allevati in Italia nel 2008 ha sfiorato 9,3 milioni di capi, superando di poco il livello dell'anno precedente. Il settore industriale ha generato un fatturato, comprensivo di carni suine fresche e salumi, superiore a 9 miliardi di euro con un'incidenza sul fatturato totale dell'industria alimentare prossima all'8%. Nel 2008 sono stati avviati alla macellazione circa 13,6 milioni di capi (+0,4% rispetto al 2007). Circa il 66% di questi ultimi, pari a quasi 9,1 milioni di capi, è stato destinato all'interno del circuito dei prosciutti Dop (5).

Esaminando più in particolare l'evoluzione della consistenza del patrimonio suino nazionale si osserva che il numero degli animali allevati in Italia è rimasto in questi ultimi anni piuttosto stabile. Se si prendono in esame le rilevazioni effettuate

nel corso dei censimenti generali dell'agricoltura e i dati campionari raccolti dall'Istat nel 2007, si rileva un forte aumento del numero dei capi allevati nel primo decennio del periodo considerato, nel quale i capi suini passano da circa 3,3 milioni del 1961 a quasi 9 milioni nel 1970, con un incremento di circa 3 volte il numero iniziale (12,13). Dal 1970 invece, il numero dei suini rimane piuttosto costante, salvo far registrare una lieve flessione nel 1990 per poi ricominciare ad aumentare nel 2000, fino a tornare ai 9 milioni di capi allevati nel 2007 (Grafico 1). Il dato appena descritto potrebbe trarre in inganno e mostrare un settore che si è mantenuto stabile nel corso degli anni. In realtà se si considera anche la variazione del numero delle aziende nel medesimo periodo si osserva che il comparto suinicolo è stato interessato da una forte contrazione del numero di queste, che sono passate da circa 1 milione nel 1961 a poco più di 100.000 nel 2007, con un fenomeno di chiusura abbastanza costante che riguarda tutto il periodo considerato. Ciò si spiega ricordando che i censimenti raccolgono la presenza di tutti gli animali allevati, anche quelli delle aziende agricole che nel primo dopoguerra usavano allevare suini per il consumo familiare.

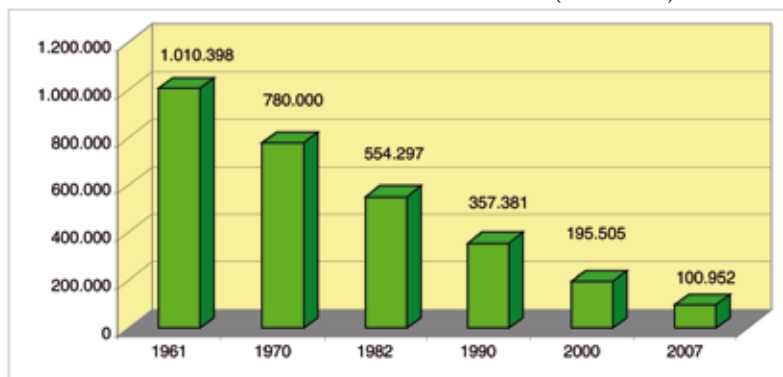
Si osserva infatti che nel 1961 circa il 50% dei capi suini era allevato in ben 971 mila aziende (corrispondenti al 96% del totale delle imprese) con un numero di suini per unità produttiva inferiore a 10. La classe dimensionale più grande censita era quella con oltre 200 capi, con 1.369 aziende su un totale di oltre 1 milione di aziende. E' aumentato dunque il numero medio di suini per singola azienda come mostra il grafico 3 passando da 3 a 90 nell'arco dei quasi 50 anni considerati.

Grafico 1 - Variazione del numero dei suini in Italia (1961-2007)



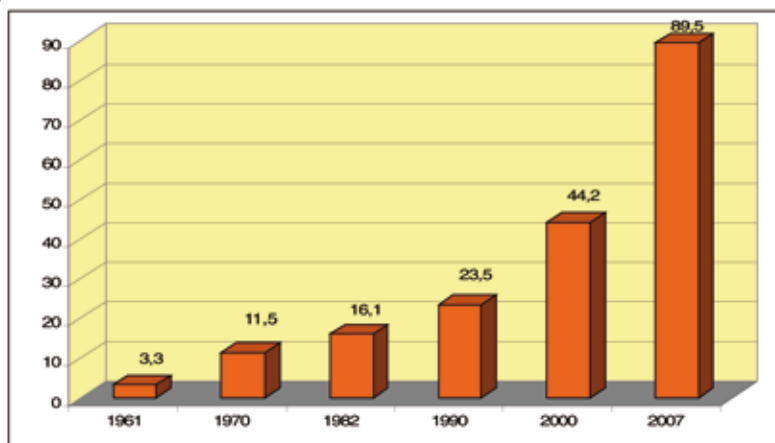
Fonte: Istat

Grafico 2 - Variazione delle aziende con suini in Italia (1961-2007)



Fonte:Istat

Grafico 3 - Variazione della dimensione media degli allevamenti suini in Italia (1961-2007)



Fonte:Istat

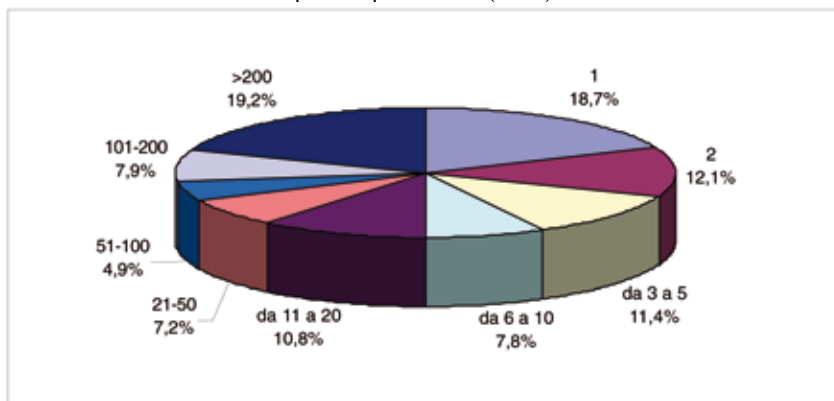
Già molto diversa è la distribuzione dei capi nel 1982, infatti il 57% di questi è allevato in strutture che oltrepassano i 1.000 suini. Il ventennio considerato ha visto molte trasformazioni aziendali con la dismissione di molte imprese familiari e l'aumento delle grandi aziende con più di mille capi, che da sole hanno allevato oltre 5 milioni di suini.

La situazione attuale, aggiornata dai dati Istat del 2007, vede le grandi aziende con oltre 1.000 capi allevati detenere oltre l'85% dell'intero patrimonio nazionale suino in poco meno di 2.000 aziende, anche se sono censite ancora oltre 64.000 aziende che allevano fino a 2 capi e che rappresentano quindi il 64% delle aziende con suini che detengono però solo l'1% dei capi allevati (Grafico 5).

Esaminando la distribuzione a livello regionale del patrimonio suino e delle aziende che allevano suini emerge una forte concentrazione di queste nell'Italia

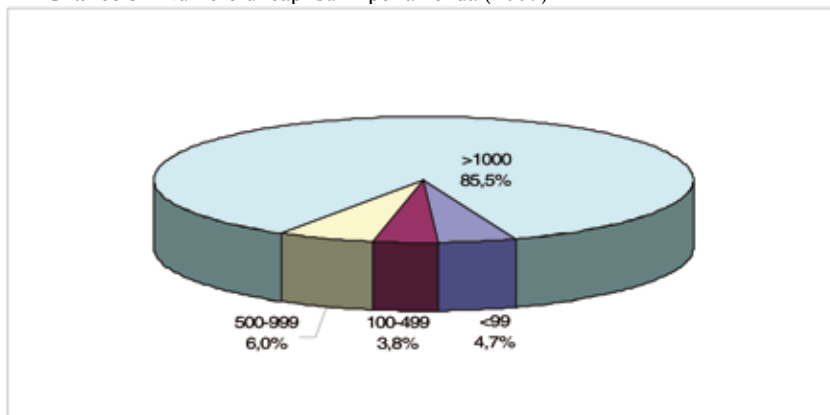
settentrionale, in particolare nelle quattro regioni che sono maggiormente estese: Piemonte, Lombardia, Veneto ed Emilia-Romagna. In queste regioni si concentra circa il 75% dei suini italiani.

Grafico 4 - Numero di capi suini per azienda (1961)



Fonte: Istat

Grafico 5 - Numero di capi suini per azienda (2007)



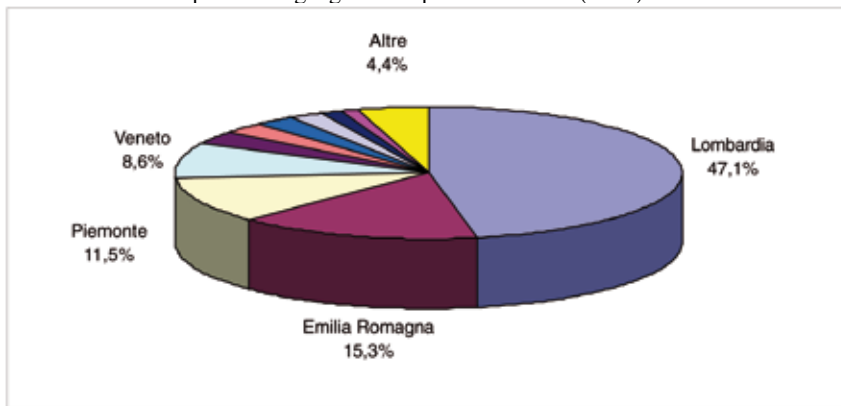
Fonte: Istat

Ben diversa è invece la distribuzione geografica delle aziende con suini che risultano presenti in tutte le regioni d'Italia, non sono infatti concentrate solo nelle quattro regioni citate sopra che comprendono solo il 12% delle strutture che allevano suini. Infatti la dimensione media aziendale è più elevata nelle aziende presenti in Italia settentrionale. Il numero medio di suini allevati per azienda presenta una situazione molto differenziata, con regioni che hanno una dimensione media aziendale molto elevata e altre in cui questa è molto bassa (Tabella 1).

Tabella 1 - Struttura regionale degli allevamenti suini (2005)

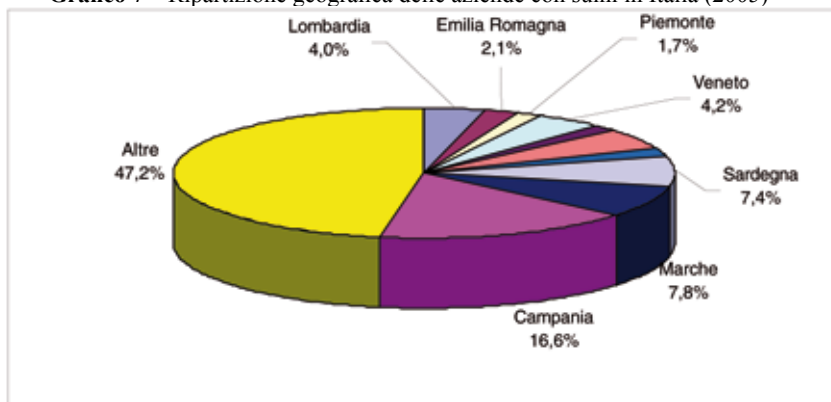
Regioni	Aziende	Capi	Dimensione media aziendale
Lombardia	4.130	4.121.299	997,9
Emilia Romagna	2.191	1.342.878	612,9
Piemonte	1.797	1.010.315	562,2
Veneto	4.298	757.113	176,2
Friuli Venezia G.	1.605	267.283	166,5
Umbria	5.517	233.237	42,3
Toscana	2.011	217.548	108,2
Sardegna	7.636	210.178	27,5
Marche	7.979	111.909	14,0
Campania	17.066	100.389	5,9
Altre	48.551	385.492	7,9
	102.781	8.757.641	85,2

Fonte: Ismea

Grafico 6 - Ripartizione geografica capi suini in Italia (2005)

Fonte: Ismea

Esistono evidentemente due diverse realtà di allevamento presenti nel territorio nazionale, una fatta di allevamenti industriali che producono per l'industria della macellazione e per i salumifici, l'altra legata alle tradizioni del passato che alleva maiali per autoconsumo e in parte per il mercato. E' il caso ad esempio della Campania che ha un numero di capi suini per azienda pari a 6, di gran lunga inferiore al numero di suini presenti in media in un'azienda lombarda che è vicino a 1.000.

Grafico 7 – Ripartizione geografica delle aziende con suini in Italia (2005)

Fonte: Ismea

Esaminando più in dettaglio la tipologia dei capi suini allevati si osserva che circa il 53% di questi è rappresentato dai suini da ingrasso, con peso superiore ai 50 Kg, il 39% dai “magroni” e dai “lattonzoli”, mentre il rimanente 8% circa è rappresentato dai suini da riproduzione. La produzione di carne deriva per il 95% dalla macellazione di suini pesanti (peso medio 163 kg), solo in misura molto inferiore dalla macellazione di magroni e lattonzoli.

Nel complesso, la struttura della suinicoltura italiana risulta allineata alla media dei 27 paesi dell’Ue, dove oltre l’85% delle aziende presenta dimensioni piccolissime e solo nel 2% alleva almeno 100 capi. Occorre però sottolineare che la media europea risulta sensibilmente influenzata, dopo l’allargamento ad Est, da Paesi come l’Ungheria, la Romania e la Polonia che, pur avendo un peso considerevole in termini di unità produttive e capi allevati sul totale Ue, sono caratterizzate da una suinicoltura molto marginale, costituita da aziende di piccolissime dimensioni. In particolare, se si considerano i paesi Ue ad elevata specializzazione, la struttura e l’evoluzione degli allevamenti italiani appare molto simile a quella danese, con circa il 70% dei capi allevati in un numero abbastanza ristretto di aziende di grandissime dimensioni (oltre 500 capi).

3. POLITICHE AGRICOLE COMUNITARIE NEL COMPARTO DEI SUINI

L’attività agricola nei paesi sviluppati è sempre più condizionata dall’intervento pubblico, che interferisce sulle scelte imprenditoriali anche in un’economia di mercato. Nell’Unione Europea (Ue) l’intervento pubblico in agricoltura è regolato dalla politica agricola comunitaria (5).

La revisione di medio termine della Pac, con cui è stato introdotto a partire dal 1° gennaio 2006 il disaccoppiamento totale degli aiuti rispetto alla produzione, ha avuto un impatto poco significativo sul settore suinicolo. Il sostegno al settore deriva, attualmente, solo dall’Ocm delle carni suine (Reg. Ce 2759/75), che oltre a comprendere la classificazione comunitaria dei prodotti considerati, disciplina il regime dei prezzi e degli scambi con i Paesi Terzi e contiene disposizioni generali

relative alle misure eccezionali di sostegno ai mercati e al comitato di gestione per le carni suine.

I prodotti disciplinati sono gli animali vivi diversi dai riproduttori di razza pura e i prodotti derivati dalle carni suine. I punti salienti dell'Ocm riguardano:

- gli interventi a sostegno del mercato, essenzialmente l'ammasso privato, poiché da oltre vent'anni non si applicano ritiri dal mercato da parte degli organismi di intervento pubblici;
- l'adozione di misure intese a promuovere una migliore organizzazione della produzione, della trasformazione, della commercializzazione e della qualità;
- per quanto riguarda gli scambi con i Paesi Terzi non esistono impedimenti all'importazione di carni suine; solo in casi di destabilizzazione del mercato comunitario può essere prevista la riscossione di dazi addizionali all'importazione.

L'influsso della Politica agricola comunitaria sul settore non si esaurisce con la riforma di medio termine appena descritta, ma nel corso degli anni numerose altre regole sono state introdotte per chi svolge attività di allevamento suino nell'ambito dell'Unione Europea.

Dal 2005 è istituito un sistema di identificazione e registrazione dei suini presso la Banca dati nazionale ed è fatto obbligo ai detentori degli animali di tenere un registro aziendale con le informazioni anagrafiche dell'azienda e quelle relative alle movimentazioni degli animali (D.P.R. n. 317/96; Direttive Ce 102/92 e Ce 432/64).

Determinanti ai fini delle scelte aziendali sono state le norme riguardanti la salute e il benessere dei suini in allevamento relativamente a condizioni di stabulazione, requisiti dei ricoveri, tutela animale durante trasporto e macellazione.

La Sau rappresenta un elemento di struttura aziendale che ha assunto un'importanza crescente con l'applicazione della Direttiva nitrati (Direttiva Ce 676/91, applicata in Italia con decreto Mipaf 7/4/2006). Nelle aree più critiche, rappresentate da alcune province della Lombardia e dell'Emilia, in cui il carico di bestiame ad ettaro è particolarmente elevato, è interessante osservare come le zone vulnerabili, individuate dalle Regioni, abbiano una incidenza notevole. Questo obbliga le aziende a smaltire le deiezioni al di fuori dell'azienda (anche a notevole distanza) o a dotarsi di impianti idonei per il trattamento dei reflui e costituisce un elemento vincolante all'espansione o anche al mantenimento degli allevamenti in queste aree.

Tabella 2 – SAU vulnerabile nelle principali province con allevamenti suini

Province	Sau vulnerabile su totale sau (%)	Numero di suini allevati (migliaia)
Mantova	100	1.260
Brescia	98	1.171
Cremona	60	785
Reggio Emilia	59	384
Parma	53	167

Fonte: Ismea

Dunque si osserva che nelle 2 province lombarde dove si oltrepassa il milione di suini allevati, la superficie disponibile per gli spandimenti è tutta vulnerabile, con una capacità di ricezione dei liquami che è esattamente la metà rispetto a quella non vulnerabile (170 kg di azoto per ettaro anziché 340 kg). La richiesta di terra da destinare agli spandimenti ha creato un mercato di concessione d'uso per lo spandimento dei reflui ed ha generato negli anni anche un aumento dei valori fondiari.

4. TIPOLOGIA DEGLI ALLEVAMENTI

Per quanto concerne le tipologie degli allevamenti di suini in Italia è possibile individuare una prima distinzione in allevamenti intensivi ed estensivi. Tra i primi in particolare si distinguono:

- allevamenti a ciclo aperto da riproduzione, in cui sono presenti le scrofe e si allevano i lattinzoli sino ad un peso che può variare da 30 a 80 kg, da immettere nella successiva fase di ingrasso. E' presente soprattutto in Lombardia, ma anche in Emilia Romagna, Toscana, Umbria, Campania, Calabria e Sardegna;

- allevamenti a ciclo aperto da ingrasso, in cui il suino allevato può essere destinato alla produzione di carne fresca da consumo (leggero, 90-115 Kg) e di prosciutti stagionati (pesante, 156-176 Kg);

- allevamenti a ciclo chiuso, in cui sono realizzate sia la fase di riproduzione (scrofaie) sia quella di ingrasso. Nelle aree a maggiore vocazione (Lombardia, Emilia Romagna e Piemonte) rappresentano circa il 30-35% del totale degli allevamenti, ma sono abbastanza diffusi anche nelle regioni del Centro (Marche e Lazio), del Sud (Campania, Basilicata e Calabria) e, in particolare, costituiscono la tipologia di allevamento prevalente in Sardegna.

L'allevamento estensivo, invece viene praticato soprattutto nelle regioni centromeridionali laddove esiste una maggiore disponibilità di pascoli. Si tratta generalmente di aziende con limitate dimensioni che praticano l'allevamento allo stato brado di razze autoctone come la Casertana, diffusa in Campania e nel basso Lazio, la Cinta senese, presente in Toscana e nella Maremma, la Calabrese, il Nero Siciliano e la Sarda. Le produzioni ottenute, carne fresca o salumi, sono essenzialmente indirizzate ad una nicchia di consumatori e alla ristorazione.

5. IL MERCATO

La produzione nazionale è quasi esclusivamente orientata al suino pesante destinato all'industria di trasformazione (95% circa delle macellazioni) e risulta, quindi, particolarmente deficitaria di animali destinati al consumo fresco. Da questo punto di vista, quindi, l'offerta nazionale è fortemente dipendente dalle dinamiche che interessano i principali mercati di approvvigionamento (Paesi Bassi per i suini vivi, Spagna e Danimarca per le carni fresche e Germania per entrambe le categorie) e risente, indirettamente, anche dell'andamento di mercato delle altre tipologie di carne per l'effetto di sostituzione esistente nella domanda al consumo.

L'Italia è il Paese leader in Europa per numero di salumi Dop e Igp. I suini complessivamente inviati alla macellazione ai fini delle produzioni Dop sono stati nel 2007 oltre 9 milioni. Le macellazioni si sono concentrate per il 44,2% in Lombardia e per il 37% in Emilia Romagna: il record spetta alla provincia di Mantova (con oltre

2,2 milioni di capi macellati), seguita nell'ordine dalle province di Cremona, Modena e Parma.

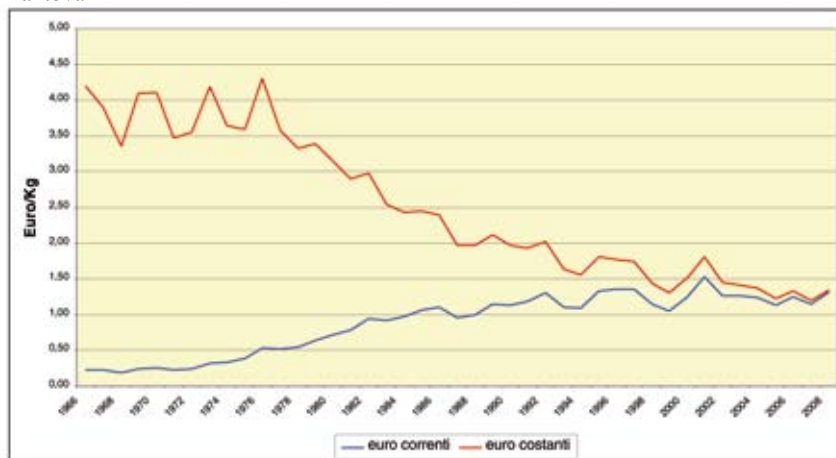
Relativamente alla conduzione degli allevamenti suini con metodo biologico, è da sottolineare che si tratta di una realtà ancora poco diffusa in Italia che interessa solo lo 0,3% delle consistenze nazionali.

Dal 2005 l'offerta nazionale si era arricchita di un nuovo riconoscimento provvisorio della tutela d'origine, il Gran Suino Padano Dop, concesso allo stato italiano, e che costituiva l'unico caso a livello nazionale di attestazione di qualità per le carni fresche suine. La Commissione europea ha però bocciato la proposta con la motivazione che nell'area d'origine, che obbligatoriamente deve contrassegnare una Dop, rientrano suini allevati in 11 regioni italiane tra cui Toscana, Abruzzo e Molise che niente hanno a che vedere con l'aggettivo "Padano".

Per quanto riguarda i flussi in uscita, l'Italia si colloca al secondo posto nel mondo, dopo la Germania, per le esportazioni di carni preparate e salumi con oltre 100 mila tonnellate esportate nel 2007.

Relativamente all'andamento dei prezzi di mercato il 2008 ha fatto registrare la ripresa dei prezzi del suino pesante che ha raggiunto una quotazione media annua di 1,31 euro/kg dopo un'annata di crisi recuperando il 16% rispetto all'anno precedente. Il 2007 infatti aveva visto il trend dei prezzi all'origine dei suini da macellazione in forte calo. In particolare, per il comparto dei suini destinati al macello si evidenziava una diminuzione di oltre 8 punti percentuali dei prezzi rispetto al 2006, a conferma della crisi ormai strutturale che caratterizza il settore. Le quotazioni avevano raggiunto i livelli di crisi del 2005, con il suino da macello mediamente quotato a 1,12 €/kg. Il prezzo dei lattonzoli, invece, era rimasto abbastanza stabile intorno ai 2 €/kg. Il fatturato della macellazione nel 2008 è risultato in ripresa dell'11% rispetto al 2007 con un andamento differenziato tra i diversi tagli: i rialzi più consistenti hanno interessato i tagli grassi come pancette, lardo e gola, mentre per i prosciutti la ripresa è risultata più contenuta (6%) soprattutto se si tiene conto delle quotazioni molto basse del 2007. Per meglio capire il momento di crisi che sta vivendo il settore suinicolo italiano, abbiamo analizzato l'andamento del prezzo del suino pesante rilevato dalla Borsa Merci della Camera di Commercio di Mantova dal 1966 al 2008 (Grafico 8).

Grafico 8 – Evoluzione del prezzo dei suini pesanti (160-180 kg) rilevati nella piazza di Mantova



Fonte: Camera di Commercio di Mantova

Si osserva un trend di crescita dei prezzi correnti, salvo oscillazioni congiunturali, fino al 2002, quando inizia un'inversione di tendenza. La linea dei prezzi ad euro costanti 2009 mostra invece come ci sia stata una relativa stabilità nel primo decennio considerato, dopo il quale inizia una costante diminuzione del prezzo in termini reali per il produttore.

6. ANALISI DI UN CASO AZIENDALE

6. 1. Descrizione dell'azienda

L'Azienda agricola presa in esame è un allevamento suinicolo a ciclo semiaperto per la produzione del suino pesante (160-170 kg), secondo il disciplinare del Consorzio del Prosciutto di Parma e San Daniele. L'azienda è situata in provincia di Rovigo, sulle sponde del fiume Po, nel mezzo della Pianura Padana, a sud della regione Veneto.

La superficie aziendale è pari a circa 32 ettari, coltivati a mais e ad orzo, entrambi utilizzati per l'alimentazione dei suini. I terreni non servono soltanto per la coltivazione cerealicola, ma sono parte della superficie necessaria per lo smaltimento dei reflui zootecnici. Parte dei terreni da utilizzare per lo spandimento dei reflui viene concessa gratuitamente all'azienda agricoltori della zona, grazie ad accordi amichevoli.

6. 2. Caratteristiche strutturali dell'allevamento

L'azienda è divisa in due settori: riproduzione-svezzamento e magronaggio-ingrasso. Il settore riproduzione riguarda, per ora, 80 scrofe in produzione, suddiviso in due capannoni: gestazione-sale parto e svezzamento, e 3 verri. L'azienda sta completando l'ampliamento dei due capannoni già esistenti e la costruzione di un terzo per giungere ad ospitare un numero di circa 250 scrofe e poter effettuare un

miglior controllo delle gestazioni, dei calori delle scrofette e dello svezzamento. Il settore magronaggio-ingrasso è composto da 5 capannoni per un totale di circa 3.000 suini, suddivisi secondo il livello di crescita degli stessi. La pavimentazione dei box è costituita da grigliato mentre quella nel capannone con le gabbie gestazione è per metà grigliato e per metà piena.

La ventilazione nei capannoni con box collettivi e con gabbie gestazione è naturale durante le mezze stagioni e d'inverno. E' forzata con cooling in estate nel capannone con gabbie gestazione. La ventilazione è sempre forzata nelle sale parto. Il controllo della temperatura e dell'umidità è gestito e regolato automaticamente da centraline elettroniche poste fuori da ogni capannone che, secondo la necessità, aprono o chiudono le finestre e aumentano o diminuiscono la velocità dei ventilatori. Considerando che il numero di suini nati e svezzati non riesce ancora a coprire il numero di suini pesanti necessari a concludere il ciclo si provvede più volte all'acquisto di suinetti provenienti da altri allevamenti selezionati.

L'azienda è composta da 3 unità di lavoro familiari che lavorano a tempo pieno in azienda, con consulenza settimanale del veterinario. Tutti si dividono i vari compiti che comprendono la gestione e il controllo della scrofaia, il settore magronaggio-ingrasso, la coltivazione cerealicola, la produzione propria di mangimi e nuclei e lo spandimento dei liquami.

La produzione delle scrofette è aziendale. L'incrocio effettuato è un tre vie Large White per Landrace per l'ottenimento di scrofette F1 coperte con verro Duroc (aziendale). Si acquista in centri genetici solamente il seme Landrace. Per una miglior efficienza riproduttiva delle scrofette spesso si attua la sincronizzazione degli estri e sempre si procede con la fecondazione artificiale. Dopo 40 giorni dall'intervento fecondativo vengono eseguite le ecografie grazie all'ecografo aziendale, per verificare le effettive gravidanze.

Le materie prime prodotte in azienda, mais e orzo, saturano solo in parte il fabbisogno totale della razione. La parte rimanente, che comprende tra gli altri soia e crusca, viene acquistata da aziende agricole limitrofe con le quali si è potuto stipulare un programma comune di coltivazione e raccolta del prodotto.

Le fonti proteiche utilizzate sono farina di soia tostata 44 e farina di aringa (solo per la formulazione di mangimi per suinetti), acquistate insieme alle restanti integrazioni (erba medica, lievito di birra, pannello di lino, ecc.) da enti o ditte specializzate nell'alimentazione zootecnica. Tutte le formulazioni di mangimi sono integrate da sali minerali, vitamine e amminoacidi di sintesi in base alle esigenze nutrizionali di ogni gruppo.

Il mangimificio aziendale è composto da un sistema di stoccaggio, macinazione, dosaggio e distribuzione dei componenti l'alimentazione. Il sistema di stoccaggio è costituito silos verticali per il mais secco e per l'orzo, mentre per il mais pastone sono presenti silos orizzontali.

6. 3. Analisi economica

L'analisi dell'efficienza aziendale risulta indispensabile per la conoscenza della redditività, al fine di attuare le conseguenti scelte imprenditoriali.

L'analisi parte dall'utilizzazione dei dati del bilancio economico dell'azienda

relativi al 2008, finalizzati alla determinazione del reddito netto e del costo di produzione della carne nel ciclo semichiuso. Successivamente si metterà a punto un bilancio di previsione per quando l'azienda avrà completato la chiusura del ciclo. Dal confronto dei risultati sarà possibile valutare eventuali benefici economici derivanti dalle scelte imprenditoriali attuate.

Esistono varie metodologie per la rilevazione e rielaborazione dei dati contabili, ma la più completa è quella della contabilità analitica, in grado di differenziare sia i ricavi che i costi specifici del processo produttivo (1, 3). Il caso oggetto di studio risulta facilitato dal fatto che siamo di fronte ad un'azienda che ottiene una sola produzione e dunque il costo di produzione della singola attività coincide col costo di produzione totale dell'azienda. Infatti in quest'azienda pur essendo presenti oltre all'attività zootecnica di produzione di carne suina, anche colture vegetali di mais ed orzo, queste, come già detto, non vengono poste in vendita, bensì utilizzate come beni intermedi all'interno della razione alimentare (4). Dunque il costo di produzione di queste colture concorre ad originare il costo di produzione della carne.

6.3.1 Produzione Lorda Vendibile

L'analisi economica comincia con la Produzione Lorda Vendibile (Plv) che è la parte attiva del Bilancio economico dell'azienda agraria e coincide con i ricavi realizzati nel corso dell'anno. L'entità della Plv di un'azienda dipende da due componenti, la quantità prodotta ed il prezzo di vendita. Occorre dunque, per ottenere il risultato più elevato possibile cercare di massimizzare entrambi gli elementi. Nel nostro caso siamo di fronte ad aziende ad indirizzo produttivo zootecnico che vende suini da macello pesanti che entrano nella filiera di lavorazione dei prosciutti Dop italiani. Il prezzo di questa tipologia di suino da macello ha avuto nel corso del 2008 un andamento in crescita e di conseguenza anche gli importi di vendita realizzati dall'azienda si sono incrementati. Infatti l'azienda effettua vendite di lotti di suini omogenei e con cadenza costante nel corso dell'annata e di conseguenza è esposta totalmente a quelle che sono le fluttuazioni dei prezzi di mercato.

La Produzione Lorda Vendibile corrisponde alla somma dell'Utile lordo stalla (ULs), del saldo magazzini e degli altri ricavi. L'Utile lordo stalla è un bilancio parziale suddiviso in una parte attiva e una parte passiva: la prima è costituita dal patrimonio finale di stalla e dai capi venduti, la seconda dal patrimonio animale iniziale e dagli acquisti di bestiame effettuati nel corso dell'anno. Riguardo agli altri ricavi, questi sono rappresentati per lo più dai contributi comunitari. A questo riguardo dobbiamo ricordare che le componenti che dovrebbero far parte della produzione lorda vendibile dovrebbero essere tutti i prodotti ottenuti, eccetto quelli reimpiegati in azienda; non ci sarebbe spazio dunque per i premi derivanti dall'Ue. Non dobbiamo però dimenticare che questi aiuti intendono, da parte dell'Unione, sostituire la graduale abolizione degli strumenti di sostegno del prezzo.

Tabella 3 - Utile Lordo Stalla

Descrizione	Categoria	Numero	Peso medio (kg)	Peso totale (kg)	Valore medio/ capo (€)	Valore totale (€)
Consistenza al 01/01/08	Grassi	1.295	139,9	181.185	154,6	200.201
	Magroni	1.187	61,1	72.470	100,7	119.560
	Suinetti	36	14,4	520	40,3	1.452
	Scrofe	62	180	11.160	700	43.400
	Verri	2	180	360	700	1.400
	Totale		2.581		265.495	
Consistenza al 31/12/08	Grassi	946	131,5	124.390	153,2	144.905
	Magroni	1.686	59,3	99.910	99,0	166.855
	Suinetti	342	16,1	5.490	47,5	16.235
	Scrofe	78	210	16.380	700	54.600
	Verri	3	200	600	700	2.100
	Totale		3.054		246.770	
Vendite	suini	3.771	166,2	626.833		843.671
	a vista	144	150	21.600		21.360
	Totale	3.915		648.433		865.031
Acquisti	suinetti	3.407	43,2	147.047		258.707
ULS (€)			625.006			
Carne prodotta (Kg)			482.461			
Consumo mangime (Kg)			1.935.780			
Resa (%)			24,92			

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

Tabella 4 - Produzione Lorda Vendibile

Produzioni aziendali	Euro
U.L.S.	625.006
Saldo magazzini	26.527
Altro	13.559
Produzione lorda vendibile	665.092

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

Come è possibile vedere nella Tabella 3, il patrimonio finale di stalla, rilevato al 31 Dicembre 2008, ammonta a 384.695 euro, mentre il ricavo lordo finale ottenuto dalla vendita dei suini è pari a 865.031 euro. A tali valori devono essere detratte per prime le spese per gli acquisti di animali, pari a 258.707 euro, e il valore del patrimonio animale all'inizio dell'anno, che era di 366.013 euro. Il risultato finale è un Utile lordo stalla pari a 625.006 euro.

Dall'analisi dell'Uls è stato possibile ricavare anche il totale di carne prodotta che è pari a Kg 482.461. Conoscendo i chilogrammi totali di carne prodotta e il

consumo totale di mangimi di 1935,78 tonnellate è possibile ricavare la resa di carne in percentuale. La resa in carne per l'anno 2008 è stata del 24,92%, in pratica per ottenere 1 kg di carne sono stati necessari 4 kg di mangime.

Aggiungendo all'Uls il saldo magazzini e gli altri ricavi si ottiene il dato complessivo della Produzione Lorda Vendibile, che è pari a 665.092 euro (Tabella 4).

6.3.2 Spese di reintegrazione

Le spese di reintegrazione rappresentano nel bilancio economico ciò che è stato consumato in azienda per realizzare il processo produttivo. Fanno parte delle spese di reintegrazione:

- *Le spese per l'acquisto del capitale tecnico circolante*, ovvero quei beni che vengono definiti anche a fecondità semplice, in quanto esauriscono la loro funzionalità produttiva in un solo ciclo produttivo: sementi, concimi, presidi sanitari, alimenti e lettimi, carburanti e lubrificanti, ecc.

- *Le quote d'uso dei capitali tecnici fissi*. Sono le spese sostenute per l'utilizzo dei capitali tecnici fissi, detti anche a fecondità ripetuta in quanto la loro durata economica è superiore all'anno; comprendono le quote di ammortamento, manutenzione e assicurazione.

Le spese di reintegrazione, sono pari a 511.832 euro e rappresentano il 76,9% della produzione lorda dell'azienda. Sono dunque la componente di spesa più importante che si è accresciuta molto in questi anni, in quanto con l'intensificazione produttiva è aumentata la spesa per l'acquisto di mezzi produttivi e la quota di risorse destinata agli ammortamenti di strutture e mezzi tecnici in grado di aumentare la produttività.

Passando ora ad analizzare più in dettaglio alcune componenti specifiche delle spese di reintegrazione abbiamo soffermato la nostra attenzione sulle spese relative alle colture, su quelle riguardanti l'allevamento, su quelle derivanti dall'utilizzo delle macchine, sulle spese generali, e poi da ultimo abbiamo considerato le quote d'ammortamento. L'entità di queste ultime infatti è un indice importante dello stato di sviluppo di un'azienda.

Relativamente alle spese specifiche per le colture vegetali si osserva la loro modesta consistenza con poco più dell'1,5% della Plv, essendo relative al solo acquisto delle sementi e dei prodotti fitosanitari necessari per la protezione da infestanti e fitofagi.

Anche le spese specifiche per l'utilizzo delle macchine e le spese generali hanno avuto una incidenza relativamente bassa e sono state pari a rispettivamente al 3% ed al 3,2% della Plv aziendale.

Le spese relative alle produzioni animali, come era logico aspettarsi, rappresentano da sole il 61% della Plv. Tra queste troviamo infatti le spese relative all'acquisto di mangimi e integratori che da sole rappresentano il 57,3% della Plv e dimostrano come l'allevamento suinicolo dipenda dal mercato per l'approvvigionamento degli alimenti. Questo è vero anche se, come si è detto, questo allevamento destina tutti i terreni in suo possesso alla coltivazione di mais e orzo le cui produzioni sono utilizzate come componenti della razione alimentare per i suini.

Altro elemento da considerare nell'analisi delle spese di reintegrazione sono le quote relative all'impiego dei capitali fissi. In particolare gli ammortamenti rappresentano il 7,4% della Plv a conferma della strategia di questa azienda che sta completando la costruzione dei reparti relativi alla fase di riproduzione, al fine di portare l'azienda a ciclo chiuso ed evitare la dipendenza dal mercato per l'acquisto dei suinetti da ingrassare. Inoltre anche la parte di allevamento destinata alla fase di ingrasso è stata da poco dotata di attrezzature per l'alimentazione computerizzata che hanno consentito un notevole risparmio in termini di manodopera per la gestione aziendale.

Tabella 5 - Spese di reintegrazione

Spese specifiche per le produzioni vegetali		10.035
Sementi	4.730	
Presidi sanitari	5.305	
Spese specifiche per le produzioni animali		405.543
Mangimi e integratori	381.181	
Presidi sanitari	21.718	
Altre spese	2.644	
Spese specifiche per l'esercizio delle macchine		20.063
Carburanti e lubrificanti	20.063	
Spese generali		21.473
Quote		54.718
Ammortamento	49.253	
Manutenzione	4.034	
Assicurazione	1.431	
Spese di reintegrazione		511.832

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

6.3.3 Prodotto netto

Il prodotto netto si ottiene sottraendo dalla Plv le spese di reintegrazione, e i servizi extraziendali e corrisponde alla nuova ricchezza prodotta nel ciclo di produzione. Serve a compensare i fattori produttivi impiegati in azienda (terra, capitale e lavoro) e l'imprenditore per la sua attività d'impresa.

Il prodotto netto può essere suddiviso tra prodotto netto in senso lato e in senso stretto. Il primo è ottenuto dalla differenza tra produzione lorda vendibile e spese di reintegrazione. Il secondo, invece, si ottiene sottraendo anche le spese per i servizi extraziendali. Questi ultimi sono rappresentati per quest'azienda dal lavoro del veterinario e dalle operazioni di trebbiatura dei cereali effettuate da contoterzisti. Inoltre significativo è anche il pagamento di imposte e contributi relativi al lavoro della famiglia imprenditrice che complessivamente rappresentano il 6,7% della Plv.

Tabella 6 - Prodotto Netto

Produzione lorda vendibile		665.092
Spese di reintegrazione		511.832
Prodotto Netto (senso lato)		153.260
Prestazioni professionali	5.831	
Noleggi	4.368	
Imposte e contributi	44.689	
Spese servizi extraziendali		54.888
Prodotto Netto (senso stretto)		98.372

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

6.3.4 Reddito Netto

Il reddito netto è ricavato sottraendo al prodotto netto in senso stretto le spese per i compensi relativi ai fattori di produzione non propri utilizzati nel processo produttivo (affitti relativi per terreni presi in locazione, salari pagati ai prestatori di manodopera, interessi sui capitali presi a prestito dagli Istituti di credito). L'azienda presa in esame è a conduzione familiare, e non ha spese per affitti o interessi, in quanto è tutta in proprietà, perciò il reddito netto equivale al prodotto netto.

Il reddito netto che si ottiene sembra essere abbastanza soddisfacente anche se non in grado di compensare appieno i fattori posti dall'imprenditore e dai suoi familiari nel ciclo di produzione: la terra di proprietà, i capitali dell'imprenditore, e tutto il lavoro (3 unità di lavoro familiare).

Recentemente sono state introdotte innovazioni tecnologiche che hanno migliorato e automatizzato la distribuzione degli alimenti nel settore ingrasso, portando sia ad un miglioramento negli accrescimenti giornalieri degli animali per un più corretto e preciso razionamento, che ad un risparmio in termini di manodopera per queste operazioni, con un più proficuo utilizzo di questa in altri settori dell'azienda.

6.3.5 Costo di produzione della carne

Dopo aver calcolato la produzione lorda vendibile e aver ricavato il reddito netto dell'azienda è possibile calcolare il costo di produzione della carne, che si ottiene considerando sia i costi espliciti che quelli impliciti. Nell'unità produttiva considerata l'operazione risulta particolarmente facilitata in quanto la produzione aziendale è unica, e anche le produzioni vegetali sono utilizzate come bene intermedio nell'alimentazione dei suini. Non diventa dunque necessario procedere alla suddivisione dei costi congiunti in quanto tutti i costi sia quelli specifici che quelli generali concorrono alla realizzazione della produzione di carne suina (6).

I costi espliciti sono rappresentati dalle spese di reintegrazione (tutte le spese effettuate per l'ottenimento delle produzioni animali e vegetali e le quote per l'uso dei capitali tecnici fissi), più le spese per i servizi extraziendali. Si determinano dalla rilevazione della contabilità aziendale o, se questa non fosse presente, dalla rilevazione di tutti i fatti amministrativi (presa visione di fatture, ricevute di pagamento, cartelle esattoriali, ecc). Corrispondono a tutte le spese realmente sostenute dall'imprenditore per la realizzazione del processo produttivo e sono pari a 566.720 euro (7).

La determinazione dei costi impliciti non è altrettanto semplice come l'individuazione dei costi espliciti appena visti. Infatti mentre questi ultimi vanno ricercati nei dati già esistenti, i primi devono essere calcolati sulla base delle quantità di fattori apportati dall'imprenditore e dalla sua famiglia nel ciclo di produzione. Il compenso ai fattori viene determinato sulla base dei prezzi di mercato per impieghi alternativi e concorrenti (9).

Tabella 7 - Costi impliciti

- Terra	
- Superficie in proprietà (ha)	29
- Compenso per ettaro	600
- Compenso complessivo	17.400
- Miglioramenti fondiari	
- Valore	641.748
- Saggio d'interesse (%)	1%
- Compenso complessivo	6.417
- Capitale agrario	
- Valore	667.364
- Saggio d'interesse (%)	2%
- Compenso complessivo	13.347
- Lavoro familiare	
- Unità lavoratrici (n)	3 (ore 6.900)
- Compenso unitario	12
- Compenso complessivo	82.800
Costi impliciti	119.965

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

Il compenso da attribuire alla terra in proprietà viene determinato analizzando i contratti di affitto di terreni simili per caratteristiche produttive a quelli oggetto di studio. Si calcola un compenso medio per ettaro che verrà utilizzato per determinare il compenso relativo ai terreni di proprietà dell'impresa.

Per quanto riguarda il compenso relativo ai capitali investiti in azienda sotto forma di miglioramenti fondiari e capitale agrario, sono stati considerati investimenti analoghi per rischiosità. In particolare si è stabilito di considerare un tasso dell'1% per i miglioramenti fondiari, considerata la loro natura molto sicura, e del 2% per il capitale agrario, che comprende il bestiame, le scorte morte e il capitale di anticipazione, considerati come investimenti a rischio più elevato. I tassi sono comunque molto bassi e tengono conto del rendimento attuale del denaro sul mercato finanziario.

Infine per la remunerazione del lavoro familiare, conoscendo il numero di ore

lavorate in azienda dall'imprenditore e dai membri della sua famiglia, è necessario determinare il compenso orario da attribuire. Il calcolo viene effettuato sulla base dei salari dei lavoratori dipendenti a tempo indeterminato, sottratti degli oneri fiscali e contributivi; infatti per la manodopera familiare, questi costi sono già inclusi alla voce imposte e contributi dei costi espliciti (8, 10).

Il totale dei costi impliciti così calcolati risulta pari a 119.965 euro. Sommando i costi espliciti con quelli impliciti si ottiene il costo totale dell'azienda che è pari a 703.658 euro, che corrisponde al costo di produzione totale della carne.

Per avere il costo di produzione unitario di un chilogrammo di carne, è necessario dividere il costo totale per la quantità di carne prodotta che è pari a 482.461 chilogrammi. Il risultato ottenuto è di 1,46 euro/kg.

Tabella 8 - Costo di produzione carne suina

Costo totale azienda	Euro
Costi espliciti	583.693
Costi impliciti	119.965
Totale	703.658
Costo di produzione della carne	
Costo totale (€)	703.658
Carne prodotta (Kg)	482.461
Costo unitario (€/Kg)	1,46
Spesa per mangime utilizzato euro (€)	
Mangime utilizzato (ton)	1935,78
Spesa unitaria mangime (€/kg di carne)	0,79
Resa mangime	24,92
Prezzo medio percepito vendita suini (€ /kg di carne)	1,33
Perdita (€/kg di carne)	0,13

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

Nella Tabella 8 è indicato anche il prezzo medio percepito nel 2008 dalla vendita dei suini che è risultato pari a 1,33 euro/kg. Si evidenzia una perdita di 13 centesimi per chilogrammo di carne prodotta, risultato che non deve destare troppe preoccupazioni in quanto nel costo di produzione della carne sono state considerate tutte le componenti di spesa inclusi i costi impliciti, calcolati sulla base dei prezzi di mercato per impieghi alternativi e concorrenti, al fine di poter remunerare i fattori della produzione immessi dall'imprenditore nel ciclo di produzione. Se il risultato di gestione avesse consentito di raggiungere un prezzo di vendita pari al costo di produzione unitario la remunerazione dei fattori della produzione dell'imprenditore sarebbe completa. Non avendo raggiunto questa parità si determina la non piena soddisfazione dell'imprenditore per quanto riguarda la remunerazione dei suoi fattori di produzione, ma non si originano comunque sofferenze finanziarie e l'impresa può considerarsi economicamente sana. L'imprenditore poi dovrà valutare il risultato della

gestione in un periodo di tempo più lungo rispetto al ciclo economico, ed effettuare valutazioni che tengano conto di diverse annate produttive, al fine di eliminare gli effetti congiunturali dei prezzi di mercato.

Tabella 9 – Bilancio di previsione

Produzione lorda vendibile		923.799
Uls	883.713	
saldo magazzini	26.527	
altro	13.559	
Spese capitale circolante		603.653
<i>Spese specifiche per le produzioni vegetali</i>		<i>10.035</i>
sementi	4.730	
presidi sanitari	5.305	
<i>Spese specifiche per le produzioni animali</i>		<i>549.055</i>
mangimi e integratori	513.131	
presidi sanitari	31.924	
altre spese	4.000	
<i>Spese specifiche per l'esercizio delle macchine</i>		<i>20.063</i>
carburanti e lubrificanti	20.063	
<i>Spese generali</i>		<i>24.500</i>
Quote		72.253
<i>ammortamento</i>	64.253	
<i>manutenzione</i>	6.000	
<i>assicurazione</i>	2.000	
Totale spese di reintegrazione		675.906
Prodotto Netto (senso lato)		247.893
Spese servigi extraziendali		58.057
prestazioni professionali	9.000	
noleggi	4.368	
imposte e contributi	44.689	
Prodotto Netto (senso stretto)		189.836
Compensi		24000
affitto	0	
salari	24000	
interessi	0	
Reddito Netto		165.836

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

7. BILANCIO DI PREVISIONE A CICLO CHIUSO

Diventa a questo punto interessante, come si accennava nella premessa, stimare i benefici che deriveranno dal completamento del reparto di riproduzione per la chiusura completa del ciclo di produzione del suino pesante che questa azienda sta ultimando.

Per ottenere il bilancio di previsione abbiamo raccolto le spese già sostenute e quelle previste per la realizzazione dell'intervento. Per quanto riguarda le componenti attive del bilancio le variazioni rispetto a quello del 2008 sono rappresentate sostanzialmente dai minori costi relativi all'acquisto dei suinetti da ingrassare.

L'incremento delle poste negative deriva invece dall'acquisto di un certo numero di scrofe, dai maggiori costi di alimentazione (derivanti dall'incremento del numero dei riproduttori e dai costi relativi all'alimentazione dei suinetti appena nati fino al peso di circa Kg 40), dall'incremento dei costi della gestione riproduttiva e dei costi generali, nonché evidentemente dall'aumento delle quote di ammortamento.

L'azienda, dovrà inoltre ricorrere a un dipendente che collabori per la gestione riproduttiva dell'allevamento ed anche l'attività del veterinario dovrà essere incrementata. Si propone il bilancio di previsione dell'allevamento a ciclo chiuso (Tabella 9) con il reparto riproduttivo completo con circa 250 scrofe in produzione e 4 verri. Si osserva un aumento sostanziale del reddito netto aziendale per effetto dell'incremento dell'Uls come si evidenzia nella Tabella 10.

Tabella 10 - Utile Lordo Stalla

	Categoria	Numero	Peso medio (kg)	Peso totale (kg)	Valore medio/capo(€)	Valore totale (€)
Consistenza iniziale	Grassi	1.295	139,9	181.185	154,6	200.201
	Magroni	1.187	61,1	72.470	100,7	119.560
	Suinetti	36	14,4	520	40,3	1.452
	Scrofe	221	180	39.780	700	154.700
	Verri	3	160	480	700	2.100
	Totale	2.742			294.435	
Consistenza al finale	Grassi	946	131,5	124.390	153,2	144.906
	Magroni	1.686	59,3	99.910	99	166.856
	Suinetti	342	16,1	5.490	47,5	16.235
	Scrofe	250	210	52.500	700	175.000
	Verri	4	200	800	700	2.800
	Totale	3.054			283.090	
Vendite	suini	3.771	166,2	626.833		843.671
	a vista	144	150	21.600		21.360
	Totale	3.915		648.433		865.031
Acquisti	scrofe	12			700	8.400
	verri	1			700	700
	Totale	13				9.100
ULS (€)			883.713			
Totale carne prodotta (Kg)			634.688			
Consumo mangime (kg)			2.525.410			
Resa (%)			25,13			

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

L'Utile lordo stalla di previsione è stato calcolato lasciando invariati gli importi di vendita di suini grassi, in quanto l'allevamento nella situazione ante era già a regime relativamente alla fase di ingrasso. Mancano invece tra le poste negative gli acquisti di suinetti da ingrassare, che nella situazione immaginata derivano tutti dalla riproduzione aziendale. Il patrimonio finale di stalla ammonta a 505.795 euro, mentre il ricavo lordo finale ottenuto dalla vendita dei suini è pari a 865.031 euro. A tali valori devono essere detratte per prime le spese per gli acquisti di riproduttori, pari a 9.100 euro, e il valore del patrimonio animale all'inizio dell'anno, pari a 478.013 euro. Il risultato finale è un'Uls pari a 883.713 euro.

Tabella 11 - Costo di produzione carne suina

Costo totale azienda	Euro
Costi espliciti	732.876
Costi impliciti	125.310
Totale	858.186
Costo di produzione della carne	
Costo totale (€)	858.186
Carne prodotta (Kg)	634.688
Costo unitario (€/Kg)	1,35
Spesa per mangime utilizzato euro (€)	
Mangime utilizzato (ton)	2.525,41
Spesa unitaria mangime (€/kg di carne)	0,81
Resa	0,25
Prezzo medio suini (€ /kg di carne)	1,33
Perdita (€/kg di carne)	0,02

Fonte: Nostra elaborazione su dati aziendali

Il reddito netto del bilancio di previsione risulta superiore a quello ottenuto nel 2008 grazie alle corrette scelte di gestione aziendale che portando l'azienda a ciclo chiuso contribuiranno alla riduzione delle spese relative all'acquisto di animali.

Per valutare il risultato ottenuto dall'azienda è possibile fare un confronto con lo studio del C.R.P.A. (Centro Ricerche Produzioni Animali), che effettua ogni anno analisi economiche su un campione di aziende suinicole della Pianura Padana. Il costo di produzione della carne suina rilevato dal C.R.P.A. nell'anno 2008 è stato mediamente di 1,47 €/kg, 1 centesimo superiore a quello da noi calcolato per l'allevamento analizzato (2). Se poi si considera l'azienda nella condizione ipotetica a ciclo chiuso già terminato, il costo per chilogrammo di carne prodotta risulta essere inferiore di 12 centesimi rispetto a quello risultante dagli allevamenti considerati dallo studio. Il confronto dunque sembra premiare le scelte fatte dall'imprenditore dell'azienda considerata che completando il ciclo dovrebbe minimizzare i costi riducendo la dipendenza dal mercato sia per quanto riguarda l'acquisto degli alimenti che per quanto riguarda l'acquisto dei suinetti da ingrassare.

8. CONCLUSIONI

L'analisi condotta ci porta a trarre alcune conclusioni. La prima è che l'allevamento suino in Italia riveste un ruolo certamente importante nell'economia del territorio, e lo testimoniano i risultati produttivi e la dinamica del suo patrimonio zootecnico che, pur essendo abbastanza stabile in termini complessivi dal 1970 ad oggi, è andato concentrandosi in unità produttive importanti per dimensioni e capi allevati. Inoltre circa il 75% dei suini allevati in Italia sono presenti in quattro regioni dell'Italia settentrionale.

In secondo luogo si evidenzia la specializzazione produttiva della filiera del suino pesante e in particolare delle produzioni Dop che impiegano la gran parte dei capi suini macellati. L'Italia è il Paese leader in Europa per numero di salumi Dop e Igp tutelati. La permanenza all'interno dell'Unione Europea non apporta solo vantaggi (il riconoscimento e la tutela delle nostre produzioni tipiche), ma anche vincoli relativi sia alla tutela ambientale che al rispetto del benessere animale.

Il perdurare della crisi di mercato sostenuta dall'aumento dei costi alimentari ed energetici ha spinto il Governo e le istituzioni ad intervenire e ad istituire presso il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali un tavolo tecnico della filiera suinicola.

L'analisi del caso aziendale ha permesso di verificare l'evoluzione del comparto suinicolo, offrendo dati concreti che spiegano la riduzione del numero degli allevamenti, e lo sviluppo di quelli rimasti. Con l'analisi economica sono stati posti a confronto i ricavi e i costi di produzione del suino pesante italiano. In una prima fase sono stati contrapposti i ricavi e i costi sostenuti ai fini della determinazione del reddito netto aziendale relativo all'annata 2008, per l'azienda considerata. Il risultato è stato positivo e abbastanza soddisfacente anche se deve compensare i numerosi fattori della produzione forniti dall'imprenditore, la terra, i capitali e gran parte del lavoro.

Il calcolo del costo di produzione della carne ha consentito di valutare anche gli apporti di questi fattori produttivi in base ai prezzi di mercato per impieghi alternativi e concorrenti. Il risultato è un costo unitario pari a 1,46 euro/Kg, superiore al prezzo medio di vendita realizzato nel corso del 2008 (1,33 euro/Kg), che genera una perdita di 13 centesimi per chilogrammo che complessivamente rappresenta un mancato reddito che non consente la piena remunerazione dei fattori di produzione. Il confronto con i dati rilevati dal Centro di ricerche e produzioni animali (C.R.P.A.) mostra un risultato produttivo abbastanza analogo. Se poi si considera la situazione ipotetica di chiusura del ciclo produttivo il costo di produzione che si otterrebbe risulta essere inferiore a quello della media degli allevamenti rilevati dall'istituto di ricerca. Ciò grazie agli ultimi investimenti effettuati che consentiranno la chiusura del ciclo di produzione e la automazione dell'alimentazione nelle fasi di ingrasso

Si auspica un ulteriore miglioramento dato che, nel prossimo futuro, l'allevamento dovrebbe assestarsi grazie agli ampliamenti appena compiuti e produrre un numero sempre maggiore di suini da destinare alla vendita. Inoltre le sempre più aggiornate tecniche di fecondazione aiuteranno a ridurre al minimo le perdite di tempo ed accrescere le nascite. E ancora la qualità degli alimenti farà sì che lo sviluppo dei suinetti sia costante e non si producano troppi scarti. Tutte queste condizioni saranno realizzabili se affiancati ad una costante e precisa igiene ambientale, legata ad una corretta pratica manageriale, attenta al benessere degli animali.

In conclusione, la strategia imprenditoriale di passaggio dell'allevamento suino dal ciclo semichiuso a quello chiuso ha messo in evidenza un miglioramento della redditività aziendale con una riduzione dei costi di produzione, in coerenza con le aspettative d'impresa.

Note: Lavoro eseguito con finanziamento FIL (ex quota 60%). Lo studio

è frutto di un lavoro comune degli autori. Tuttavia in sede di stesura del testo A. Salghetti ha redatto i paragrafi 1,3,8; G. Ferri i paragrafi 2,5,7; mentre E. Dolfini ha redatto i paragrafi 4,6.

REFERENCES

1. Bregoli A. (1987). Bilancio e contabilità nell'azienda agraria. Liviana editrice, Padova.
2. De Roest K., Corradini E., Montanari C. (2009). Suinicoltura italiana e costo di produzione, C.R.P.A. Notizie n. N. 2/2009. Tecnograf, Reggio Emilia.
3. Ghelfi R. (2000). Evoluzione delle metodologie di analisi dei costi aziendali in relazione alle innovazioni tecniche ed organizzative. Atti del XXXVII Convegno di studi Sidea "Innovazione e ricerca nell'agricoltura italiana. Bologna.
4. Giacinti R., Tellarini V., Salvini E., Di Iacovo F., Andreoli M., Moruzzo R., Olivieri D. (2002). Analisi e gestione economico-contabile per l'impresa agro-zootecnica. Franco Angeli, Milano.
5. Mariani A., Viganò E. (2002). Il Sistema Agroalimentare dell'Unione Europea. Carocci editore, Roma.
6. Proni G. (1940). Contributo allo studio del costo di produzione in agricoltura. INEA, Roma.
7. Salghetti A., Ferri G. (2005). Metodologia di calcolo del costo di produzione del latte e analisi applicativa su allevamenti convenzionali e biologici. Annali Fac. Med. Vet., Università di Parma, XXV, 247-268.
8. Torquati B. (2003). Economia e gestione dell'impresa agraria. Edagricole, Bologna.
9. Tozzi I. (1995). Il metodo ABC per il calcolo del costo di prodotto. Cisp, Bologna.
10. Zucchi G. (2001). Economia del sistema delle produzioni animali. Avenue media, Bologna.
11. Ismea (2008). Allevamento suino – Report economico finanziario, Roma
12. Istat (1962). Censimenti generali dell'agricoltura (1961, 1970, 1982, 1990, 2000), Roma.
13. Istat (2008). Struttura e produzioni delle aziende agricole, Roma.

ECONOMIC SURVEY OF RACEHORSE BREEDING FARMS *INDAGINE ECONOMICA SUGLI ALLEVAMENTI EQUINI DA COMPETIZIONE*

SALGHETTI Andrea¹, FERRI Giovanni¹, GAMBINO Pietro².

Summary

The equine sector in Italy has undergone a radical reorganisation since the economic boom of the '60s, which led to the replacement of work animals with mechanised equipment.

Over the last few years, there has been renewed interest in horse breeding, thanks to the various different services that these animals are able to provide. In fact, with the rise in income levels and expansion of well-being of the population, there has been increased demand for the use of horses for leisure time and for racing purposes.

The aim of this survey is to gain in-depth knowledge of the structural and economic characteristics of breeding farms for racehorses: trotting, galloping and cutting horses.

The low level of market transparency in the equine sector makes this research particularly topical and interesting, although the difficulty in entering the economic heart of these enterprises is clearly evident.

The results of our research have allowed us to provide an initial approach as regards knowledge of the sector, although the field of observation should be extended in order to obtain more significant data.

Key words: racehorse breeding farms, racing, economy.

1. FINALITÀ E METODOLOGIA

Sino al secondo dopoguerra gli equini rappresentavano la principale fonte di forza lavoro nelle campagne ed in alcuni reparti dell'esercito. Con il boom economico degli Anni '60 la forza lavoro animale viene rapidamente sostituita con le macchine. Di conseguenza il comparto equino ha subito un consistente ridimensionamento, come rilevano i Censimenti generali dell'agricoltura, che è stato più accentuato dopo il primo censimento, per attenuarsi nei decenni successivi, portando la consistenza del patrimonio equino nel 2000 a solo un quarto di quello del 1961 (15).

Negli ultimi anni, secondo una rilevazione campionaria dell'Istat del 2008, abbiamo assistito ad una ripresa di interesse per l'allevamento equino, in funzione delle nuove opportunità di impiego, che riguardano le prestazioni di servizi che questi animali possono offrire.

Sezione di Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma, Via del Taglio 10 – 43126 Parma.

² Laureato in Scienze e Tecniche Equine.

Lo sviluppo economico del paese ha migliorato il livello di benessere della popolazione e allargato la disponibilità di tempo libero, che ha trovato una valvola di sfogo anche nell'utilizzo degli equini. Infatti, le opportunità di impiego degli equini sono le più varie, sia a livello ludico, sportivo che competitivo.

È da queste nuove opportunità d'impiego che il comparto equino può trovare una nuova collocazione nell'economia del Paese, che coinvolge interessi che vanno dall'agricoltura, all'artigianato e alle attività terziarie, movimentando un consistente mercato del lavoro e generando nuovo reddito.

Con tali prospettive si è ritenuto interessante condurre un'indagine sul campo per monitorare le nuove tipologie di allevamenti equini, con particolare riguardo a quelli orientati alle attività competitive: trotto, galoppo e cutting. Alle attività competitive tradizionali (trotto e galoppo) abbiamo voluto affiancare anche una nuova attività competitiva (cutting) tra quelle emergenti, che sono numerose e in via di espansione. In realtà quest'ultima ha poche affinità con le precedenti, ma sono proprio tali differenze che ci sono utili per esplorare nuovi campi di espansione delle attività competitive dei cavalli.

È noto che nel comparto equino vi sono delle difficoltà nella trasparenza del mercato. Pur consapevoli di queste limitazioni abbiamo comunque cercato di affrontare il problema in modo pragmatico, superando l'ostacolo grazie alla collaborazione degli imprenditori responsabili dell'allevamento.

La finalità è stata quella di fare emergere le caratteristiche strutturali e quelle economiche degli allevamenti equini da competizione, nella consapevolezza delle nuove opportunità di intrapresa che questo comparto potrà avere nel prossimo futuro, nella prospettiva di una maggiore trasparenza di mercato.

A tale scopo abbiamo predisposto un questionario specifico per ogni tipologia di allevamento, per la rilevazione delle caratteristiche strutturali dell'azienda, per quanto riguarda gli investimenti nelle strutture, nel parco macchine, ma soprattutto sulla consistenza e cura dei cavalli. Anche la gestione del personale è molto importante, perché strettamente connessa al benessere animale, presupposto importante per ottenere le migliori prestazioni sportive.

Per quanto riguarda la gestione economica, sono state rilevate le componenti attive e passive del bilancio economico, in funzione della tipologia dell'allevamento. Si è potuto così individuare la redditività dell'allevamento ed alcuni indici di bilancio relativamente all'annata agraria 2008.

2. IL PATRIMONIO EQUINO IN ITALIA

La rilevazione del numero di capi equini presenti sul territorio nazionale viene effettuata costantemente da Enti di categoria, che controllano le varie razze o settori appartenenti al comparto equino.

Ma è principalmente l'ISTAT la fonte di informazione che ci consente di conoscere in maniera approfondita e completa il comparto, tramite i Censimenti generali dell'agricoltura, a partire dal 1961 e con scadenza decennale. Siamo infatti partiti dai dati ISTAT per poter tracciare una panoramica sull'evoluzione del numero di capi equini presenti sul territorio nazionale (14, 15, 18, 19).

Dalla tabella e dal grafico si evidenzia la riduzione del numero dei capi

equini negli ultimi decenni sul territorio nazionale, che ha fatto registrare nel 2000 una consistenza pari $\frac{1}{4}$ della consistenza del primo censimento del 1961. La riduzione più consistente si rileva nel primo decennio con un dimezzamento dei capi, successivamente il calo è continuato ancora, ma ad un ritmo via via meno intenso, mentre nella rilevazione campionaria ISTAT del 2008 si è avuta una inversione di tendenza, con una crescita del 16% rispetto al 2000. Ciò rappresenta un segnale importante di un nuovo interesse per l'allevamento equino, in funzione delle nuove opportunità di impiego di questi animali, sia per i cavalli ma anche per gli asini.

Tab. 1 - Dinamica del patrimonio equino in Italia (n)

Anno	Cavalli	Asini	Muli	Totale	(1961=100)
1961	408.350	498.410	334.140	1.240.900	100
1970	271.000	263.000	174.000	708.000	57
1982	273.000	129.000	81.000	483.000	39
1990	316.425	40.817	19.463	376.705	30
2000	287.819	28.913	*	316.732	26
2008	332.496	36.239	*	368.735	30

Fonte: ISTAT; *Censimenti generali dell'agricoltura e rilevazione campionaria (2008)*. *I muli e i bardotti sono inclusi negli asini.

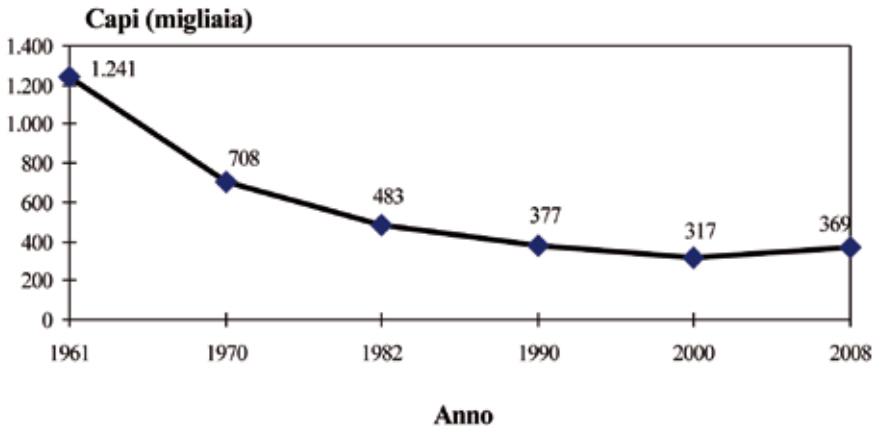
Per analisi più dettagliate del patrimonio equino dobbiamo affidarci ai dati forniti dalle Associazioni di categoria e a quelle di razza, che cercano di promuovere, valorizzare e tutelare le razze equine italiane. La natura volontaristica delle Associazioni ci permette di conoscere solamente i dati sugli allevamenti e sui capi che sono stati iscritti (10, 11, 13, 16, 17).

Le principali Associazioni di categoria sono:

- Associazione Italiana Allevatori (AIA);
- Unione Nazionale Incremento Razze Equine (UNIRE).

All'interno di queste Associazioni di categoria si differenziano le varie Associazioni di razza, che sono numerose ed in continua espansione, perché riguardano anche le razze in via di estinzione e quelle di importazione sempre più diffuse.

Grafico 1 -Evoluzione del patrimonio equino in Italia



Fonte: ISTAT, *Censimenti generali dell'agricoltura e rilevazione campionaria (2008)*

Proprio dall'AIA e dall'UNIRE ci viene la conferma dell'incremento medio annuo del 5% dei cavalli nati e degli allevatori a partire dal 2001, crescita che conferma un'inversione di tendenza nel calo del patrimonio equino, già evidenziata nelle rilevazioni dell'ISTAT (23).

In particolare all'AIA compete la tenuta dei "Libri genealogici" relativi a cinque razze equine, nei quali sono iscritti circa 22.000 capi e 3.000 allevamenti, e del "Registro anagrafico della popolazione a limitata diffusione" relativo a 19 razze, dove sono registrati circa 7.000 capi e 3.000 allevatori (16).

L'UNIRE invece si occupa del Puro sangue inglese, del Trottatore italiano e del Cavallo da sella italiano, per i quali è stato rilevato un percepibile incremento (17).

L'obiettivo comune è rivolto alla valorizzazione e alla tutela delle razze equine italiane, quelle più strettamente legate al territorio e con le quali sarà possibile migliorare l'occupazione e la permanenza in loco degli addetti, quale volano dell'economia a vantaggio anche delle aree difficili e in via di abbandono.

3. FORME DI UTILIZZAZIONE DEGLI EQUINI

I metodi di conduzione di un allevamento equino si sono andati evolvendo negli ultimi decenni in funzione dei diversi orientamenti produttivi e delle nuove richieste del mercato. Il cavallo, ridimensionato dall'attività agricola e da quella industriale perchè sostituito da mezzi meccanici, dopo un declino che sembrava irreversibile, si è ripresentato all'attenzione del Paese con interesse dell'allevamento e del suo impiego nelle più diverse discipline sportive, agonistiche e non agonistiche, e nelle attività ludiche del tempo libero.

Gli equidi possono avere diversi utilizzi, catalogabili con finalità:

- da lavoro
- da carne
- da latte

- da competizione
- per uso militare
- ludico-sportivo
- per riabilitazione

Da lavoro - Possiamo definire gli equidi da lavoro quelli che aiutano l'uomo a svolgere le sue attività lavorative in modo più efficiente e con risparmio di fatica. Oggi, soprattutto nei paesi industrializzati, gli animali non vengono più usati nel lavoro come avveniva in passato. Esistono tuttavia in altri paesi del mondo delle aree rurali dove gli animali, in particolare gli equidi, costituiscono ancora una parte importante e integrante dell'attività lavorativa di tutti i giorni (2, 12).

Anche in Italia non mancano tutt'ora degli esempi: è il caso dei Butteri, che sono i cowboy della Maremma toscana, vi sono poi alcune aziende agricole biologiche e biodinamiche che ritornano all'uso del cavallo nei lavori agricoli, con motivazioni ecologiche ma anche filosofiche.

Da carne- Il passaggio del nostro Paese da un'economia prevalentemente agricola ad una industrializzata ha avuto profonde ripercussioni non solo sul piano etico, morale e del costume, ma anche nelle abitudini alimentari: da una dieta basata sul prevalente consumo di cereali si è diffuso il crescente utilizzo di proteine animali.

L'Italia, nazione che detiene una percentuale alta di consumi di carne equina in Europa, presenta un limitato numero di allevamenti per la produzione di carne equina, pur avendo all'interno del territorio regioni con maggiore o minore percentuale di consumo, legato più alla tradizione alimentare che alla disponibilità produttiva degli allevamenti.

Attualmente siamo dipendenti dall'importazione, che è circa l'80% del fabbisogno di carne e di animali vivi destinati alla macellazione. L'allevamento di equini per la produzione di carne, infatti, viene considerato un sistema svantaggioso in Italia.

Sono pochi gli allevamenti di equini dediti alla sola produzione di carne, trattasi di sistemi di allevamento allo stato brado e semibrado. In ogni caso la produzione di carne equina in Italia deriva principalmente da animali di scarto e a fine carriera che vengono avviati alla macellazione (11, 13, 14, 19).

Da latte- Un lavoro nuovo per un prodotto molto antico, già noto infatti alle popolazioni egizie, l'allevamento di asine per la produzione di latte.

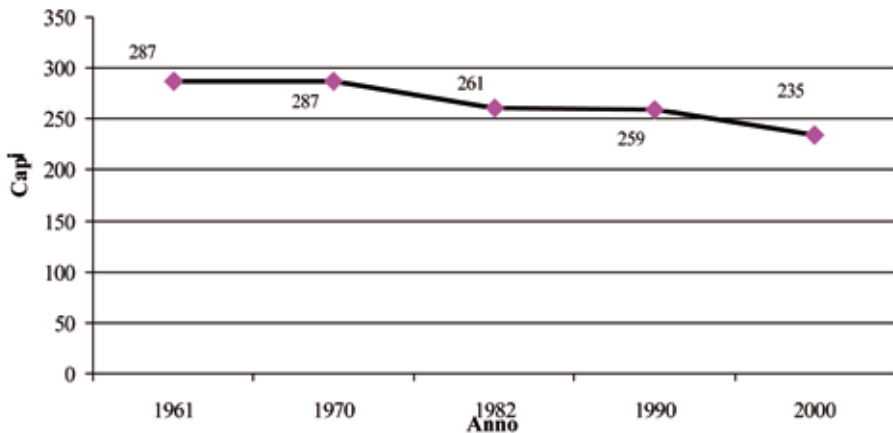
Nel passato l'asino veniva impiegato per il tiro, per la sella e soprattutto per il basto. Oggi l'allevamento degli asini si svolge analogamente a quello del cavallo, con la differenza che l'asino è assai meno esigente, più rustico, resistente e più sobrio. Gli attuali allevamenti di asini sono orientati alla produzione di latte e al recupero delle popolazioni asinine, che in Italia sono sotto il controllo dell'AIA, rientranti nel Registro Anagrafico delle popolazioni equine riconducibili a gruppi etnici locali (16).

Il latte d'asina trova impiego nell'alimentazione di neonati, allergici alle proteine del latte vaccino e che comunque non possono avvalersi del latte materno. Disporre di un latte naturale ad alto potere ipoallergenico è sicuramente un vantaggio alla luce dei circa 15.000 neonati che in Italia ogni anno nascono affetti da varie

forme allergiche nei confronti di caseine e altri elementi propri del latte vaccino. La possibilità di introdurre con successo il latte d'asina nella dieta dei neonati è avvalorata dal suo profilo biochimico, sovrapponibile a quello del latte umano, sono molte infatti le analogie quali-quantitative. La possibilità di impiego del latte d'asina non si limita al solo campo pediatrico, infatti questo prodotto guadagna sempre più consensi anche nell'alimentazione geriatrica e nella cosmesi (8).

Da competizione – In Italia le discipline equestri e il mondo dell'ippica sono abbastanza evoluti, con una storia per quando riguarda l'allevamento di cavalli per attività sportive e ludiche. La selezione ha prodotto soggetti con caratteristiche peculiari all'uso a cui sono destinati, con una riduzione della rusticità, di capacità di resistenza e di adattabilità all'ambiente.

Grafico 2 - Capi equini macellati in Italia (migliaia)



Fonte: ISTAT, *Annuario di statistica agraria, varie annate.*

Negli allevamenti da competizione il cavallo viene gestito diversamente da altre forme di allevamento, come nelle razze più rustiche, con una maggiore attenzione nella cura dei capi, che comporta determinati standards.

Gli equini da competizione si distinguono a loro volta in cavalli da:

- trotto
- galoppo
- sella

Nella gestione dei soggetti da competizione si devono rispettare determinati programmi alimentari, con opportune integrazioni, fare attenzione alle malattie e alle condizioni igieniche, rispetto alle quali alcune razze possono essere sensibili. Tutto questo allo scopo di mantenere nelle migliori condizioni di benessere i soggetti, che devono essere competitivi e con esemplari che rispecchino le prerogative della disciplina sportiva (1, 4, 6, 7, 10).

Vi sono altre discipline sportive praticate sul territorio nazionale, gestite o meno dalla Federazione Italiana Sport Equestri (FISE), che si stanno affermando, anche con razze equine di importazione, come il Quarter Horses americano, razza che

negli ultimi anni ha raggiunto la consistenza del Puro Sangue (20, 21, 22).

Per uso militare - Attualmente lo Stato possiede un numero di cavalli al di sotto delle mille unità sparsi sul territorio, che permettono lo svolgimento di attività di servizio. Sicuramente il numero attuale dei cavalli appartenenti allo Stato sono molto inferiori rispetto a quelli che disponeva prima della meccanizzazione.

I cavalli di proprietà dello Stato sono presenti per fornire servizi di rappresentanza e partecipare ad eventi sportivi, come il salto ostacoli e altre competizioni (24, 25, 26).

Le forze che detengono un numero più o meno cospicuo di cavalli sono:

- Carabinieri
- Corpo Forestale
- Esercito

Ludico-sportivo – L'impiego dei cavalli nel tempo libero è in continua espansione, grazie al maggiore benessere della popolazione. Non necessariamente l'attività sportiva deve essere di tipo competitivo, lasciando spazio a livelli diversi di abilità. L'equitazione è confacente alle attività formative dei giovani, accanto alle altre discipline sportive.

Per riabilitazione – L'impiego degli equini a favore delle associazioni per disabili è in continua espansione con risultati soddisfacenti. Le stesse Associazioni di categorie e singoli allevatori di equini si rendono disponibili allo svolgimento di attività a favore dei portatori di handicap. Infatti, l'ippoterapia è diventata un nuovo strumento terapeutico per il recupero delle persone diversamente abili.

4. TIPOLOGIA DEGLI ALLEVAMENTI EQUINI DA COMPETIZIONE

Lo spirito della competizione a cavallo è radicato profondamente nella storia dell'uomo. Si correva già agli albori della civiltà: i greci e poi i romani trasformarono pian piano quello che era un elemento delle feste popolari in un'autentica forma di spettacolo. Se in un primo tempo era il galoppo a farla da padrone, ben presto anche il trotto guadagnò posizione.

La nostra indagine ha preso in esame tre tipologie di allevamenti equini da competizione, quelli che trovano maggiore diffusione nel territorio nazionale e precisamente:

- trotto
- galoppo
- cutting

Mentre le prime due tipologie di allevamento hanno una lunga e consolidata tradizione nel nostro paese, la terza tipologia è di recente introduzione in Italia, ed è stata importata dall'America con l'acquisto di cavalli con certificata genealogia, i Quarter Horse. Ad una breve descrizione delle tre tipologie di allevamento, farà seguito l'analisi economica per ciascuna.

4.1 Allevamento del cavallo da trotto

Le correnti di sangue che hanno dato origine al trottatore moderno sono tre: quella americana, forte di soggetti di taglia ridotta, velocissimi e nevrili; quella normanna, costituita da atleti fisicamente molto robusti, di ampio modello, di velocità

meno elevata ma di maggior resistenza; e quella Orlov, razza russa, caratterizzata da cavalli tenaci e di ottima indole, facili alla guida e dal predominante mantello grigio. L'influenza di questa o di quella razza varia da paese a paese: in Italia si è ormai costituita una razza autoctona forte, di giusto equilibrio fra sangue americano e normanno (21, 22).

Il trottatore italiano è il risultato di un lungo processo di selezione e di allevamento che ha inizio nella seconda metà dell'Ottocento, con l'incrocio di stalloni purosangue inglese e di fattrici di razze diverse con attitudine al trotto.

Le registrazioni nel Libro Genealogico del Cavallo trottatore italiano sono state effettuate a partire dal 1896, mentre la più recente approvazione della normativa del Libro risale al 1994.

Tab. 2 - Ripartizione delle aziende e numero di capi per categoria (2008)

Classi di Aziende (numero di nati)	Fattrici	Puledri nati nel 2004	Puledri nati nel 2005	Stalloni	Totale capi
>10	1.494	1.459	1.200	80	4.233
5-9	1.344	1.050	1.080	60	3.534
2-4	2.091	1.619	1.627	66	5.403
1	1.046	872	872	28	2.818
Totale	5.975	5.000	4.779	234	15.988

Fonte: ANACT, Indagine sugli allevamenti da trotto condotta da Nomisma.

Attualmente le genealogie dei trottatori italiani sono tra le più significative a livello mondiale e alcuni dei più rilevanti stalloni americani ed europei sono iscritti al Libro Genealogico italiano.

Gli allevamenti del cavallo trottatore contano in Italia un patrimonio di circa 16.000 capi, allevati in 1.727 aziende agricole (22). Sono localizzati soprattutto nelle regioni che vantano una tradizione più consolidata nel campo di tale attività agonistica (Emilia Romagna, Campania, Lombardia, Toscana, Veneto, Lazio).

La consistenza media per azienda è pari a 9,3 capi, la classe con oltre 10 nati è quella con il valore medio più alto (56 capi per azienda). Nella classe 5-9 nati la consistenza media si aggira intorno ai 21 capi, mentre in quella da 2-4 capi nati è di 9 capi, in quella con un solo puledro nato è di 3.

Gli allevatori di cavalli da trotto si indirizzano sempre di più al potenziamento delle condizioni di allevamento come fattore di competitività, con particolare attenzione al miglioramento della razza.

4.2 Allevamento del cavallo da galoppo

Il galoppo è l'espressione più antica dello sport ippico. Al galoppo si corre da sempre e se prima si correva per necessità di ordine pratico (la rapidità in battaglia), poi si cominciò ad apprezzare il cavallo anche sotto la veste più pacifica della velocità in gara.

I migliori galoppatori erano gli arabi, veloci e resistenti. Superiori alle razze

europee, gli arabi iniziarono presto a diffondersi anche in Europa. Ogni anno, in tutta Italia, vengono registrati circa 1.900 purosangue italiani, 1.300 nati in Italia e 600 all'estero (21).

Nonostante il numero modesto dei nati (nel mondo vedono la luce circa 80.000 purosangue l'anno), l'allevamento italiano è particolarmente apprezzato anche all'estero. Un purosangue si riconosce con una certa facilità rispetto ad un trotatore: la testa è più affusolata, il torace appare possente, il collo è slanciato, gli arti sono più sottili e più lunghi e l'altezza al garrese è in genere superiore.

4.3 Allevamento del cavallo da cutting

Formalmente riconosciuto come razza nel 1941, il Quarter Horse ha una lunga storia che risale ai tempi delle prime colonie nord-americane, quando cavalli di ceppo spagnolo furono incrociati con soggetti importati dall'Inghilterra. L'origine del nome di questa razza piccola, tozza e scattante, deriva dalle corse cui nel fine settimana gli agricoltori e i proprietari di terre e piantagioni si dedicavano come loro passatempo preferito: far gareggiare i cavalli più veloci in gare testa a testa sulla strada principale dei villaggi di questi stati meridionali.

E' un cavallo eccellente per la custodia del bestiame poiché l'intelligenza, la forte struttura muscolare e l'eccellente conformazione gli permettono di eseguire con facilità manovre rapide che richiedono grande agilità. Nessun cavallo è più agile del Quarter Horse nel "cutting", cioè nell'isolare un animale singolo dal resto della mandria: s'insinua basso, corpo e mente perfettamente in sintonia, osservando e studiando ogni minima mossa del bovino.

Nella razza si distinguono tipi diversi, allevati specificamente per i diversi compiti che andranno a svolgere, tuttavia un buon Quarter Horse conserva sempre la forza muscolare e la raffinatezza che contraddistinguono la razza. In questo ambito, dove sono necessari l'agilità e il "cow-sense", l'istinto del Quarter Horse nell'avvicinare il bestiame regna sovrano.

Recentemente il numero dei cavalli registrati ha superato quello di qualsiasi altra razza. Sono moltissimi gli usi ai quali è destinato il Quarter Horse, si distingue comunque e soprattutto come cavallo da lavoro, meritandosi i più alti onori ogni qualvolta compete nel "cutting" o nell'isolare un singolo animale. Pertanto questo cavallo non solo vanta la superiorità numerica nel suo paese d'origine, ma oggi viene annoverato fra le razze internazionali (20).

5. ANALISI ECONOMICA DI CASI DI STUDIO

5.1 Le rilevazioni aziendali

Per approfondire le conoscenze sul campo delle realtà aziendali abbiamo ritenuto opportuno rilevare e analizzare le caratteristiche strutturali ed economiche di tre tipologie di allevamento di tipo sportivo: trotto, galoppo e cutting. Per le rilevazioni aziendali abbiamo preso in esame un allevamento per ogni tipologia sportiva.

Caratteristica comune riscontrata nella conduzione aziendale dei diversi allevamenti equini studiati è la grande passione che viene profusa nella conduzione degli stessi, superando a volte enormi difficoltà economiche.

I dati sono stati raccolti grazie alla disponibilità offerta dagli allevatori, nel

rispetto della privacy, attraverso un questionario aziendale predisposto appositamente per queste tipologie di allevamento. Pertanto non si farà riferimento ai nominativi degli allevamenti ed alla loro collocazione sul territorio.

Di ogni tipologia di allevamento verranno illustrate le caratteristiche aziendali e l'analisi del bilancio economico (3, 5, 9). I risultati ottenuti ci consentiranno di trarre alcune conclusioni sulle prospettive di sviluppo di questi allevamenti, tenuto conto che nella letteratura scientifica non esistono lavori che prendono in esame la componente economica degli stessi.

5.2 Allevamento da trotto

5.2.1 Caratteristiche strutturali

L'allevamento da trotto che abbiamo rilevato è sito su un appezzamento di terreno di circa 2,5 ettari in affitto, completamente pianeggiante a poca distanza dalla costa, quasi a livello del mare. Ha un patrimonio di 12 fattrici, 8 soggetti da competizione (3 maschi e 5 femmine) e i rimanenti 20 soggetti in rimonta. L'allevamento rientra nella classificazione svolta da Nomisma (22), per conto dell'Associazione Nazionale Allevatori Cavallo da trotto, come azienda medio grande, con nati da 5 a 9 soggetti.

Date le caratteristiche climatiche, l'allevamento si sviluppa maggiormente all'esterno, con poche strutture coperte. Le opere eseguite si compongono di alcune aree recintate con pali di castagno e nastro telato con conduttore in rame, per il passaggio dell'elettricità come deterrente per il superamento dei recinti. All'interno di ogni area si trova una piccola tettoia, necessaria per il ricovero dei cavalli durante le intemperie o per il riparo dalla calura estiva. Ogni recinto è provvisto di fontanella-abbeveratoio con pulsante a pressione per l'erogazione dell'acqua. Oltre ai recinti precedentemente descritti esistono 6 box, con struttura in acciaio e tamponamenti in pannelli di legno multistrato e copertura a falde inclinate.

Il fienile è costituito da una tettoia di circa 100 mq con struttura metallica e copertura in lamiera grecata; tale struttura viene utilizzata in parte anche per il ricovero delle macchine.

L'azienda dispone di un tondino che serve per la doma dei puledri che vengono iniziati alla messa dei finimenti per il trotto, con l'attacco alla "ghinghella".

L'allevamento si avvale di una struttura esterna costituita da una pista in terra battuta dove anche altri allevatori della zona allenano i cavalli alla pratica agonistica.

Alle strutture per l'allevamento si affiancano un alloggio per il custode e un'area deposito per mangimi, il tutto ricavato da due immobili preesistenti e riadattati alle nuove esigenze dell'azienda.

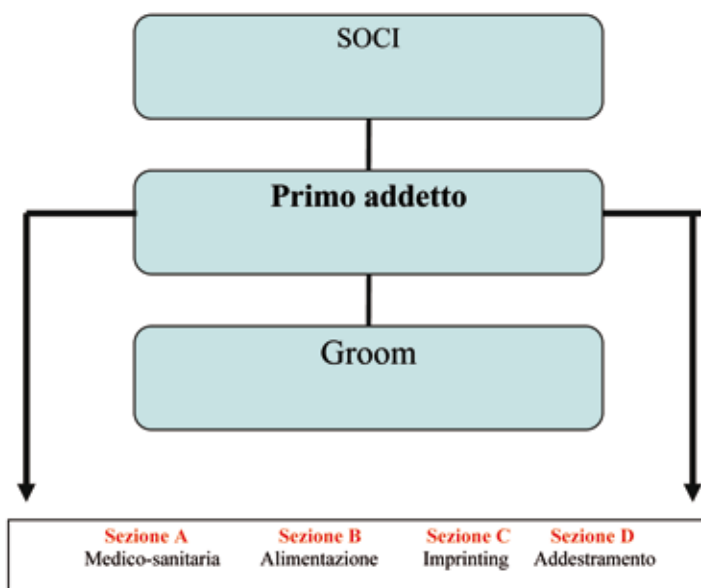
Il parco macchine è limitato ad un furgone ad uso promiscuo e da un van a 4 posti per il trasporto dei cavalli, oltre a piccole attrezzature.

5.2.2 Organizzazione gestionale

L'allevamento viene gestito direttamente dai titolari, che in questo caso sono persone che provengono dal mondo delle competizioni del trotto e dotati di competenze specifiche. La gestione aziendale si avvale di 2 salariati con incarichi diversi, sia per competenze che per studi. Il primo viene identificato come "Primo

addetto” dell’allevamento, il secondo lo identificheremo con la solita definizione di uomo di scuderia o “groom”. L’allevamento è organizzato in sezioni: medico-sanitaria, alimentazione, imprinting e addestramento.

Le necessità medico-sanitarie sono gestite dai titolari che prendono contatto direttamente con i veterinari e i maniscalchi, con pianificazione dei lavori in collaborazione col “Primo addetto”, in base al calendario delle gare e alle condizioni degli animali. La gestione dell’allevamento è organizzata secondo il seguente organigramma.



5.2.3 Analisi di bilancio

5.2.3.1 Produzione lorda vendibile

L'allevamento considerato è abbastanza giovane, di conseguenza i ricavi sono ancora modesti, ma le prospettive di aumento delle vendite dei soggetti per le gare sono buone. Occorre aumentare il numero di nati ed erogare altri servizi, come l'addestramento per conto terzi e un servizio di monta. Per l'anno 2008 la Produzione lorda vendibile è risultata pari a 132.500 euro.

Attualmente la vendita dei cavalli da vita di soggetti sportivi per il trotto rappresenta per l'allevamento la voce di ricavo maggiore. Sono stati venduti nel corso dell'annata 6 soggetti, per un incasso totale di 54.000 euro. Nella produzione animale vanno considerati anche gli incrementi di capi nel corso dell'annata.

Alle vendite di capi si aggiungono il pensionamento di 10 cavalli di privati per un totale di 5.000 euro. Per quanto riguarda le vincite, relative al 2008, sono stati ottenuti 15 premi da piazzamento, per un valore complessivo di 13.500 euro. In ogni caso la maggiore entrata monetaria rimane quella della vendita di animali da vita, pari al 41% della produzione lorda vendibile.

5.2.3.2 Costi

L'allevamento da trotto presenta delle voci di spesa abbastanza contenute, legate alle scelte gestionali e alle caratteristiche strutturali. In questo allevamento si evidenzia la carenza di terreno da coltivare per produrre gli alimenti, che pertanto vengono acquistati sul mercato: foraggi, lettimi (paglia) e mangimi.

Nei costi dell'allevamento troviamo poi le spese farmaceutiche. In questo caso l'allevamento si avvale di medicinali forniti direttamente dai veterinari e pertanto la relativa spesa non figura come voce separata nel bilancio. L'allevamento ha dovuto sostenere delle spese di fecondazione con seme congelato per 12 fattrici, per un totale di 60.000 euro. Le spese appena menzionate non ricorrono regolarmente ogni anno, ma variano in base alle scelte adottate dall'azienda.

Tab.3 – Bilancio economico dell'allevamento da trotto

Descrizione	Importo (Euro)	
	Parziale	Totale
Produzione lorda vendibile		132.500
Animale		114.000
Animali da vita	54.000	
Incrementi	60.000	
Servizi		18.500
Pensione	5.000	
Premi	13.500	
Spese capitale circolante		75.680
Spese specifiche per le produzioni animali		69.700
Mangimi e integratori	4.750	
Foraggi e lettimi	2.250	
Presidi sanitari	0	
Altre spese	62.700	
Spese specifiche per l'esercizio delle macchine		2.430
Carburanti e lubrificanti	2.430	
Altre spese		
Spese generali		3.550
Quote		4.856
Ammortamento	4.156	
Manutenzione	200	
Assicurazione	500	
Spese di reintegrazione		80.536
Spese extraziendali		5.600
Prestazioni professionali	3.500	
Noleggi	0	
Imposte e contributi	2.100	
Prodotto Netto		46.364
Compensi		35.200

Affitto	4.000	
Salari	31.200	
Interessi	0	
Reddito Netto		11.164

Una voce di spesa che dipende dalle scelte dell'allevamento è quella delle prestazioni professionali, ovvero i servizi esterni svolti da professionisti sanitari. In questa azienda tale spesa è di 3.500 euro. Le prestazioni professionali sono svolte dai veterinari e dai maniscalchi. I veterinari sono più di uno, ciascuno ha una propria specializzazione (ginecologo, ortopedico, odontoiatra ecc.).

Altre spese che non sono direttamente indirizzate ai soggetti allevati, ma di carattere generale per la gestione dell'allevamento, sono quelle relative alle strutture e alle macchine (ammortamenti, assicurazioni e manutenzioni), ai carburanti e lubrificanti, alle spese di elettricità, gas, acqua, telefono, alle quote associative, ecc. Il fabbisogno di macchinari è abbastanza contenuto, per cui le quote sono da imputare principalmente ai pochi fabbricati esistenti.

5.2.3.3 Reddito Netto

L'allevamento da trotto ha realizzato un reddito netto pari a 11.164 euro, comunque positivo anche se di modesta entità. La somma di tutte le voci di spesa rappresentano, nel bilancio generale, il 91% della Produzione lorda vendibile. I titolari dell'azienda, grazie ad una oculata gestione ed al ridotto numero di salariati, si prefiggono di incrementare in futuro il reddito netto grazie alla vendita di soggetti di pregio e alle vincite dei loro capi migliori. Si tratta di accumulare un patrimonio equino di elevata genealogia, che trovi il riconoscimento degli estimatori sul mercato, grazie alle prestazioni fornite dai soggetti nelle competizioni sportive.

5.2.3.4 Analisi dei risultati

Con questo risultato finale ottenuto dal bilancio aziendale, cioè il reddito netto pari a 11.164 euro, l'azienda manifesta una condizione gestionale che permetterà il miglioramento economico con il prosieguo degli anni.

Va rilevato che l'allevamento è nato da pochi anni e sviluppa un unico servizio, il pensionamento di cavalli per terzi. L'azienda si prefigge innanzitutto quello di mantenere i propri cavalli con un alto livello di benessere, non da meno rispetto alle altre aziende del settore.

Se rapportiamo la Produzione lorda vendibile con le spese specifiche per la produzione animale, si evidenzia che viene investito circa il 53% della produzione. Pertanto la gestione dell'allevamento è molto curata, sicuramente l'azienda in futuro produrrà un reddito netto migliore, grazie all'incremento del numero di fattrici, all'erogazioni di vari servizi, quali la monta per conto terzi.

5.3 Allevamento da galoppo

5.3.1 Caratteristiche strutturali

L'allevamento dispone di un terreno di circa 80 ettari, adibito a prato-pascolo, diviso in 2 corpi fondiari: uno di circa 50 ettari destinato alle 65 fattrici con puledri, i

restanti 30 ettari vengono utilizzati per la rimonta e per gli altri capi adulti.

All'interno dell'azienda sono localizzati 3 fabbricati di recente costruzione. La struttura principale ha una copertura di 240 mq nella quale sono presenti tre corsie di box.

Le altre due strutture sono destinate al ricovero dei mezzi agricoli, con diverse trattatrici, tre rotopresse e una paddock-clear (pulisci-pascoli). Per lo spostamento delle roto-balle ci si avvale dell'utilizzo di vari carrelli elevatori (muletto). All'interno si trova uno spazio officina, mentre la terza struttura viene utilizzata come fienile.

Le superfici esterne adibite a pascolo sono recintate con pali in ferro zincato, all'interno dei vari paddocks esistono alcune strutture leggere per il ricovero temporaneo dalle intemperie, in quanto le fattrici con i puledri vengono portate nei box quando piove, anche per evitare la formazione di pantano da calpestio.

Per quanto riguarda gli stalloni, essi vengono stabulati in una struttura separata da quella delle fattrici con 6 box. Adiacente ai box si trova un tondino dove i cavalli possono muoversi liberamente, scaricare lo stress accumulato durante la stabulazione e cercare di abbassare la libido caratterizzante questa razza.

5.3.2 Organizzazione gestionale

L'allevamento evidenzia una gestione molto articolata, con la presenza di tre figure prevalenti, più i salariati (5 fissi e 9 avventizi) che svolgono lavori manuali.

Le figure principali sono:

- direttore aziendale
- assistente alla neonatologia
- assistente alla ginecologia

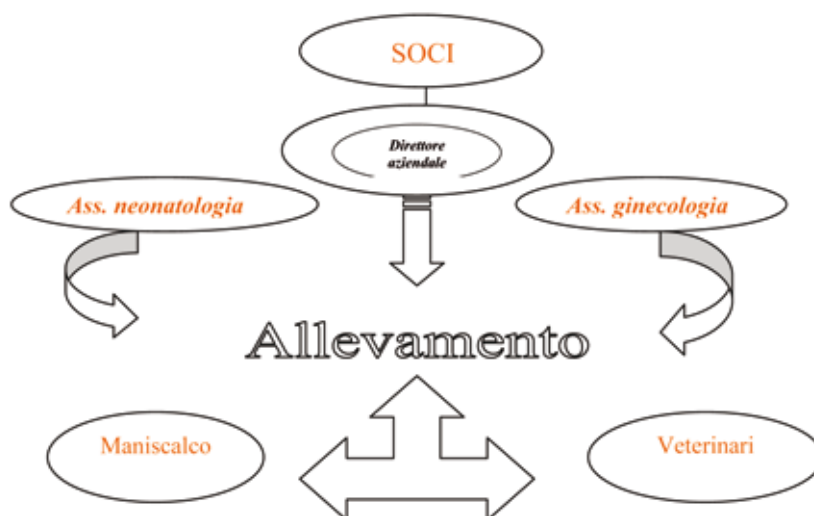
Tutte e tre le figure comunque si accordano per l'alimentazione, che è specifica per ogni singola fattrice, il loro lavoro si organizza poi all'interno dell'azienda nei vari comparti di attività secondo l'organigramma riportato.

Il direttore aziendale si occupa della parte amministrativa, cioè di tutte le pratiche burocratiche e contabili. Al direttore compete di programmare le attività, di gestire il personale per l'addestramento di base dei cavalli, occuparsi della parte commerciale nelle contrattazioni private di vendita diretta dei capi o tramite aste.

La gestione e la pianificazione della neonatologia è affidata ad una collaboratrice che cura attentamente tutta la stagione dei parti. Si occupa inoltre del reclutamento di giovani che richiedono di poter svolgere tirocini in azienda per l'assistenza ai parti e prestare le guardie di ostetricia. Inoltre, l'assistente alla neonatologia, in caso di necessità, può richiedere l'intervento del medico veterinario. Infatti, su grandi numeri come in questo allevamento, la presenza costante del medico veterinario è importante per gestire i parti e le fattrici, organizzare gli accoppiamenti, le visite ecografiche di gravidanza, ecc.

L'assistente ginecologica collabora con il veterinario, coadiuvandolo nell'organizzazione dell'agenda delle fattrici. Svolge pertanto un ruolo importante da trait d'union tra la sezione neonatale e il veterinario, è una figura di raccordo che completa la gestione dell'azienda chiudendo il ciclo biologico dell'allevamento.

Nel coordinamento dei trattamenti podali, con l'intervento del maniscalco, sono coinvolte tutte e tre le figure aziendali.



5.3.3 Analisi di bilancio

5.3.3.1 Produzione lorda vendibile

Questo allevamento si caratterizza per un elevato volume d'affari, pari a 708.600 euro di entrate, ottenuto dalla vendita di cavalli da competizione, dai premi, dai servizi di monta e di pensionamento.

Tale risultato è frutto di vari anni di lavoro e d'esperienza sul campo. L'azienda è stata costituita nel 1980 e attualmente questo allevamento è uno dei migliori produttori di puro sangue inglese da galoppo, forte della sua storia e dell'innovazione messa in campo negli anni. Infatti, detiene stalloni con valore medio di 140 mila euro e fattrici che hanno un valore compreso tra un minimo di 5 mila ed un massimo di 160 mila euro.

L'allevamento, dopo alcuni anni di difficoltà, ha oggi raggiunto livelli qualitativi elevati con riconoscimenti internazionali per le linee genealogiche dei propri cavalli.

La voce con maggior introito è stata la vendita dei puledri tramite le aste, con prezzi medi per capo di 6.300 euro, totalizzando un fatturato annuo di 285.000 euro, e da altri soggetti da competizione per 10.000 euro, ai quali si aggiungono gli incrementi dell'annata per 102.000 euro.

L'altra voce di entrata di maggior rilievo dell'allevamento è rappresentata dai contributi e premi, per un totale di 167.000 euro, grazie ai buoni piazzamenti di soggetti pregiati.

Inoltre, in relazione alle caratteristiche strutturali ed organizzative, può disporre di un elevato numero di box per conto terzi e realizzare un ricavo dal servizio di pensionamento che ammonta a 120.600 euro. Per ultimo troviamo la voce dei servizi di monta, per un totale di 9 monte, pari a 24.000 euro di incasso.

Le vendite di capi e gli incrementi rappresentano il 56% della produzione

lorda vendibile, i premi il 24%, il servizio di pensione il 17 % ed infine il 3 % i servizi di monta.

5.3.3.2 Costi

I costi sostenuti dall'allevamento da galoppo sono abbastanza elevati, anche per il consistente numero di capi presenti in azienda. Infatti la somma di tutti i costi espliciti è pari a 642.575 euro, il 91 % della Produzione lorda vendibile. L'incidenza dei costi sui ricavi è sorprendentemente analoga a quella riscontrata nell'allevamento da trotto, anche se di dimensioni più ridotte.

Le spese di reintegrazione incidono sulla spesa complessiva per circa il 56%, mentre i compensi incidono sui costi espliciti per il 30%, le spese extraziendali per la rimanente parte. Da questi risultati si evince che l'azienda cerca di abbassare i costi per l'alimentazione, con la preparazione in azienda dei MCI acquistando sul mercato le materie prime: avena, orzo e mais fioccato. Le spese di mano d'opera sono sostenute per far fronte alla presenza di 65 fattrici, più la rimonta. Ciò consente di erogare un servizio elevato per la cura degli animali e mantenere l'attività dell'azienda ai massimi livelli di efficienza.

5.3.3.3 Reddito netto

Come abbiamo visto nel precedente bilancio, il reddito netto non è solo il compenso per le capacità imprenditoriali e per i rischi assunti, ma per tutte le funzioni svolte dall'imprenditore, compresi gli apporti di lavoro e capitale.

In questo caso l'allevamento da galoppo mette in risalto un reddito netto pari a 69.725 euro, che va a remunerare i fattori produttivi conferiti dall'imprenditore.

L'azienda, forte dell'esperienza acquisita negli anni, mantiene un elevato benessere per tutto l'allevamento, buone condizioni strutturali e una gestione efficiente anche del lavoro. Sui grandi numeri di capi è possibile ridurre i costi, pur mantenendo i cavalli nelle migliori condizioni di salute e di prestazioni, formando dei veri e propri atleti che sanno ben figurare nelle varie competizioni e nell'apprezzamento degli intenditori.

5.3.3.4 Analisi dei risultati

Il reddito netto ottenuto, pari a 69.725 euro, mette in evidenza una buona gestione dell'allevamento di grandi dimensioni. L'incidenza dei costi complessivi sui ricavi è analoga a quella riscontrata nell'allevamento da trotto. Bisogna sottolineare che la preparazione dei mangimi avviene in azienda, ottenendo un mix di cereali che consente di abbassare i costi di alimentazione. Vengono utilizzati avena, orzo e mais fioccato acquistati sul mercato e conservati in silos. La macinatura dei cereali e la preparazione dei MCI viene fatta quotidianamente, secondo il fabbisogno dell'allevamento. Per le lettiere si utilizza la paglia, raccolta su superfici di altre aziende che a titolo oneroso cedono il restante della trebbiatura del frumento, pari ad un costo di 2 euro al quintale; lo stesso sistema viene adottato per il fieno, con un costo leggermente superiore.

Tab. 4 – Bilancio economico dell'allevamento da galoppo

Descrizione	Importo (Euro)	
	Parziale	Totale
Produzione lorda vendibile		708.600
Animale		397.000
Puledri e soggetti da competizione	295.000	
Accrescimenti	102.000	
Servizi		311.600
Monta	24.000	
Pensione	120.600	
Premi	167.000	
Spese capitale circolante		128.925
Spese specifiche per le produzioni vegetali		6.225
Sementi	4.200	
Concimi	2.025	
Spese specifiche per le produzioni animali		97.400
Mangimi e integratori	28.600	
Foraggi e lettimi	42.000	
Presidi sanitari	25.000	
Altre spese	1.800	
Spese specifiche per l'esercizio delle macchine		21.300
Carburanti e lubrificanti	17.100	
Altre spese	4.200	
Spese generali		4.000
Quote		229.350
Ammortamento	179.150	
Manutenzione	200	
Assicurazione	50.000	
Spese di reintegrazione		358.275
Spese servizi extraziendali		89.500
Prestazioni professionali	75.000	
Noleggi	6.500	
Imposte e contributi	8.000	
Prodotto Netto		260.825
Compensi		191.100
Affitto	0	
Salari	191.100	
Interessi	0	
Reddito Netto		69.725

Ciò nonostante l'azienda deve ricorrere all'acquisto di fieno e paglia sul mercato, a prezzi più elevati dei costi sostenuti per la raccolta fuori azienda. Gli introiti principali dell'azienda sono la vendita di soggetti puro sangue di alto pregio e la riscossione di sostanziali premi dall'associazione degli allevatori, oltre ai contributi pubblici previsti per legge.

Anche l'attenta organizzazione del lavoro, che valorizza e premia le varie competenze professionali, contribuisce al conseguimento di livelli elevati di efficienza nella gestione dell'allevamento.

5.4 Allevamento da cutting

5.4.1 Caratteristiche strutturali

L'azienda presa in considerazione alleva in media 60 cavalli di razza Quarter Horses, la cui attività è l'allevamento e la vendita di soggetti da competizione per il cutting. Inoltre offre un servizio di pensione e maneggio per conto terzi e garantisce una stazione di monta con servizio di spedizione di seme refrigerato o congelato. Da ultimo organizza manifestazioni, dimostrazioni e gare in azienda.

L'allevamento di cavalli da cutting, a differenza degli altri allevamenti di equini, comprende anche l'attività di stalla di sosta, per circa un mese, di manze da carne di razza Charolaise, che vengono utilizzate per l'allenamento e l'addestramento dei cavalli per la disciplina del cutting.

Queste manze vengono importate dai pascoli irlandesi, dove sono allevate allo stato brado e presentano caratteristiche idonee ad impegnare i cavalli nelle fasi di addestramento. I bovini arrivano in azienda due volte al mese; per un totale di circa 80 capi mensili, con un peso vivo di arrivo di circa 200-250 chilogrammi. Alla fine del mese di sosta e utilizzo nell'allevamento questi soggetti vengono venduti ad aziende di ingrasso e finissaggio, con un incremento in peso di circa 30 Kg, pari ad un chilogrammo al giorno.

L'azienda si sviluppa su un unico corpo fondiario di 20 ettari, ma solo 9 ettari sono utilizzabili e destinati alla coltivazione di prati-pascoli, per la deambulazione e l'alimentazione dei cavalli. Per il resto l'azienda si approvvigiona di alimenti sul mercato:

- foraggi (fieno di erba medica e di prato polifita);
- mangimi (di due tipologie, uno per gli atleti e uno per le fattrici);
- lettimi (trucioli sfusi e in balle).

L'allevamento da cutting si compone di una struttura principale con superficie coperta di circa 2.500 mq, dove si trovano la stalla per i cavalli, il fienile e una rimessa. Si aggiungono poi l'arena e i tondini, con lo scopo di allenare i cavalli per l'attività sportiva del cutting.

A parte vi sono poi le strutture di servizio, rappresentate dalle abitazioni per il personale, l'ufficio e le sale di deposito delle selle e dei finimenti, con i servizi igienici.

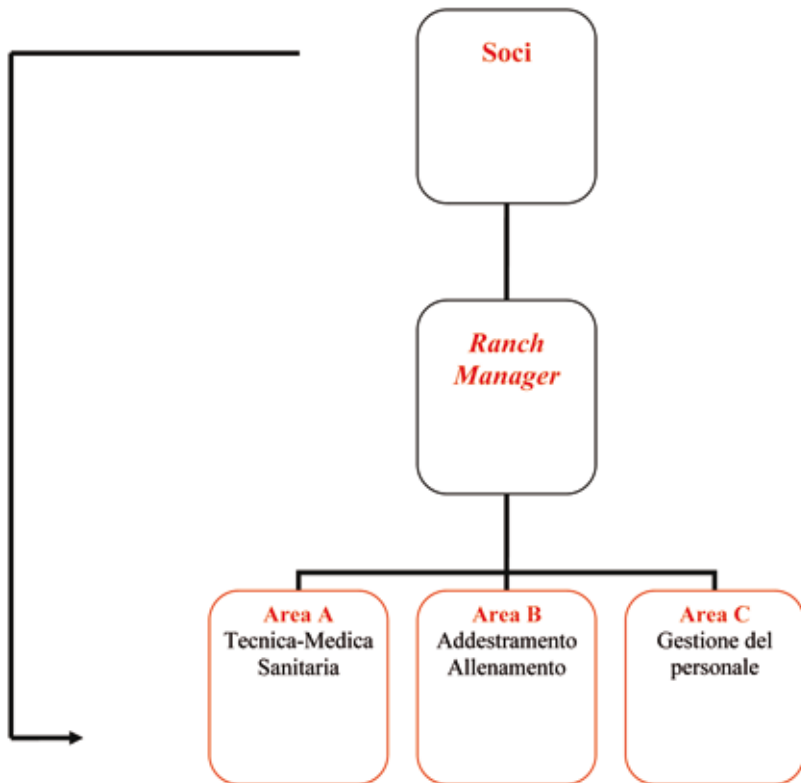
Le principali macchine in dotazione all'azienda sono rappresentate da una trattrice con sollevatore, da una piccolo trattore a trazione integrale, da una falcia trinciatrice, da un piccolo escavatore, da una spazza pulitrice e da un motociclo per gli spostamenti in azienda, oltre ad attrezzature varie quali erpice, fresatrice, carrello elevatore ecc.

L'azienda ha ripartito i 9 ettari di superficie foraggiera in 12 pascoli, tutti recintati, di dimensioni variabili, al cui interno sono collocati dei ricoveri in legno per proteggere gli animali dalle eventuali intemperie.

5.4.2 Organizzazione gestionale

L'azienda è a conduzione con salariati, di cui 6 unità fisse e alcuni avventizi. Il piano gestionale poggia su una figura poco diffusa in Italia ma abbastanza presente negli allevamenti americani: quella del Ranch manager. L'organizzazione gestionale viene riassunta nel seguente organigramma.

I soci svolgono un'azione diretta di controllo e valutazione sull'area A, dove le anomalie riscontrate e da eliminare verranno riferite al Ranch manager, che indirizzerà ai componenti dell'area stessa, mentre sull'area B "addestramento e allenamento" essi scelgono i soggetti per le gare, inoltre fanno attenzione ai metodi di allenamento e addestramento che utilizza il trainer. L'area C viene gestita su programmi mensili predisposti dal Ranch manager in accordo con i soci.



Il Ranch manager è il punto di riferimento per decisioni e azioni sulle varie aree e sull'allevamento, per tutte le problematiche di media entità e di propria competenza, conferitagli dai soci, per quanto concerne aspetti:

- economici
- benessere animale
- infrastrutturali

Inoltre ha competenze sulle attività burocratiche e generali di collegamento con vari enti pubblici e per quelli di rappresentanza della categoria sportiva. In pratica è il punto di riferimento per tutta la gestione dell'azienda.

1.1.3 Analisi di bilancio5.4.3.1 *Produzione lorda vendibile*

La vendita dei cavalli da vita rappresenta per gli allevamenti da competizione una voce importante di entrata. Il nostro allevamento da cutting, nel corso 2008, ha venduto 5 soggetti da vita, per un incasso totale di 40 mila euro.

Tab.5 – Bilancio economico dell'allevamento da cutting.

Descrizione	Importo (euro)	
	Parziale	Totale
<i>Produzione lorda vendibile</i>		269.400
<i>Animale</i>		131.900
Carne (bovini)	67.600	
Animali da vita	40.000	
Incrementi	24.300	
<i>Servizi</i>		138.000
Monta	24.000	
Pensione	102.000	
Premi	12.000	
Spese capitale circolante		224.060
<i>Spese specifiche per le produzioni animali</i>		186.840
Mangimi e integratori	37.500	
Foraggi e lettimi	59.440	
Presidi sanitari	72.000	
Altre spese	17.900	
<i>Spese specifiche per l'esercizio delle macchine</i>		16.620
Carburanti e lubrificanti	9.300	
Noleggi passivi	7.200	
Altre spese	120	
<i>Spese generali</i>		20.600
Quote		114.285
Ammortamento	105.385	
Manutenzione	1.000	
Assicurazione	7.900	
Spese di reintegrazione		338.345
Spese extraziendali		91.920
Prestazioni professionali	80.920	
Noleggi	0	
Imposte e contributi	11.000	
<i>Prodotto Netto</i>		-160.365
Compensi		78.000
Affitto	0	
Salari	78.000	
Interessi	0	
<i>Reddito Netto</i>		-238.365

Alle vendite di capi si aggiungono le prestazioni fornite dall'azienda, come il pensionamento di 25 cavalli di privati per 102.000 euro. La stagione di monta equina, che va da febbraio a giugno con 20 richieste, ha concorso per un totale di 24.000 euro.

Le caratteristiche strutturali dell'allevamento permettono di svolgere eventuali manifestazioni, che assicurano ulteriori introiti da sommare ai ricavi dell'azienda. Inoltre, rientrano tra i ricavi aziendali tutte le vincite che i soggetti dell'allevamento conquistano nelle gare disputate sul territorio nazionale.

L'allevamento di cavalli da cutting presenta, a differenza di altri allevamenti equini da competizione, la gestione di bovine da carne che vengono acquistate per essere utilizzate per l'addestramento e l'allenamento dei cavalli. I bovini che entrano in azienda vi rimangono per un periodo non superiore ai 30 giorni.

In questo arco di tempo i bovini vengono alimentati in modo tale da avere un incremento giornaliero di circa un chilogrammo, per raggiungere alla fine del mese un aumento di circa 30 kg a capo. Vengono poi venduti a peso vivo, a prezzo di mercato, ad aziende di ingrasso e finissaggio dei bovini. Pertanto vi è un continuo alternarsi di entrate e di uscite di capi bovini durante l'anno.

L'allevamento da cutting ha una presenza mensile di circa 80 manzette, per arrivare a circa 950 capi in un anno. I ricavi dei bovini sono rappresentati dagli incrementi delle manzette, e quindi dal maggior valore delle vendite per capo rispetto agli acquisti di ogni mese, per un utile di 67.600 euro, che vanno ad aggiungersi ai ricavi degli equini, rappresentati dalle vendite di capi da competizione e dagli incrementi ponderali.

5.4.3.2 Costi

L'allevamento da cutting presenta delle voci di spesa rilevanti, dovute sia alle scelte imprenditoriali, che alla carenza di terreno da coltivare per produrre gli alimenti, che pertanto vengono acquistati sul mercato: foraggi, lettimi e mangimi. Si tratta di fieno per l'alimentazione e trucioli per le lettiere, che possono essere comprati in forma sfusa o in balle. Il truciolo sfuso ha un prezzo inferiore ma richiede più tempo per la messa in box. Il truciolo imballato è più maneggevole e pratico, pertanto ha anche un prezzo maggiore. Viene impiegato soprattutto quando si partecipa alle gare e per i box distanti dal complesso centrale dell'azienda. I mangimi sono specifici per i soggetti da rimonta e per quelli da competizione. Un peso rilevante rivestono le quote di ammortamento, soprattutto per le strutture che sono di recente costruzione.

Nei costi di allevamento troviamo poi le spese per l'acquisto dei medicinali. Il costo varia in base al numero di capi allevati, alle differenti specie presenti in azienda e al tipo di farmaco. Infatti l'allevamento da cutting deve sostenere spese sia per i cavalli che per i bovini, mantenendo una scorta di farmaci legalmente registrati e custoditi in azienda. Inoltre l'allevamento analizzato ha dovuto sostenere delle spese di fecondazione con seme congelato per 6 fattrici, per un totale di 7.800 euro.

Una voce di spesa che dipende dalle scelte dell'allevamento è quella delle prestazioni professionali, ovvero i servizi esterni svolti da professionisti sanitari. In questa azienda tale spesa incide in modo non marginale, poiché rientra tra le scelte aziendali quella di garantire un elevato benessere dei propri animali. Le prestazioni

professionali sono svolte dai veterinari e dai maniscalchi. I veterinari sono più di uno, ciascuno ha una propria specializzazione.

Altre spese non sono specifiche per l'allevamento, ma di carattere generale per la gestione dell'azienda. Sono quelle relative alle macchine (assicurazioni, tagliandi periodici ed eventuali manutenzioni, ai carburanti e lubrificanti), alle spese di elettricità, gas, acqua, telefono, alle quote associative (Apa e associazione di categoria sportiva), agli abbonamenti di giornali e riviste, nonché alle spese di pubblicità. Nel complesso i costi hanno un valore superiore alla stessa Produzione lorda vendibile, prefigurando un risultato di gestione negativo, che deve ancora scontare le ulteriori spese relative ai compensi aziendali.

5.4.3.3 Reddito netto

Nell'allevamento da cutting da noi considerato si riscontra una perdita pari a 238.365 euro. Il risultato ottenuto non ci deve sorprendere se consideriamo che l'azienda è sorta di recente, con investimenti notevoli per poter divenire uno dei migliori allevamenti da cutting esistenti in Italia, sia per la qualità dei capi posseduti che per le strutture aziendali. Infatti le quote di ammortamento di fabbricati e macchinari sono pari al 39% della Produzione lorda vendibile, a testimoniare che ci si trova ancora nelle fasi iniziali, dopo aver compiuto investimenti importanti.

Nel tempo si auspica che le energie e la passione profuse dai soci portino a colmare le spese sostenute, pur mantenendo un livello medio-alto di benessere assicurato fino ad ora agli animali.

Si tratta, in effetti, di un'impresa pionieristica nel comparto, che deve affrontare tutti i rischi delle nuove scelte, nella prospettiva che una futura affermazione di questa tipologia di allevamento equino da competizione abbia a produrre accanto alle soddisfazioni morali anche quelle economiche. Non va dimenticato che in questa tipologia di allevamento la sostenibilità delle perdite è resa possibile grazie al supporto a monte di altre imprese più redditizie dei titolari.

5.4.3.4 Analisi dei risultati

Il bilancio deve essere letto alla luce della passione per gli animali che caratterizza i soci, disposti a sostenere spese di mantenimento elevate per la cura in cambio dell'ottenimento di sensazioni e soddisfazioni che non hanno prezzo, potendo così ottenere cavalli con requisiti di eccellenza. L'allevamento esaminato è funzionale alle aspettative di coloro che hanno investito notevoli capitali per raggiungere risultati in grado di appagare la passione sportiva.

La disponibilità a ripagare il deficit aziendale è la contropartita ai benefici immateriali che gli allevatori soci traggono dall'attività d'impresa. Non vanno trascurate le esternalità positive che ne conseguono per il mantenimento dell'occupazione, la cura del territorio, la salvaguardia e la diffusione di equini di particolare pregio, in definitiva la funzione di volano all'economia di aree marginali che in assenza di iniziative sarebbero destinate all'abbandono.

Rimane forte l'aspettativa di arrivare al più presto possibile al raggiungimento del punto di break even, per affiancare alle soddisfazioni morali dei soci anche quelle economiche.

6. VALUTAZIONI COMPARATIVE

Il trotto e il galoppo sono attività sportive tradizionali e consolidate, con diverse affinità, mentre il cutting si differenzia dalle precedenti perché di recente introduzione dall'America e un po' lontana dalle nostre tradizioni. La comparazione con le prime due ha quindi un valore prettamente indicativo e serve a mettere in evidenza più le differenze che le analogie. Iniziamo con l'analisi delle principali differenze di ciascuna attività per quanto riguarda:

- caratteristiche strutturali
- gestione organizzativa
- risultati economici

Innanzitutto le aziende sono diverse per numero di capi allevati. In base al numero di fattrici 2 allevamenti sono abbastanza simili, con 14 capi quello da cutting e 12 in quello da trotto, invece quello da galoppo detiene un numero di fattrici cinque volte superiore ai precedenti allevamenti.

Per quanto riguarda le strutture e i macchinari, gli allevamenti presentano alcune caratteristiche comuni, per il fatto di allevare la stessa specie animale, il cavallo. Si differenziano invece in funzione della razza, dell'indirizzo produttivo e dell'attività agonistica cui sono dediti.

La maggior estensione di terra la troviamo nell'allevamento da galoppo, a seguire quello da cutting e in fine quello da trotto. Infatti l'allevamento da galoppo dispone per ogni fattrice col puledro di quasi 8 mila mq, mentre l'azienda da cutting scende a 6 mila, per limitarsi nell'allevamento da trotto a soli 2 mila mq. Nei primi 2 casi, grazie all'estensione dei terreni in proprietà, c'è la possibilità di praticare il pascolo per fattrice e puledro per più tempo.

A livello dei fabbricati, come stalle e magazzini, troviamo analogie, tra l'allevamento da cutting e quello da galoppo. Entrambi presentano delle strutture in cemento armato di grande pregio e consistenza, ma con alcune differenze legate al tipo di specie e razza allevata e alla disciplina sportiva. In più l'allevamento di Quarter Horse presenta una struttura aggiuntiva per l'utilizzo agonistico del bestiame bovino-equino, chiamata arena, struttura non presente né nell'allevamento da trotto, né in quello da galoppo, inoltre questa azienda dispone di stalle per la sosta delle manzette.

L'allevamento da trotto non presenta stalle o fabbricati con le stesse caratteristiche precedenti, ma solo pochi box e diversi pascoli con ricoveri in strutture leggere per le intemperie, grazie alla posizione geografica e al clima che rendono agevoli i ricoveri dei cavalli in paddock per quasi tutto l'anno.

Alcune differenze si riscontrano anche per i macchinari: gli allevamenti da cutting e da galoppo sono ben attrezzati per poter ridurre lo sforzo fisico e velocizzare i lavori manuali, mentre nel trotto, per la ridotta estensione del corpo fondiario e la difficile praticabilità dei terreni, i lavori vengono eseguiti spesso manualmente.

Gli allevamenti che presentano un numero analogo di salariati sono l'azienda da galoppo e quella da cutting, quest'ultima presenta ben 6 salariati, mentre quella da galoppo dispone del lavoro di 5 salariati fissi e di 9 avventizi, l'intensità del lavoro manuale è data dall'elevato numero di capi presenti. All'interno di questi due allevamenti la gestione e l'organizzazione sono molto simili, nel senso che si

presenta sotto diversa identificazione una figura che funge da ponte tra i soci e il ciclo produttivo aziendale, però si sottolineano delle differenze date dalla presenza di più fattrici nell'allevamento da galoppo, rispetto a quello da cutting.

Per quanto riguarda la gestione riproduttiva, nel galoppo questa è affidata a tre figure: una per la ginecologia, una per la neonatologia a cui si aggiunge il direttore dell'allevamento. Mentre nell'allevamento da cutting questa funzione viene svolta dal solo "Ranch manager", che raccoglie e organizza tutte le informazioni da riferire al veterinario per ogni singola fattrice. Questo non accade nell'allevamento da galoppo, dove il medico veterinario assume un ruolo di presenza costante all'interno dell'allevamento, coadiuvato dall'assistente alla ginecologia.

Ma non dobbiamo dimenticare che l'allevamento da cutting, rispetto alle altre aziende che gestiscono solo equini, deve occuparsi di circa 80 manzette, e deve disporre di una forza lavoratrice anche per questa specie.

Passando all'analisi economica, vediamo che l'allevamento da trotto ottiene un reddito netto di 11.164 euro, quello da galoppo di 69.725 euro, mentre l'allevamento da cutting, presenta una perdita d'esercizio pari a 238.365 euro.

I risultati ottenuti dall'allevamento da cutting, pur essendo negativi, meritano ulteriori approfondimenti che ci consentono di capire le origini della perdita e i futuri sviluppi della gestione. Si tratta di individuare le cause che hanno portato a realizzare minori entrate da una parte e maggiori spese dall'altra.

Sul fronte delle entrate dobbiamo prendere in considerazione i seguenti aspetti:

- valore più contenuto dei capi venduti;
- minori entrate da scommesse e premi;
- minori entrate per lo scarso afflusso di pubblico (un'attività sportiva ancora poco conosciuta).

Per quando riguarda il fronte dei costi, l'allevamento da cutting è penalizzato dalle seguenti condizioni:

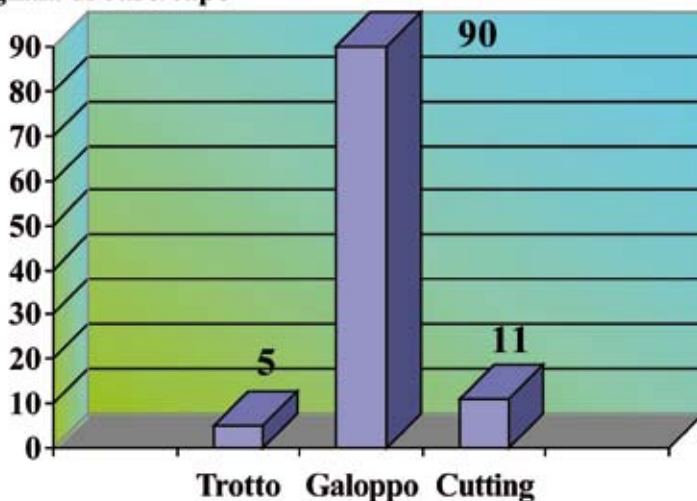
- attività pionieristica, di recente introduzione dall'estero, che è ancora alla ricerca di un assetto organizzativo e produttivo;
- costi aggiuntivi derivanti dalla necessità di disporre di bovini giovani per praticare il cutting;
- costi elevati per l'importazione dall'estero di capi selezionati di equini di razza Quarter Horse;
- costi elevati delle strutture che incidono sugli ammortamenti.

Ciò nonostante anche questo allevamento può avere delle prospettive future, anche se momentaneamente prevalgono le giustificazioni personali dei conduttori che si fanno carico del deficit aziendale, perchè ricompensati da benefici morali ed agonistici. In prospettiva esistono le condizioni per valorizzare i propri capi sul mercato con la diffusione della pratica agonistica del cutting in Italia ed in Europa. L'apertura di nuovi allevamenti potrà attingere dal patrimonio esclusivo di questo allevamento, ed esiste anche la prospettiva che una promozione della pratica sportiva possa trovare nuovi estimatori di pubblico nelle competizioni e sulle scommesse. Questa tipologia di azienda è infatti una delle poche realtà del comparto equino da competizione per il cutting in Italia di dimensioni ragguardevoli.

Le diverse tipologie di allevamento possono essere messe a confronto anche attraverso il valore medio delle fattrici, che rappresentano il potenziale di sviluppo delle aziende.

Graf. 3 - Valore medio delle fattrici

Migliaia di euro/capo



Un valore più elevato dei capi è sinonimo di solidità patrimoniale dell'allevamento e di maggiore prestigio, con ripercussione sulle prospettive future della redditività aziendale. La posizione di maggior rilievo è quella dei cavalli da galoppo che distanziano notevolmente nel valore dei capi gli altri tipi di allevamento. In ogni caso i cavalli da cutting hanno un valore più che doppio rispetto a quelli da trotto. Sono valori indicativi, perché ogni allevamento fa storia a sé, in funzione della selezione dei soggetti e del prestigio raggiunto nelle competizioni sportive.

Abbiamo voluto indagare anche sulle spese di mantenimento giornaliero (costi espliciti) per capo equino adulto tra i diversi allevamenti. L'allevamento da trotto presenta una spesa annua totale di 121 mila euro, spendendo per singolo capo adulto circa 17 euro al giorno. L'allevamento da galoppo sostiene una spesa complessiva di 634 mila euro, spendendo per ogni singolo capo adulto circa 26 euro al giorno. L'allevamento da cutting, sostenendo una spesa annua pari 508 mila euro, spende per singolo capo adulto circa 31 euro al giorno. Posto pari a 100 il costo giornaliero per capo dell'allevamento da trotto risulterebbe di 153 per quello da galoppo e di 183 per quello da cutting. Nell'ultimo allevamento gravano i forti costi per gli investimenti effettuati e la necessità di mantenere anche una mandria di bovini. Nel primo allevamento invece i costi sono più ridotti perché gli investimenti sono molto più contenuti ed è minore il fabbisogno di madopera.

Infine, va sottolineato ancora una volta che in tutti gli allevamenti esaminati è grande l'amore che i soci dedicano nella conduzione aziendale, a prescindere a volte dagli aspetti meramente economici.

7. ALCUNE CONCLUSIONI

Il patrimonio equino in Italia ha avuto una notevole contrazione a seguito del boom economico degli Anni '60, che ha visto la sostituzione del lavoro animale con quello meccanico. Anche gli equini da competizione ne hanno risentito perché lo sforzo economico della ricostruzione non lasciava spazi ad altri bisogni che non fossero quelli primari.

Il miglioramento economico degli ultimi decenni ha portato ad un maggiore benessere generale consentendo il soddisfacimento di nuovi bisogni, con l'affermarsi del cosiddetto "quarto settore", cioè quello del tempo libero, accanto ai classici settori: primario (agricoltura), secondario (industria) e terziario (servizi).

In questo nuovo contesto economico e sociale del Paese ha ripreso interesse l'impiego sportivo del cavallo, mentre quello funzionale al lavoro ha continuato e continuerà ad essere confinato alla salvaguardia delle relative razze equine, più che al loro impiego. La globalizzazione dei mercati e gli scambi internazionali hanno favorito inoltre l'espansione di razze equine e di pratiche sportive non usuali nel nostro Paese, dando inizio a nuove imprese di allevamento equino e a nuovi impieghi del cavallo.

Al di là delle generiche conoscenze sulla presenza e diffusione degli allevamenti equini da competizione in Italia, poco ci è dato conoscere sugli aspetti strutturali ed economici di questi allevamenti. Anche le fonti di informazione in merito sono scarse, come lo erano in passato, per la ridotta trasparenza di mercato del comparto equino, soprattutto di quello da competizione.

Da questi presupposti è maturata la convinzione di tentare un approccio economico anche verso le aziende di allevamento di equini da competizione, pur nella consapevolezza delle difficoltà e dei limiti ad entrare in queste realtà, in particolare nella loro componente economica. Abbiamo pertanto ritenuto opportuno limitare la nostra ricerca su alcuni casi di studio, non necessariamente rappresentativi statisticamente della realtà, ma significativi di tre tipologie di allevamenti sportivi da competizione:

- trotto
- galoppo
- cutting

Il lavoro di raccolta dei dati aziendali è stato condotto nel corso del 2008, tramite un questionario predisposto appositamente, che tenesse conto di queste particolari realtà imprenditoriali, che sono poco diffuse e trasparenti. Grazie alle conoscenze dirette ed indirette degli allevatori è stato possibile realizzare un approccio positivo e suscitare la collaborazione degli interlocutori per portare a termine l'indagine. Nel questionario si è cercato di acquisire le informazioni anche per via indiretta, per non turbare la suscettibilità e la privacy degli intervistati. A lavoro compiuto dobbiamo riconoscere la fattiva collaborazione degli allevatori, ai quali dobbiamo la nostra riconoscenza per la conduzione dell'indagine.

Per ognuna delle tre tipologie di allevamento abbiamo coinvolto una sola impresa, pertanto l'indagine ha riguardato tre casi aziendali. I dati raccolti con il questionario sono stati successivamente elaborati con il computer per ottenere l'analisi di gestione.

Dal questionario sono state individuate le caratteristiche strutturali ed organizzative dell'allevamento, dalle rilevazioni dei ricavi e delle spese è stato elaborato il bilancio economico. Inoltre, nelle successive elaborazioni dei dati, è stato possibile ottenere alcuni indici significativi del grado di efficienza degli allevamenti.

Gli allevamenti equini di più lunga tradizione, quali il trotto ed il galoppo, hanno dimostrato di avere acquisito una certa stabilità organizzativa e gestionale, che ha consentito loro di realizzare risultati economici positivi.

L'allevamento da cutting necessita invece di una analisi più approfondita, perché di recente introduzione, che ha comportato notevoli investimenti strutturali, ai quali si è aggiunto l'acquisto del nucleo di soggetti dall'estero, con ulteriori oneri. La funzione pionieristica di questo allevamento ha dovuto scontare nel corso del 2008 una notevole perdita.

Gli allevamenti equini da competizione puntano alla selezione di soggetti di alto pregio, che dalle esibizioni agonistiche vincenti danno lustro e prestigio all'allevamento. Infatti i valori di mercato dei soggetti campioni e della loro discendenza sono strettamente correlati, così dicasi per i premi delle vincite e le scommesse. Su tali presupposti è fondato lo zoccolo duro del volume d'affari dell'allevamento. Per differenziare le fonti di entrata e allargare il budget d'impresa, sono state introdotte le prestazioni di servizi che sono diverse per ogni tipologia di allevamento. Infatti i ricavi aziendali sono completati dai servizi di fecondazione, dalla pensione dei cavalli di terzi, in esibizioni, corsi ecc. In pratica, la differenziazione dei servizi, accanto alla finalità principale dell'impresa sopra citata, consente di fornire nuove prestazioni che rispondano alle aspettative dei nuovi utenti.

Sulla differenziazione delle fonti di entrata è particolarmente interessante l'allevamento da cutting, infatti questa tipologia di allevamento non può contare molto sul valore dei soggetti e quindi è spronato a ricercare forme alternative di ricavo, come effettivamente si sta attivando, per dare prospettive future all'impresa. Non bisogna per altro trascurare il fronte delle spese, il cui contenimento è legato ad una oculata gestione dell'allevamento, nella salvaguardia del benessere animale che, per i cavalli da competizione, è un prerequisite per ottenere risultati di alto prestigio.

Senza entrare nei particolari dei risultati di ciascun allevamento, ai quali si rimanda nel testo, è opportuno rilevare nelle conclusioni alcuni aspetti comuni:

- gli investimenti nelle strutture sono particolarmente curati e rivolti a migliorare il più possibile il benessere animale;
- la valorizzazione degli allevamenti è molto spinta, dove nulla viene lasciato al caso, alla ricerca dei migliori risultati possibili;
- la conduzione dell'allevamento avviene con personale qualificato e motivato al tipo di attività a cui è chiamato;
- la passione dei soci dell'allevamento per i cavalli e per le attività competitive è molto forte;
- il contributo di questi allevamenti all'incremento dell'occupazione fa da volano all'economia del territorio, che in certe condizioni rischiano l'emarginazione e l'abbandono.

I risultati che abbiamo ottenuto non sono esaustivi della conoscenza di queste tipologie di allevamento, ma rappresentano un primo tentativo di approfondimento, in attesa di ulteriori indagini e verifiche di quanto è emerso da questa prima ricerca.

Anche le politiche agricole stanno rivalutando il comparto equino da competizione e non, per il contributo che questo potrebbe dare in futuro all'economia agricola, con ripercussioni positive anche in altri settori produttivi per l'indotto.

La disponibilità nel futuro di maggior tempo libero da parte della popolazione attiva o a riposo potrebbe trovare uno sfogo proprio nel mondo dei cavalli.

Note: Lavoro eseguito con finanziamento FIL (ex quota 60%). Lo studio è frutto di un lavoro comune degli autori. Tuttavia in sede di stesura del testo A. Salghetti ha redatto i paragrafi 1 e 7, G. Ferri i paragrafi 2 e 3, P. Gambino i paragrafi 4, 5 e 6.

BIBLIOGRAFIA

1. Bassignana G. (1980): Riproduzione e allevamento del cavallo atleta. Associazione Nazionale Allevatori Cavalli purosangue, Milano.
2. Bonis C. (1887): Dell'industria equina in Italia. F.lli Bocca, Torino.
3. Bregoli A. (1987): Bilancio e contabilità nell'azienda agraria. Liviana Editrice, Padova.
4. Catalano A. L. (1993): Valutazione Morfo-funzionale del cavallo igiene ed Etnologia. SBM, Noceto.
5. Giacinti R., Tellarini V., Salvini E., Di Iacovo F., Andreoli M., Moruzzo, Olivieri D. (2002): Analisi e gestione economico-contabile per l'impresa agro-zootecnica. Franco Angeli, Milano.
6. Gratani L. (1983): Elementi di ippicoltura. Edagricole, Bologna.
7. Hartley E., Geddes G. (1996): Il manuale del cavallo. Edagricole, Bologna.
8. Rossini E., Vanzetti C. (1987): Storia dell'agricoltura italiana. Edagricole, Bologna.
9. Zucchi G. (2001): Economia del sistema delle produzioni animali. Avenue media, Bologna.
10. Associazione Nazionale Allevatori del Cavallo Trottatore (A.N.A.C.T.) (2004): L'allevamento ed il rilancio dell'ippica. Analisi e prospettive sulle aziende del trotto. Nomisma, Legall industria Grafica, Roma.
11. Associazione Scientifica di Produzione Animale (1994): Zootecnica e Nutrizione Animale (La produzione della carne di cavallo). Edagricole, Bologna.
12. Comune di Parma (1908): Capitolato Speciale d'appalto: Per la fornitura dei cavalli, cocchieri, palatrenieri, ecc, per il servizio Municipale dei trasporti Funebri. Premiate tipografie riunite Donati, Parma.
13. Irvam (1980): Stato e prospettive di sviluppo degli allevamenti equini da carne. Irvam, Roma.
14. ISTAT, Annuari di statistica agraria (1961, 1970, 1982, 1990, 2000), Roma
15. ISTAT, Censimenti generali dell'agricoltura (1961, 1970, 1982, 1990, 2000), Roma.

Siti informatici consultati

16. <http://www.aia.it>
17. <http://www.unire.it>
18. <http://www.istat.it>
19. <http://www.politicheagricole.it>
20. <http://www.aiqh.it>
21. <http://www.anacpurosangue.com>
22. <http://www.anact.it>
23. <http://www.anagrafeequidi.it>
24. <http://www.carabinieri.it>
25. <http://www.corpoforestale.it>
26. <http://www.esercito.difesa.it>

THE INFLUENCE OF ARAB GENES IN THE BARDIGIANO HORSE BREED *INFLUENZA DEL SANGUE ARABO NELLA RAZZA EQUINA BARDIGIANA*

VACCARI SIMONINI Franca¹, SABBIONI Alberto¹, BERETTI Valentino¹, VILLA
Marcello², MARTUZZI Francesca¹

Structured Summary

Objectives: Objective of this study was to survey the impact of an Arab stallion on the morphological traits of the Bardigiano Horse population.

Methods: The database comprised 2758 horses, 634 males and 2124 females, enrolled in the Stud Book. The horses were evaluated at a mean age of 30 months. The following measures were considered: withers height, cannon bone girth, thorax girth, shoulder length. Data were analyzed by the application of a model with percentage of Arab genes, sex, herd, birth year and interaction (Arab genes * sex) as fixed factors and age as covariate.

Results: Considering body measurements, Arab genes affect significantly withers height ($P < 0.001$) and slightly shoulder length with different trends in females and males. Cannon bone circumference is significantly smaller in females than in males, whatever the Arab genes percentage. The herd affects all considered traits very significantly ($P < 0.001$), and age influences mostly heart girth and shoulder length. Considering the scores of the synthetic morphological evaluation Arab genes affect the traits chest-thorax and limbs ($P < 0.05$ both). Sex influences limbs ($P < 0.001$), due to the selection made by the breeders among the males. The trait typicalness isn't affected by the Arab genes. The herd effect is significant for all traits except back-loin. Therefore, management conditions are at present really important for the expression of the conformation traits and more attention should be put on them.

Keywords

Horse; morphological traits; Arab stallion

INTRODUCTION

Bardigiano Horse (BH) is an ancient Italian equine breed, reared mainly in northern Italy, in the Appennine mountains of Emilia, Toscana and Liguria regions (Fioretti *et al.*, 2005). This population was bred mainly for meat production until 1993, when the Breeder Association decided to change the selection goals with the aim to obtain taller, lighter horses for saddle and light draft service (Catalano *et al.*, 2001; Martuzzi *et al.*, 2009). Since 1996 the traits are scored by a linear type evaluation and

¹ Department of Animal Production, Veterinary Biotechnology, Food Quality and Safety, University of Parma

² Veterinary; member of the Bardigiano Horse Breed Stud Book Technical Commission

since 2001 two genetic indexes, withers height index (IGA) and genetic global index (IGG), are used together as selection tools in the BH breed (Vaccari Simonini *et al.*, 2009). The inbreeding coefficient of the population is 4.4% in living horses (Sabbioni *et al.*, 2005). A study carried out in 2008 demonstrated that the BH has a fair genetic variability, as shown by the allele number and heterozygosity level, but the observed trend towards a reduction of variability suggests a careful genetic management of the population in order to avoid the risk of an excessive increase in the inbreeding level (Di Stasio *et al.*, 2008).

Importation of foreign genetic material has always occurred and the Stud Book has never been closed, similarly to other equine breeds (Thorén Hellsten *et al.*, 2009).

In 1993, to improve rapidly conformation and gaits of BH, an Arab stallion named Saadun was employed as sire to increase withers height and to confer more “distinction” to the breed (Catalano *et al.*, 1996). The Arab breed is very ancient and its conformation is a result of the adaptation process where the good morphology and endurance aptitude are present at the same time (Cervantes *et al.*, 2009). Therefore Arab stallions have been used to “improve” other equine breeds since centuries. The F1 generation, with 50% of Arab blood, is not accepted in the Stud Book and these horses are called “Bardarab”, but the mares with 25% of Saadun’s blood, mated with pure BH stallions, introduced Arab genes in the population and at present 165 horses with variable percentages of oriental blood are enrolled in the Stud Book. Aim of this study is to investigate the influence of the Arab genes in the BH population, whether the body traits were affected by the introduction of the genes of a taller, lighter, more saddle-type breed.

MATERIALS AND METHODS

The database provided by the BH Breeders Association comprised 2758 horses, all registered in the Stud Book, born from 1993 until 2007, 634 males and 2124 females.

The horses were evaluated at a mean age of 30 months. The considered measures are: Withers height, Cannon bone girth, Thorax girth, Shoulder length and the indexes: Dactyl thoracic index (cannon bone girth/ chest girth) and Conformation index (chest girth² / cannon bone girth) (McManus *et al.*, 2005).

Saadun’s body traits are: withers height: 155 cm; cannon bone girth: 19.5 cm; hearth girth: 170 cm; shoulder length: 70 cm.

Pure BH were compared to the horses with variable percentages of Arab blood, from 12.5% to 50%.

Analysis of variance was performed by the application of a GLM proc (SAS, 2003) with percentage of Arab genes (4 levels: 0, 12.5, 25, 50), sex (2 levels), herd (423 levels), birth year nested within percentage of Arab genes (32 levels) and Arab genes * sex interaction as fixed factors and age as covariate.

RESULTS

Body measures of the horses with different percentages of Arab blood are shown in Figure 1. Table 1 shows the analysis of variance (ANOVA) of body measures

and indexes. Arab genes affect significantly withers height ($P < 0.001$) and slightly shoulder length ($P < 0.10$) (Table 1), even if there are different trends in females and males (Fig. 1: A, D). Cannon bone circumference is significantly smaller in females than in males, whatever the Arab blood percentage (Table 1; Fig. 1: B). The herd affects all considered traits very significantly ($P < 0.001$), and age influences mostly thorax girth and shoulder length (Table 1).

Table 2 shows the ANOVA of the traits considered by the synthetic morphological evaluation, as affected by percentage of Arab blood and sex. Synthetic morphological evaluation is the final judgement which synthetizes in 10 items the scores (points from 0 to 10) of the 25 traits considered by the linear morphological evaluation and assigns a final total score for each horse (points from 0 to 100). Arab genes affect the traits Chest-Thorax and Limbs ($P < 0.05$ both) with different trends: the horses with oriental blood show lower values of the scores for Chest-Thorax, while for Limbs the scores are higher (shown in Table 3). Limbs are influenced in a clearer way by sex as well ($P < 0.001$). In the synthetic morphological evaluation the herd effect is significant for all traits (all: $P < 0.001$; Limbs: $P < 0.05$) except Back-Loin. Year of birth affects Chest-Thorax ($P < 0.001$).

Table 1. ANOVA analysis of body measures and indexes in Bardigiano horse.

	d.f	Height at withers	Cannon bone girth	Thorax girth	Shoulder length	Dactyl thoracic index	Conformation index
Arab genes	3	80.61***	0.56	41.40	15.75§	0.04	849.59*
Sex	1	1.07	6.46***	12.66	0.32	2.63**	136.96
Herd	462	12.46***	0.44***	95.26***	10.63***	0.31***	560.88***
Birth year	32	12.22*	0.50*	64.15	19.16***	0.25	349.14
Age	1	19.36	0.94§	1350.06***	80.87***	2.28**	7466.07***
Arab genes * sex	3	5.86	0.17	32.13	9.37	0.11	177.33
MSE	1021	7.70	0.31	52.41	6.90	0.21	310.66
R ²		0.49	0.60	0.48	0.48	0.49	0.48

§: $P < 0.10$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Table 2. ANOVA analysis for synthetic morphologic evaluation.

	Arab genes	Sex	Herd	Birth year	Age	Arab genes * sex	MSE	R ²
df	3	1	462	32	1	3	1021	
Typicalness	0.36	0.53	0.40***	0.20	0.17	1.17	0.22	0.46
Coat color	0.20	0.28	0.24***	0.17	0.15	0.04	0.15	0.46
Development	0.29	0.07	0.44***	0.37	0.38	0.04	0.32	0.40
Head	0.32	0.15	0.34***	0.20	0.12	0.02	0.20	0.46
Neck-shoulder	0.18	0.00	0.38***	0.30	0.40	0.06	0.25	0.44
Chest-thorax	0.62*	0.92*	0.29***	0.47***	0.20	0.78*	0.22	0.42
Back-loin	0.04	0.13	0.18	0.19	0.00	0.10	0.19	0.35
Croup	0.61	0.49	0.36***	0.34	0.00	0.56	0.26	0.42
Limbs	0.17*	0.64***	0.06*	0.05	0.04	0.25**	0.05	0.38
Gaits	0.06	0.02	0.18*	0.21	0.04	0.15	0.15	0.38
Total score (*)	4.42	0.02	8.76***	5.20*	0.03	1.91	3.45	0.59

* : P<0.05; ** : P<0.01; *** : P<0.001

In Table 3 the scores for the traits considered by the synthetic morphological evaluation are shown. As already observed in Table 2, the greatest difference (P<0.001) appears between the scores of Limbs of males and females, with the mean score of males higher than that of females. Typicalness doesn't show a significant trend toward lower values for the horses with higher Arab blood percentage, even if the scores of these horses are anyhow lower in comparison with the pure BH.

Table 3. Synthetic morphologic evaluation (points from 0 to 10), as affected by rate of Arab genes and sex (least squares means \pm s.e.).

	Arab genes				Sex	
	0	0.125	0.25	0.5	Male	Female
Typicalness	8.00 \pm 0.02	7.65 \pm 0.22	7.91 \pm 0.15	7.73 \pm 0.16	7.68 \pm 0.14	7.96 \pm 0.10
Coat color	8.01 \pm 0.02	7.81 \pm 0.18	8.16 \pm 0.13	7.86 \pm 0.13	8.06 \pm 0.12	7.86 \pm 0.08
Development	8.01 \pm 0.03	7.99 \pm 0.27	8.14 \pm 0.19	8.31 \pm 0.19	8.16 \pm 0.17	8.06 \pm 0.12
Head	7.94 \pm 0.02	7.70 \pm 0.21	8.18 \pm 0.15	8.07 \pm 0.15	8.05 \pm 0.13	7.90 \pm 0.09
Neck-shoulder	8.17 \pm 0.02	8.20 \pm 0.23	8.29 \pm 0.16	8.41 \pm 0.16	8.27 \pm 0.15	8.26 \pm 0.10
Chest-thorax	8.20 \mathbf{b} \pm 0.02	8.04 \mathbf{ab} \pm 0.22	8.20 \mathbf{b} \pm 0.15	7.75 \mathbf{a} \pm 0.15	7.86 \mathbf{a} \pm 0.14	8.24 \mathbf{b} \pm 0.10
Back-loin	8.06 \pm 0.02	8.14 \pm 0.20	8.13 \pm 0.14	7.99 \pm 0.14	8.15 \pm 0.13	8.01 \pm 0.09
Croup	8.16 \pm 0.02	8.49 \pm 0.24	8.27 \pm 0.17	7.80 \pm 0.17	8.04 \pm 0.15	8.32 \pm 0.11
Limbs	7.99 \mathbf{a} \pm 0.01	8.18 \mathbf{ab} \pm 0.10	8.20 \mathbf{b} \pm 0.07	8.00 \mathbf{ab} \pm 0.07	8.25 \mathbf{B} \pm 0.70	7.94 \mathbf{A} \pm 0.04
Gaits	7.91 \pm 0.02	7.95 \pm 0.18	8.05 \pm 0.13	7.89 \pm 0.13	7.98 \pm 0.12	7.92 \pm 0.08
Total score (*)	80.49 \pm 0.09	80.26 \pm 0.87	81.50 \pm 0.61	79.92 \pm 0.61	80.57 \pm 0.56	80.51 \pm 0.39

A,B: P<0.001; a,b: P<0.05 ; (*) points from 0 to 100

In Table 3 males' Limbs score is significantly higher than that of females. This is probably due to a kind of pre-selection carried out by the breeders: only the best males are presented for the Stud Book evaluation, those considered not morphologically satisfying are sent early to the slaughter, while this doesn't happen for the females. Males are indeed less numerous than females (634 versus 2124).

Similarly to what happened in other breeds, several supporters of the BH were worried about the introduction of Arab blood, fearing an excessive lightening of this ancient and resistant work breed. Results show that Saadun's genes influenced significantly only Height at Withers, while other traits didn't show a clear effect due to the Arab blood introduction. Surprisingly, even the trait Typicalness doesn't seem affected by the oriental genes.

On the other hand, a very significant effect of the herd was observed in every trait, demonstrating that the management conditions are at present really important for the expression of the conformation traits and more attention should be put especially on feeding, rearing, health conditions and welfare.

Acknowledgements

The Authors thank the technicians of the Bardigiano Horse Breeders Association for their kind collaboration.

REFERENCES

1. Catalano A. L., Martuzzi F., Bertoli A. (1996) Incrocio Purosangue Arabo x Cavallo Bardigiano: rilievi biometrici. *Annali Fac. Med. Vet. Parma* XV, 271-276.
2. Catalano A.L., Martuzzi F., Summer A. (2001) Morpho-aptitudinal evaluation for saddle service of Bardigiano horse breed stallions. In: *Recent Progress in Animal Production Science. 2. Proceedings of the A.S.P.A. XIV Congress*, pp 641-643.
3. Cervantes I., Baumung R., Molina A., Druml T., Gutiérrez J.P., Sölkner J., Valera M. (2009) Size and shape analysis of morphofunctional traits in the Spanish Arab horse. *Livestock Science* 125, 43-49
4. Di Stasio L., Perrotta G., Blasi M., Lisa C. (2008) Genetic characterization of the Bardigiano horse using microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science* 7, 243-250.
5. Fioretti M., Catalano A. L., Rosati A., Martuzzi F. (2005) Bardigiano Horse selection: a genetic global index for linear type traits. In: *Conservation genetics of endangered horse breeds*. Eds I. Bodò, L. Alderson, B. Langlois. EAAP Scientific Series n°116, Wageningen Pers, pp 147-154
6. Martuzzi F., Ranieri A., Gosi S., Vaccari Simonini F., Catalano A.L. (2009) Two-dimensional kinematics in gait evaluation of Bardigiano Horse breeding stock. *Italian Journal of Animal Science* 8 (2) 718-720
7. McManus C., Arruda Falcão R., Spritze A., Costa D., Louvandini H., Talarico Dias L., de Almeida Teixeira R., de Mello Rezende J., Soares Garcia J. A. (2005) Caracterização Morfológica de Equinos da Raça Campeiro. *R. Bras. Zootec.*, 34 (5) 1553-1562

8. Sabbioni A., Beretti V., Zanon A., Pagani G.P., Superchi P., Bonomi A., Filippini S., Catalano A. L. (2005) Demographic characterization and genetic variability of Bardigiano Horse breed from genealogical data. Proc. SISVET 2005, pp. 451-452
9. Thorén Hellsten E., Näsholm A., Jorjani H., Strandberg E., Philipsson J. (2009) Influence of foreign stallions on the Swedish Warmblood breed and its genetic evaluation. *Livestock Science* 121, 207-214
10. Vaccari Simonini F., Catalano A. L., Martuzzi F. (2009) Bardigiano Horse breed evolution. Proc. 11° Convegno “*New findings in equine practice*”, Druento Torino 3-4 dicembre 2009, pp 8-12

*Finito di stampare
nel mese di gennaio 2011
da Toriazzi S.r.l. Parma*