

## **SURVIVAL ANALYSIS IN EPIDEMIOLOGY: A BRIEF INTRODUCTION.**

Parodi Stefano <sup>1</sup>, Bottarelli Ezio <sup>2</sup>

### **KEYWORDS**

Survival analysis, Kaplan-Meier method, log-rank test, Cox model

### **PAROLE CHIAVE**

Analisi della sopravvivenza, metodo di Kaplan-Meier, log-rank test, modello di Cox

### **SUMMARY**

In both Human and Veterinary Epidemiology there is often the need of comparing the survival experience of group of individuals identified on the basis of specific characteristics, including exposure to environmental toxics, infective agents and medical treatments. In this review the Kaplan-Meier method is illustrated to estimate the survival probabilities in simple cases and to plot the corresponding survival curves. The log-rank test for the comparison of the corresponding survival probabilities is also illustrated. Furthermore, a brief introduction to the Cox regression model, which allows to estimate the effect of more predictors at the same time, is also provided. Applications of these methods are illustrated using data from an *ad hoc* simulated data set of 200 animals and two predictors (*i.e.*, treatment and mitotic activity).

Statistical tools introduced in this review represent the most largely applied approach to survival analysis until today, and they can be considered as the basis of most more complex statistical models developed in recent years.

### **RIASSUNTO**

Sia nell'Epidemiologia Umana che in quella Veterinaria si presenta spesso l'esigenza di confrontare la sopravvivenza di gruppi di individui identificati sulla base di specifiche caratteristiche come, ad esempio, esposizioni ad inquinanti ambientali, agenti infettivi e trattamenti medici. Nella presente review viene illustrato il metodo di Kaplan-Meier per la stima della probabilità di sopravvivenza in situazioni semplici e il metodo per la realizzazione dei grafici corrispondenti. Viene inoltre illustrato il log-rank test per il confronto tra le corrispondenti

---

1 Italian Neuroblastoma Foundation, c/o Epidemiology and Biostatistics Section, Scientific Directorate, G. Gaslini Children's Hospital, Largo G. Gaslini, 5, 16147 Genoa (Italy); e-mail: stefanoparodi@ospedale-gaslini.ge.it

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

probabilità di sopravvivenza e viene fornita una breve introduzione al modello di regressione di Cox, che permette di stimare l'impatto simultaneo di diversi fattori sulla sopravvivenza. Tali metodologie sono esposte mediante esempi con dati simulati in un data set prodotto *ad hoc*, comprendente 200 animali e due predittori (trattamento e attività mitotica).

Le metodologie presentate in questa review sono quelle di gran lunga più applicate ancora oggi nell'analisi della sopravvivenza, e costituiscono la base per la maggior parte dei complessi modelli statistici recentemente sviluppati in ambito biomedico.

## INTRODUCTION

Many studies are aimed at evaluating the difference in survival probabilities between two or more conditions. In particular, in Human Epidemiology, survival analysis is commonly applied in the clinical setting to compare different treatments in terms of efficacy and side effects. In observational studies, survival analysis may be applied to evaluate the impact of different risk factors (*e.g.*, exposure to pollutants, diet, genetic factors) on exposed populations compared with unexposed ones (Breslow and Day, 1981; Kleinbaum *et al* 1982, Parodi and Bottarelli, 2004). In Veterinary Epidemiology, survival analysis has been used in different contexts referring to several animal species. However, the main field of application of such analysis is represented by the study of evolution of neoplastic diseases in dogs and, to a lesser extent, in cats.

In survival analysis, the outcomes of interest may include events other than mortality, *i.e.* incidence of specific disease in environmental studies and relapse or progression in clinical setting. However, for historical reasons, events of interest are usually referred as “deaths” and the length of observation period for each subject as “survival time” (Newman, 2001).

Statistical methods for survival analysis have been developed in the framework of the cohort study design, in which a group of individuals are selected and followed up until either the occurrence of the event of interest or the end of the observation period (Breslow and Day, 1981; Parodi and Bottarelli, 2004). In this framework, survival probability may be modeled considering the follow up time  $T$  for each subject as a random variable. For each fixed time  $t$ , selected within the follow up period, survival probability may be defined as:

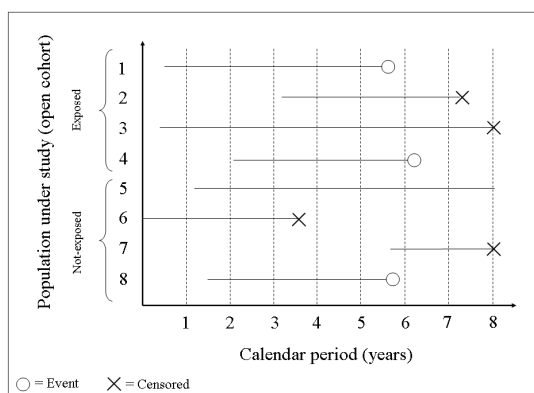
$$S(t) = P(T > t) \tag{1}$$

Because equation (1) represents a cumulative probability,  $S(t)$  is also named “cumulative survival” (or “cumulative survival probability”). For definition,  $S(0) = 1$ , and  $S(t)$  is a non increasing function of  $t$ . Reminding that a cumulative risk  $R(t)$  represents the probability that one event occurs during the observation period (Kleinbaum *et al*, 1982; Parodi and Bottarelli, 2004), the following relationship does exist between  $S(t)$  and  $R(t)$ :

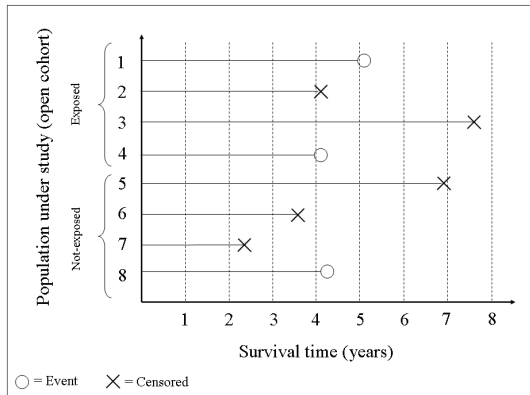
$$S(t) = 1 - R(t) \quad (2)$$

If each individual in the cohort is observed for the whole follow up period unless the event of interest occurs (closed cohort),  $R(t)$  may be easily estimated as the proportion of events occurring before each considered time  $t$ , and  $S(t)$  may be directly estimated by equation (2). However, in general, individuals are observed for different times, because either they may enter into the study at different calendar periods or they may be lost to follow up or excluded from the study for other reasons, which may include: deaths for toxicity or for external causes, the lost of a target organ due to an accident or a competing disease, the refuse to remain in the cohort under study, and migration to other countries (Breslow and Day, 1987). In an open cohort, the presence of incomplete observational times for some subjects prevents survival probabilities to be directly estimated. Such incomplete times are called “censored” and their presence is named “censoring”, while observation times for subjects that are alive and free of event at the end of follow up are called “truncated times” or administrative censoring (Cox, 1972; Hosmer and Lemeshow, 1999; Marubini and Valsecchi, 2004). An example of data from a hypothetical cohort study is provided in Figure 1, A and B. However, most statistical techniques do not distinguish between administrative and not-administrative censoring, and in this review we will refer to both as “censored time”. The large majority of statistical techniques in survival analysis assumes that the censoring process is “uninformative”, *i.e.*, the subjects with censored time are considered as a random sample of the cohort that survived at that time (Hosmer and Lemeshow, 1999; Marubini and Valsecchi, 2004).

**Figure 1** – Follow up time for censored survival data (open cohort). Panel A: follow up time as calendar period; Panel B: follow up time as survival time.



A)



B)

A general relationship between  $S(t)$  and  $t$  may be derived from the definition of hazard, which represents a central concept in survival analysis. Hazard is a relative instant rate and represents the probability that an event occurs in a very small (“infinitesimal”) time interval divided by the time interval itself. In order that an event occurs in a defined interval time, the subject that will experience such event must be alive and still under study at the beginning of this interval time. As a consequence, hazard may be formally defined in terms of conditional probability as follows:

$$h(t) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T < t + \varepsilon | T \geq t)}{\varepsilon} \tag{3}$$

From equation (3) the following relation between  $h(t)$  and  $S(t)$  is obtained (Newman, 2001; Hosmer and Lemeshow, 1999; Marubini and Valsecchi, 2004):

$$h(t) = \frac{f(t)}{S(t)} \tag{4}$$

where  $f(t)$  represents the derivative of  $-S(t)$  respect to  $t$  that, according to equation (2), also corresponds to the derivative of  $R(t)$  respect to  $t$ . Thus  $f(t)$  represents the instantaneous probability that a subject that is still under observation at time  $t$  had an event just at  $t$ . From equation (4) the following general relationship between  $S(t)$  and  $t$  is obtained (Newman, 2001):

$$S(t) = e^{-\int_0^t h(u) du} \quad (5)$$

Survival data may be resumed by assigning each subject  $i$  with a time  $t_i$  of follow-up and a dummy variable  $\delta_i$  (often referred to as the subject “status”), usually taking value 0 if the time is censored and 1 if the subject died during the observation period. As an example, Table 1 shows the data in Figure 1, sorted in ascending order, where the symbol “\*” represents a censored time<sup>1</sup>, while Table 2 shows the same data in a format suitable for statistical analysis.

**Table 1.** Data in Figure 1B with survival time sorted in ascending order.

Exposure	Num	Survival time
Exposed	4	3.9, 4*, 5, 7.5*
Not-exposed	4	2.1*, 3.5*, 4.1, 6.9*

Num = number of subjects.

**Table 2.** Data in Figure 1B arranged for statistical analysis.

ID	Exposure	Time	Status ( $\delta$ )
1	1	5.0	1
2	1	4.0	0
3	1	7.5	0
4	1	3.9	1
5	0	6.9	0
6	0	3.5	0
7	0	2.1	0
8	0	4.1	1

Exposure: 0=not, 1=yes; Status: 0=censored, 1= event.

Under the assumption of uninformative censoring, the unconditional likelihood of the observations is:

$$L(t_i) = \prod_{i=1}^N S(t_i)^{1-\delta_i} f(t_i)^{\delta_i} = \prod_{i=1}^N S(t_i) h(t_i)^{\delta_i} \quad (6)$$

<sup>1</sup> Often the symbol “+” is used instead of “\*”.

Hazard function  $h(t)$  is more often used than  $S(t)$  and  $f(t)$  to compare mortality between groups at specified time points, because  $h(t)$  takes into account only patients that have survived until  $t$  (equation (3)). Many models in survival analysis assume that the ratio between two hazard (hazard ratio, HR) is at less approximately constant for each time  $t$  within the follow up period. In such a context, HR is usually employed as a measure of impact or of association in open cohort studies, similar to the risk ratio, the odds ratio or the rate ratio (Kleinbaum *et al.*, 1982; Parodi and Bottarelli, 2004). In fact, it can be demonstrated that HR represents an estimate of the relative risk (RR) to die between the time  $t$  and the time  $t+\varepsilon$ , where  $\varepsilon$  represents a very small time interval (*i.e.*, an “instant”), conditional to be alive at the time  $t$  (the reader may refer to Newman, 2001, Appendix F, pag. 339-341, for a formal demonstration):

$$HR = \frac{h_1(t)}{h_2(t)} \quad (7)$$

Under the proportional hazard (PH) assumption, the following relationship between  $S_1(t)$  and  $S_2(t)$  may also be demonstrated (Newman, 2001):

$$S_0(t) = [S_1(t)]^{HR} \quad (8)$$

## ESTIMATING A SURVIVAL CURVE: THE KAPLAN-MEIER APPROACH

A survival curve displays the relationship between survival probabilities and follow up time. In the analysis of real data, such estimates may be obtained by splitting the follow up time into different intervals. The actuarial method is based on intervals *ad hoc* selected, while in the Kaplan-Meier (KM) approach (Kaplan and Meier, 1958), intervals are determined on the basis of the observed death times. In this short review only the KM method will be illustrated, because it represents the most commonly used technique in biomedical studies. If the follow up time is measured on a continuous scale, a cohort of  $N$  subjects will contain  $N$  distinct times. It should be noted that in real data, time is rarely measured on a true continuous scale, because deaths (or other events) are usually registered at least on a daily basis. As a consequence, some coincident values (called the “ties”) may occur. However, if ties are not very frequent, bias in survival estimates may be considered as negligible and the KM method may be applied.

The KM method subdivides the whole follow up time into  $k$  intervals, corresponding to uncensored times, *i.e.*, that times at which one death occurs. The probability to die at the time  $t_i$  is simply estimated as the ratio between the number of death  $d_i$  observed at  $t_i$  (in general only 1) divided by the number  $n_i$  of subjects at risk immediately before  $i$ :

$$\hat{r}_i = \frac{d_i}{n_i} \quad (9)$$

In the presence of censoring in the interval time  $\{t_{i-1}, t_i\}$ ,  $n_i = n_{i-1} - d_{i-1} - c_{i-1}$ , where  $d_{i-1}$  is the number of deaths at  $i-1$ , and  $c_{i-1}$  is the number of censored times between  $t_{i-1}$  and  $t_i$ . The survival probability  $s_i$  to be alive after  $i$ , conditional to have survived at least until  $t_i$  is:

$$\hat{s}_i = 1 - \hat{r}_i = \frac{n_i - d_i}{n_i} \quad (10)$$

$S(t)$  is easily estimated by applying the rule of the product of independent probabilities:

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_{(i)} \leq t} \hat{s}_i \quad (11)$$

Table 3 shows the life table obtained by the KM method applied to data in Figure 1 and also reported in Table 1 and in Table 2. This analysis and all other statistical analyses in this review have been performed by Stata statistical package (release 9.2, Stata Corporation, College Station, TX, USA). In Table 3, 95% confidence intervals (95%CI) of survival estimates have been obtained by the method by Kalbfleisch and Prentice (1980), which assumes an approximate Normal distribution for  $\log[-\log(S(t))]$ :

$$\left[ \log(-\log \underline{S}(t)); \log(-\log \bar{S}(t)) \right] = \log(-\log(S(t))) \pm 1.96 \sqrt{V\hat{a}r[\log(-\log S(t))]} \quad (12)$$

where:

$$V\hat{a}r(\log(-\log S(t))) = \frac{1}{\{\log[S(t)]\}^2} \sum_{t_{(i)} \leq t} \frac{d_i}{n_i(n_i - d_i)} \quad (13)$$

The function  $\log[-\log(S(t))]$  is usually called “the log-minus-log” or “the complementary log-log” function (sometimes abbreviated in “cloglog”).

**Table 3** – Life table obtained by the Kaplan-Meier method using data in Figure 1 and Table 2.

Time (years) $t_i$	$n_i$	Failure	Lost	Survival probability	SE	95%CI
<i>Not exposed</i>						
$t_{1,NE}$ : 2.1	4	0	1	1.000	-	-
$t_{2,NE}$ : 3.5	3	0	1	1.000	-	-
$t_{3,NE}$ : 4.1	2	1	0	0.500	0.3536	0.0060-0.9104
$t_{4,NE}$ : 6.9	1	0	1	0.500	0.3536	0.0060-0.9104
<i>Exposed</i>						
$t_{1,E}$ : 3.9	4	1	0	0.7500	0.2165	0.1279-0.9605
$t_{2,E}$ : 4.0	3	0	1	0.7500	0.2165	0.1279-0.9605
$t_{3,E}$ : 5.0	2	1	0	0.3750	0.2864	0.0110-0.8080
$t_{4,E}$ : 7.5	1	0	1	0.3750	0.2864	0.0110-0.8080

$n_i$  = number of subjects at risk immediately before  $t_i$ . Failure=number of events; Lost=number of censored times, SE=Standard Error; 95%CI= 95% confidence intervals of survival probability.

Equation (13) can be derived from the Greenwood formula (Newman, 2001):

$$\text{Var}[\hat{S}(t)] = [\hat{S}(t)]^2 \sum_{t(i) \leq t} \frac{d_i}{n_i(n_i - d_i)} \quad (14)$$

that has been used to estimate standard errors (SE) in Table 3, which are simply obtained from the squared root of  $\text{Var}[S(t)]$ . For example, at the first time in the exposed group corresponding to  $t_{1,E}=3.9$ ,  $n_1 = 4$ ,  $d_1 = 1$  and  $S(t_{1,E}) = 0.75$ ; from the squared root of equation (14) the following estimate is obtained:

$$SE[\hat{S}(t_{1,E})] = 0.75 \sqrt{\frac{1}{4 \cdot (4-1)}} = 0.2165$$

that corresponds to the standard error reported in Table 3. For  $i=3$  in the same sub-cohort ( $t_{3,E}=5.0$ ), the following estimate is obtained:



$$SE[\hat{S}(t_{3,E})] = 0.375 \sqrt{\frac{1}{4 \cdot (4-1)} + \frac{0}{3 \cdot 2} + \frac{1}{2}} = 0.2864$$

It may be noted that survival estimates and their variance do not depend on the value of each survival time ( $t_i$ ), but only on their relative position (rank). In fact, KM method belongs to the distribution free (“non-parametric”) statistical techniques. It may be also noted that censored times do not contribute to such estimates; however, they must be taken into account to calculate the number of subjects at risk at  $t_i$ . From equation (13):

$$\hat{Var}(\log(-\log S(t_{3,E}))) = \frac{1}{\{\log(0.375)\}^2} \left( \frac{1}{4 \cdot (4-1)} + \frac{0}{3 \cdot 2} + \frac{1}{2} \right) = 0.6064$$

Applying equation (12) the following 95%CI for the value of the cloglog function are obtained:

$$\begin{aligned} & \left[ \log(-\log \underline{S}(t_{3,E})); \log(-\log \bar{S}(t_{3,E})) \right] = \\ & \log(-\log(0.375)) \pm 1.96 \sqrt{0.6064} = [-1.5456; 1.5069] \end{aligned}$$

Applying twice the anti-logarithm function (and changing the sign before the last application), the following values are obtained: [0.0110; 0.8080], which correspond to those reported in Table 3. Finally, survival curves corresponding to the KM estimates reported in Table 3 are shown in Figure 2. Steps in each curve are generated for not censored times, corresponding to the events occurrence.

In the absence of censoring between time 0 and time  $t$ , the KM method (equation 11) provides the following estimate of survival probability that represents the estimate of the binomial probability to survive between 0 and  $t$  for a cohort of  $n_0$  individuals:

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_i \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} = \left( \frac{n_0 - d_0}{n_0} \right) \left( \frac{n_1 - d_1}{n_1} \right) \dots \left( \frac{n_{(t)} - d_{(t)}}{n_{(t)}} \right) = \left( \frac{n_0 - d_0}{n_0} \right) \left( \frac{n_1 - d_1}{n_0 - d_0} \right) \dots \left( \frac{n_{(t+1)}}{n_{(t-1)} - d_{(t-1)}} \right) = \frac{n_{(t+1)}}{n_0}$$

where “(t)” indicates the  $i$  value corresponding to the time  $t$ . Using a similar approach, it is possible to verify that in the absence of censoring the Greenwood estimator (equation (14)) represents the estimate of a binomial variance (Newman, 2001, pag. 174).

**Figure 2** – Kaplan-Meier survival curves corresponding to data in Table 1 and in Figure 1. Vertical bars indicate censored times. id = identification number in Figure 1.

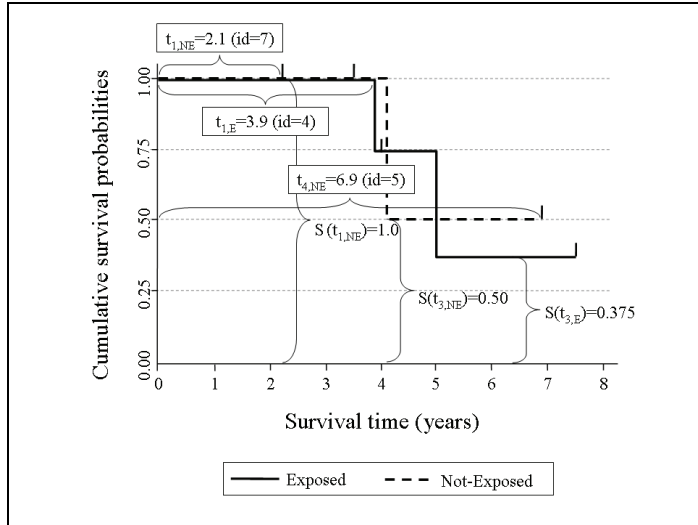


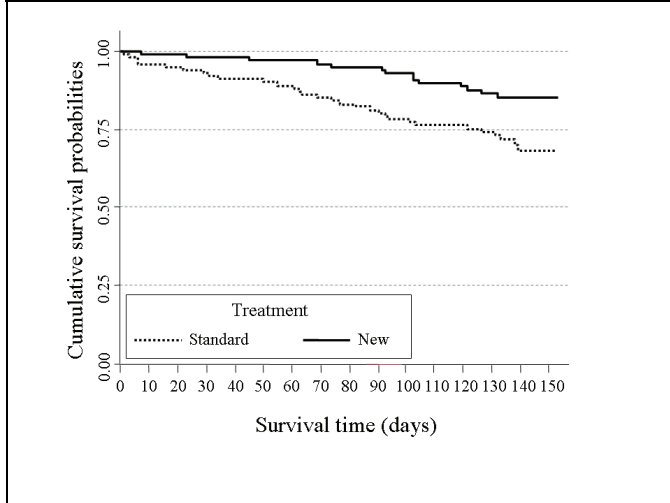
Table 4 reports on a more realistic example using simulated data in a hypothetical survival analysis aimed at evaluating the effect of a new treatment in a group of dogs affected by a neoplastic disease. Furthermore, the possible impact of the mitotic activity of cancer cells is also evaluated. Figure 3 reports the corresponding KM curves for the evaluation of the effect of the new treatment compared with a standard one, while Figure 4 reports the corresponding curves for the impact of the mitotic activity. In both cases an effect of the two considered variables seems to be present, with dogs treated with the new therapy showing a better survival (Figure 3), and dogs with a high mitotic activity showing a poorer course (Figure 4). A formal test to evaluate the statistical significance of the observed differences will be illustrated in the next paragraph.

**Table 4.** Simulated data from a hypothetical trial to evaluate the efficacy of a new treatment and the impact of the mitotic activity in a group of dogs affected by a neoplastic disease.

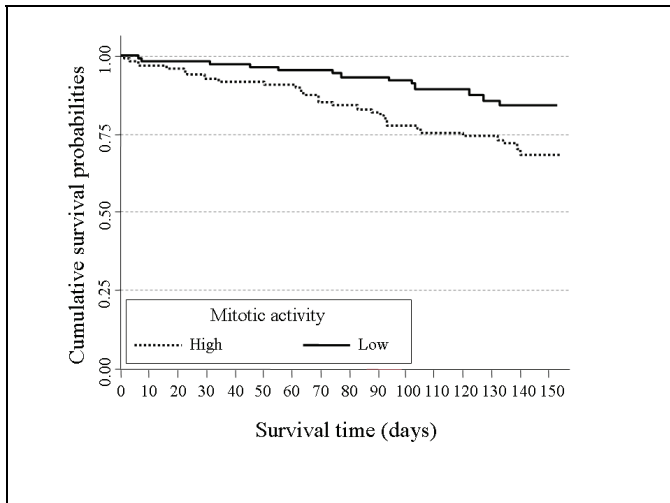
Treatment	Mitotic activity	Num	Survival time (days)
New	Low	55	7, 45, 74, 100*, 103, 103, 122, 127*, 127*, 127, 128*, 129*, 130*, 130*, 131*, 131*, 132*, 132*, 132*, 133*, 133*, 134*, 134*, 135*, 136*, 137*, 137*, 137*, 138*, 139*, 139*, 140*, 140*, 140*, 141*, 142*, 143*, 145*, 145*, 146*, 146*, 146*, 147*, 147*, 147*, 148*, 148*, 149*, 150*, 150*, 151*, 151*, 152*, 153*, 153*
	High	45	13*, 13*, 16*, 23, 67*, 69, 92, 93, 105, 115*, 120, 129*, 131*, 131*, 131*, 131*, 132*, 132*, 133*, 134*, 135*, 135*, 136*, 136*, 137*, 137*, 139*, 140*, 140*, 140*, 141*, 141*, 141*, 144*, 145*, 146*, 146*, 147*, 147*, 148*, 149*, 152*, 152*, 153*, 154*, 154*
Standard	Low	48	6, 31, 55, 77, 94, 102, 122, 127, 127*, 127*, 128*, 128*, 129*, 130*, 131*, 131*, 131*, 131*, 134*, 134*, 135*, 135*, 136*, 137*, 138*, 138*, 138*, 139*, 140*, 141*, 141*, 142*, 143*, 143*, 143*, 144*, 145*, 147*, 147*, 147*, 148*, 148*, 149*, 149*, 149*, 152*, 152*
	High	52	1, 3, 6, 16, 22, 29, 34, 50, 61, 63, 64, 69, 74, 83, 88, 91, 93, 104, 127*, 132, 134*, 134*, 134*, 135*, 135*, 136*, 136*, 137*, 137*, 137*, 138*, 139, 140*, 140*, 141*, 141*, 141*, 142*, 144*, 144*, 144*, 145*, 148*, 149*, 150*, 152*, 152*, 153*, 153*, 153*, 153*

Num = number of dogs at the beginning of follow up ( $t_0$ ).

**Figure 3.** Kaplan-Meier survival curves to evaluate the effect of a hypothetical new treatment compared with a standard therapy (simulated data, Table 4).



**Figure 4.** Kaplan-Meier survival curves to evaluate the impact of mitotic activity (simulated data, Table 4).



## COMPARING SURVIVAL CURVES: THE LOG-RANK TEST

Under the assumption of PH, a RR estimate may be obtained from two survival curves using the method proposed by Mantel and Haenszel (1959) for stratified analysis of case-control studies and further adapted to survival analysis by Mantel and Cox (Mantel, 1966; Cox, 1977; Peto and Peto, 1977). Difference between two survival curves may be assessed testing the null hypothesis  $H_0: HR = 1$ . The MH test, when applied to survival curves is commonly named “the Mantel Cox test” or, after Peto and Peto (1977), “the log-rank test”. More details about the MH procedure and its application to survival analysis may be found in our previous paper (Parodi and Bottarelli, 2007) and in Grassi (1994). Briefly, data from a simple survival analysis may be represented in a table as Table 5.

**Table 5** – Data from a survival analysis comparing two groups of individuals (*e.g.*, treated vs. untreated, or exposed vs. unexposed).

Follow-up time (t)	Groups under studies	At risk (live at t)	Dead at t	Total subjects at t
$t_i$	Group 1	$m_{1,i}$	$n_{1,i}$	$Tot_{1,i}$
	Group 2	$m_{2,i}$	$n_{2,i}$	$Tot_{2,i}$
	Total	$m_i$	$n_i$	$Tot_i$

MH test for KM survival data based on  $N$  survival times is obtained as follows:

$$\chi_{MH}^2 = \frac{\left[ \sum_{i=1}^N n_{1,i} - \hat{E} \left( \sum_{i=1}^N n_{1,i} \right) \right]^2}{\sum_{i=1}^N \hat{V} \hat{a} r(n_{1,i})} \quad (15)$$

where:

$$\hat{E} \left( \sum_{i=1}^N n_{1,i} \right) = \sum_{i=1}^N \hat{E}(n_{1,i}) = \sum_{i=1}^N \frac{Tot_{1,i}}{Tot_i} n_i$$

and:

$$\sum_{i=1}^N \hat{V} \hat{a} r(n_{1,i}) = \sum_{i=1}^N n_i \frac{Tot_{1,i} Tot_{2,i}}{Tot_i^2}$$

and the MH test follows a chi square distribution with 1 degree of freedom.

An estimate of relative risk between treated and untreated subjects may be obtained via the MH odds ratio (Mantel and Haenszel, 1959), which was demonstrated to be equivalent to a hazard ratio (Grassi, 1994; Newman, 2001).

$$\hat{HR}_{MH} = \frac{\sum_{(1)} E_{2,i}}{\sum_{(2)} E_{1,i}} \quad (16)$$

where:  $\Sigma_{(1)}$  indicates the sum of expected deaths in the group 2 corresponding to the observed deaths in the group 1, while  $\Sigma_{(2)}$  indicates the sum of expected deaths in the group 1 corresponding to the observed deaths in the group 2.

An approximated estimate of the variance of  $\log(HR_{MH})$  may be obtained from the following formula:

$$Var[\log(\hat{HR}_{MH})] \cong \frac{\sum E_{1,i} \cdot E_{2,i}}{(\sum_{(1)} E_{2,i})(\sum_{(2)} E_{1,i})} \quad (17)$$

Confidence interval for  $HR_{MH}$  may be estimated applying the asymptotic log-normal assumption for the Hazard Ratio under the null hypothesis of similar risks between the two groups under study:

$$\hat{HR}_{MH} e^{\pm 1.96 \sqrt{Var[\log(\hat{HR}_{MH})]}} \quad (18)$$

An example of manual calculation of the  $HR_{MH}$  estimate and its statistical significance may be found in the above cited paper (Parodi and Bottarelli, 2007) and in Grassi (1994).  $HR_{MH}$  estimates for data in Table 4 are reported in Box 1, for the effect both of treatment and of mitotic activity, corresponding to the KM survival curves in Figure 3 and 4, respectively.

When applied to survival data, MH procedure is strongly influenced by events occurring at the beginning of the observation period. In particular, Mantel (1966) showed by a simple example that the MH test may provide evidence for a statistically significant difference between two groups even if the corresponding risks (and then also the survival probabilities) are the same at the end of the observation period. To recover this situation, many variants of the MH procedure have been proposed, basing on the following modification of equation (15) (Hosmer and Lemeshow, 1999):

$$\chi_{MH}^2 = \frac{\left\{ \sum_{i=1}^N w_i [n_{1,i} - \hat{E}(n_{1,i})] \right\}^2}{\sum_{i=1}^N w_i^2 \hat{V}ar(n_{1,i})} \quad (19)$$

Gehan (1965) and Breslow (1970) suggested the choice of  $w_i = n_i$ , where  $n_i$  is the total of subjects at risk at  $i$ ; this test is commonly known as “the generalized Wilcoxon test” (Hosmer and Lemeshow, 1999). Tarone and Ware (1977) suggested the use of  $w_i = \sqrt{n_i}$ , while Peto and Peto (1972) and Prentice (1978) suggested to weight also for an estimate of the survival probability at each time  $t_i$ . Finally, Harrington and Fleming (1982) suggested to modify the test by Peto, Peto and Prentice by weighting for an exponential function of the estimated survival probability. For the meaning and the use of such tests reader can refer to Hosmer and Lemeshow (1999), and to Marubini and Valsecchi (2004).

**Box 1.** Hazard Ratio estimates using the MH method, corresponding 95%CI, and log-rank test for data in Table 4 and in Figure 3 and 4. Stata commands are in italic.

```

. * Estimate for the Treatment effect
. stmc Treat

Overall Mantel-Haenszel estimate, controlling for time

-----
RR          chi2          P>chi2          [95% Conf. Interval]
-----
0.432       7.01           0.0081          0.228           0.819
-----

. * Estimate for the Mitotic Activity effect
. stmc Mitot

Overall Mantel-Haenszel estimate, controlling for time

-----
RR          chi2          P>chi2          [95% Conf. Interval]
-----
2.114       5.84           0.0157          1.136           3.936
-----

```

MH method for the estimate of the common HR and the log-rank test for the comparison of two survival curves are based on the PH assumption that may be checked using graphical approaches. In particular, from equation (8) the following relation between HR and survival probabilities is obtained:

$$\log\{-\log[S_0(t)]\} - \log\{-\log[S_1(t)]\} = \log(HR) \quad (20)$$

According to equation (20), violation of PH assumption may be evaluated plotting  $\log\{-\log[S_0(t)]\}$  and  $\log\{-\log[S_1(t)]\}$  as a function of the survival time  $t$ . If the hazards in the two groups are proportional, the two curves will show a constant vertical distance, while in case of violation of the PH assumption the two curves will have not a parallel trend (Newman, 2001). This graph is often called “the complementary log-log” or “the log-minus-log” plot. Figure 5 and 6 show the complementary log-log plots corresponding to curves in Figure 3 and in Figure 4, respectively. In both cases there is no evidence of a violation of the PH assumption. Another possibility is to plot directly hazard estimates for the two groups against the follow up time. However, such a graph often looks like a confused cloud of points and needs of some interpolation and smoothing techniques to become valuable.

Some formal tests to assess the PH assumption violation also exist. The most common test is based on the analysis of Schoenfeld residuals in a Cox regression model (Hosmer and Lemeshow, 1999; Marubini and Valsecchi, 2004), which will be illustrated in a further paragraph.

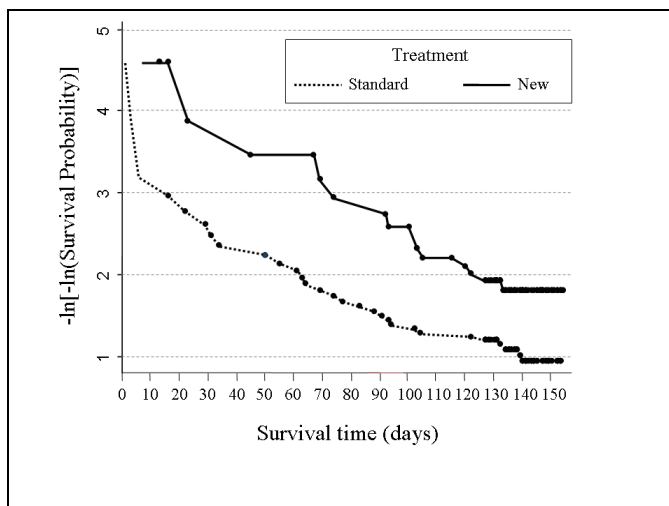
When more than 2 groups are compared, the following approximation to the MH test may be applied (Peto and Peto, 1972, Newman, 2001):

$$\chi^2_{I-1} = \sum_{i=1}^I \frac{\left[ n_{i\bullet} - \hat{E} \left( \sum_{i=1}^N n_{i\bullet} \right) \right]^2}{\hat{E} \left( \sum_{i=1}^N n_{i\bullet} \right)} \quad (21)$$

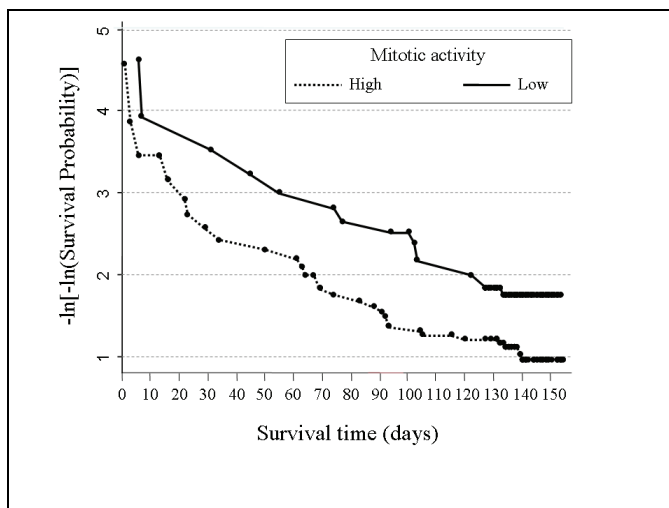
where  $n_{i\bullet}$  indicates that the sum is over each category of treatment or exposure, while  $I$  represents the number of groups. The test is sometimes referred as the log-rank test (for example, in Bland and Altman, 2004), even if this name may result rather confusing, as outlined by Newman (2001).



**Figure 5.** Complementary log-log plot corresponding to curves in Figure 3.



**Figure 6.** Complementary log-log plot corresponding to curves in Figure 4.



## MULTIVARIABLE SURVIVAL ANALYSIS: THE COX REGRESSION MODEL

In a famous paper David R. Cox (1972) proposed a semi-parametric model that still today represents the more largely applied regression approach to survival

data in biomedical studies. Moreover, many variant of the Cox model have been proposed and applied in different fields of applied statistics (Hosmer and Lemeshow, 1999; Marubini and Valsecchi, 2004).

Given a set of covariates  $x$  and a corresponding set of coefficient  $\beta$ , the hazard function in the Cox model is:

$$h(t; x, \beta) = h_0(t)e^{x\beta} \quad (22)$$

The component  $h_0(t)$  is called “the baseline hazard function” and does not depend from the covariates  $x$ , while the exponential part of equation (22) is a function of the covariates  $x$ , but does not depend from the time  $t$ . These assumptions indicate that the Cox model is a PH model, as it is easily verifiable for one covariate  $x_1$ , taking value 0 for untreated (or unexposed) subjects and 1 for the treated (or exposed) ones:

$$\frac{h(t; x_1 = 1, \beta_1)}{h(t; x_1 = 0, \beta_1)} = \frac{h_0(t)e^{\beta_1 \cdot 1}}{h_0(t)e^{\beta_1 \cdot 0}} = e^{\beta_1} \quad (23)$$

From equation (23) is evident that  $\beta_1$  represents a measure of the association between the treatment or the exposure and the probability (*i.e.*, the risk) of developing the outcome under study. Furthermore, in the presence of other covariates, an estimate of the HR, adjusted for the effect of such covariates, is obtained by exponentiating an estimate of  $\beta_1$ . Then, one of the main advantages of the application of a regression technique, like the Cox regression model, in comparison to stratified analysis (like the MH approach), is the possibility to adjust for the effect of one or more confounders and to estimate at the same time their effect. Moreover, the Cox model allows for the introduction of continuous variables. Finally, stratified analysis in general assumes an independent effect of the considered covariates, while a regression model allows the checking for interaction between two or more predictors that can be performed introducing an interaction term among the predictors. For example, in the following equation:

$$h(t; x, \beta) = h_0(t)e^{\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \gamma x_1 x_2} \quad (24)$$

$x_{12}$  represents the interaction term, obtained as the product by  $x_1$  and  $x_2$ , and  $\gamma$  is the corresponding coefficient, whose value will approach 0 in the case of no interaction.

From equations (8) and (22), the Cox regression model can be expressed in terms of survival probabilities as follows:

$$S(t; x, \beta) = [S_0(t)] e^{\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k} \quad (25)$$

To estimate  $\beta$  coefficients, Cox proposed a new method, based on “the partial likelihood” function (Cox, 1972; Cox, 1975):

$$L_P(\beta) = \prod_{i=1}^m \frac{e^{\beta x_i}}{\sum_{j \in R(t_i)} e^{\beta x_j}} \quad (26)$$

where  $m$  represents the number of not censored times, and  $R(t_i)$  indicates that the summation is performed over all subjects in the risk set at  $t_i$  (Hosmer and Lemeshow, 1999);  $\beta$  coefficients are obtained in the correspondence of the maximum values of equation (26) (maximum partial likelihood estimates) by applying mathematical procedures similar to that used in the framework of Generalized Linear Models (GLM, Dobson, 2002). Equation (26) may be transformed in a partial log-likelihood function, whose derivative respect to each coefficient  $\beta_k$  is called a “Score” function (Hosmer and Lemeshow, 1999):

$$\sum_{i=1}^m \{x_i - \bar{x}_{w_i}\} \quad (27a)$$

where:

$$\bar{x}_{w_i} = \sum_{j \in R(t_i)} x_j \frac{e^{x_j \beta}}{\sum_{l \in R(t_i)} e^{x_l \beta}}$$

Another equivalent formula is given in equation (27b), where the sum is performed over all  $N$  observed times (*i.e.*, including the censored ones), and the symbol “ $k$ ” indicates that  $k$  coefficients, corresponding to  $k$  covariates, may be introduced into the model:

$$\frac{\partial L_P(\beta)}{\partial \beta_k} = \sum_{i=1}^N \delta_i \left\{ x_{ik} - \frac{\sum_{j \in R(t_i)} x_{jk} e^{\beta x_j}}{\sum_{j \in R(t_i)} e^{\beta x_j}} \right\}$$

(27b)

Equation (27b) is a little more complicated than equation (27a), but it is useful to define the so-called “Schoenfeld residuals” that are largely employed to assess the PH assumption violation (Hosmer and Lemeshow, 1999), as illustrated in a further paragraph. However, the (partial) Score function is mainly applied to estimate the  $\beta$  coefficients that are obtained in the correspondence of 0 values of equation (27a) or, equivalently, of equation (27b). The corresponding variance estimate may be obtained from:

$$V\hat{ar}(\hat{\beta}) = I(\hat{\beta})^{-1} \quad (28)$$

where  $I$  (still similarly to the GLM approach, Dobson, 2002) is called “the observed information matrix”, and is obtained by the second derivative of the log partial likelihood (Hosmer and Lemeshow, 1999). Statistical inference may be made using the same test applied to GLM, *i.e.* (partial) likelihood ratio test, score test and Wald test (Dobson, 2002), using the partial likelihood instead of the likelihood function.

Table 6 reports the results of the analysis by the Cox regression model of data in Table 4. Univariable analysis refers to results from models containing only one predictor  $x$  at a time (either treatment or mitotic activity), while multivariable analysis indicates the model including both predictors.

**Table 6.** Results of analysis of data in Table 4 by Cox regression model.

	Univariable analysis			Multivariable analysis		
	HR	95%CI	<i>p</i>	HR	95%CI	<i>p</i>
<i>Treatment</i>			<i>0.010</i>			<i>0.014</i>
Untreated (n=100)	1 ( <i>ref.</i> )	-		1 ( <i>ref.</i> )	-	
Treated (n=100)	0.43	0.23-0.82		0.45	0.24-0.85	
<i>Mitotic activity</i>			<i>0.018</i>			<i>0.025</i>
Low (n=103)	1 ( <i>ref.</i> )	-		1 ( <i>ref.</i> )	-	
High (n=97)	2.1	1.1-3.9		2.0	1.1-3.7	

*p*=*p* value obtained by Wald test.

Results from univariable and multivariable models were very similar, indicating that the effect of treatment is not due to some association with the mitotic activity and *vice versa* (*i.e.*, to a confounding bias). Furthermore, as expected, the HR estimated via the maximum partial log-likelihood method in the Cox regression

model (Table 6), are consistent with those estimated by the MH method (Box 1), indicating that the treatment reduces the risk of death, while dogs with cancer cells with high mitotic activity have a risk about twice compared with the remaining cohort. Finally, fitting the model to check for interaction (equation (24)), a coefficient of -1.098 was estimated for the interaction term, with a corresponding p value of 0.106 (Wald test), indicating that there is no evidence of an interaction between treatment and mitotic activity.

Cox regression model is focused on the effect of covariates  $x$  on the hazard ratio and cannot be directly applied to estimate survival probabilities. For this purpose the method of Breslow (1974) can be used, which is based on the following estimate of the baseline survival probability:

$$\hat{S}_0(t) = \prod_{t_{(i)} \leq t} \left( 1 - \frac{d_{(i)}}{\sum_{j \in R(t_i)} e^{\beta'x_j}} \right) \quad (29)$$

Survival estimates for each considered category can be easily calculated applying equation (25), where  $S_0(t)$  is replaced by its estimate from equation (29).

## VERIFYING THE PH ASSUMPTION IN THE COX REGRESSION MODEL

Assessing the PH assumption after having fitted a Cox regression model is an important step (Hosmer and Lemeshow, 1999). A largely used method has been proposed by Grambsch and Therneau, based on the Schoenfeld residuals (Grambsch and Therneau, 1994; Schoenfeld, 1982; Hosmer and Lemeshow, 1999; Marubini and Valsecchi, 2004), which represents the contribution of each observation to the Score function, showed in equation (27b):

$$r_{ik} = \delta_i \left\{ x_{ik} - \frac{\sum_{j \in R(t_{(i)})} x_{jk} e^{\beta'x_j}}{\sum_{j \in R(t_{(i)})} e^{\beta'x_j}} \right\} \quad (30)$$

An estimate of  $r_{ik}$  is obtained replacing each  $\beta$  coefficient in equation (30) with its partial maximum likelihood estimate. Because such values are obtained when the Score function equals zero, the sum and the mean of  $r_{ik}$  are also equal to zero.

Grambsch and Therneau proposed the use of the following variant of equation (30) that they called “the scaled Schoenfeld residuals” (Grambsch and Therneau, 1994):

$$\hat{r}_i^* = [V\hat{a}r(\hat{r}_i)]^{-1} \hat{r}_i \cong mV\hat{a}r(\hat{\beta})\hat{r}_i \quad (31)$$

where  $\text{Var}(\beta)$  is estimated from equation (28).

Under violation of the PH assumption,  $\beta$  coefficients may be expressed as some function of the survival time. Grambsch and Therneau (1994) proposed the following form for a coefficient, in which  $g_j(t)$  represents a function of time:

$$\beta_j(t) = \beta_j + \gamma_j g_j(t) \quad (32)$$

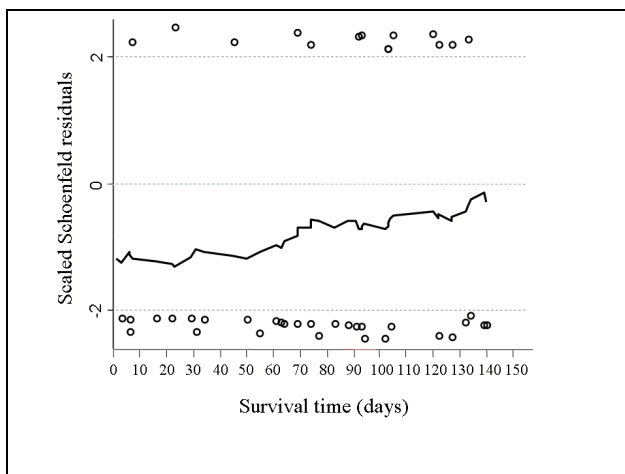
and they also demonstrated that for the covariate  $j$  the following simple relation exists between equation (32) and scaled Schoenfeld residuals defined in equation (31) (Hosmer and Lemeshow, 1999):

$$E[r_j^*(t)] \cong \gamma_j g_j(t) \quad (33)$$

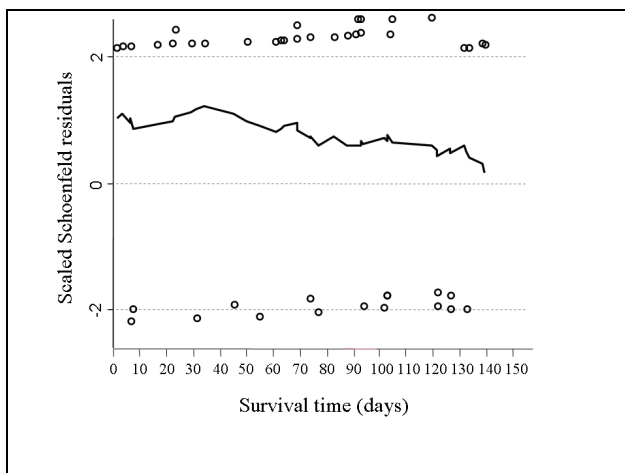
where “E” indicates the expected value. As a consequence, even if the statistical theory behind the applications of scaled Schoenfeld residuals is rather cumbersome, a simple plot of such values vs. survival time may provide indication about the presence of the PH assumption violation. Finally, Grambsch and Therneau (1994) also provided a formal test for  $\gamma_j$  coefficient in equation (33), whose expected value is 0 under the hypothesis of no PH assumption violation.

Figure 7 and Figure 8 show the plots of scaled Schoenfeld residuals vs. survival time for the effect of treatment and the mitotic activity, respectively, estimated by the Cox regression model reported in Table 6 (multivariable analysis). No evident violation of PH assumption emerged, even if the curve for treatment shows a slight rising trend. Furthermore, statistical significance of test for PH violation was not reached, either for the whole model ( $\chi^2 = 1.72$ , with 2 degrees of freedom,  $p = 0.424$ ), or for the two predictors (treatment:  $\chi^2 = 1.17$ , with 1 degree of freedom,  $p = 0.280$ ; mitotic activity:  $\chi^2 = 0.480$ , with 1 degree of freedom,  $p = 0.489$ ).

**Figure 7.** Test for the slope of the scaled Schoenfeld residuals on function of time: treatment predictor in the Cox regression model in Table 6.



**Figure 8.** Test for the slope of the scaled Schoenfeld residuals on function of time: mitotic activity predictor in the Cox regression model in Table 6.



## CONCLUSIONS

The present review has briefly introduced some basic principles of survival analysis in biomedical studies, particularly illustrating the two most common methods based on the PH assumption, *i.e.*, the log-rank test and the Cox regression model. Both methods do not assume any particular functional form for the survival

time, but the Cox model assumes an exponential relationship between the considered predictors and the hazard function. Accordingly, the log-rank test is considered as a “non-parametric” method, while the Cox model is in general considered as a “semi-parametric” technique (Hosmer and Lemeshow, 1999; Marubini and Valsecchi, 2004). When the function of the time distribution is completely known, fully parametric models may also be adopted. In particular, under the PH assumption, the most largely employed are the exponential, the Weibull, and the log-logistic models (Hosmer and Lemeshow, 1999). Other regression approaches also exist, both semi-parametric than fully parametric, to recover the PH assumption violation, including stratifying models (early proposed by David R. Cox in 1972), the inclusion of time dependent predictors and the fitting of the “accelerated failure models” that are based on the assumption of a multiplicative effect of the covariates on the time scale (Hosmer and Lemeshow, 1999). Moreover, in many situations, researchers have to deal with the possibility of the occurrence of more than one outcome in each subject, for example when the events of interest are represented by recurrent infective episodes (Hosmer and Lemeshow, 1999; Therneau and Grambsch, 2000; Newman, 2001; Marubini and Valsecchi, 2004). In most cases the Kaplan-Meier approach, the MH method and the Cox regression model, briefly illustrated in this review, have provided the basis for the development of statistical methods for the analysis of survival data also in very complex situations.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by a grant from the Italian Neuroblastoma Foundation (Fondazione Italiana Neuroblastoma).

## REFERENCES

- 1) Bland J.M., Altman D.G. (2004) The logrank test. *BMJ*. 1;328:1073.
- 2) Breslow N.E. (1970) A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subjects to unequal patterns of censorship. *Biometrika*, 57:579-594.
- 3) Breslow N.E. (1974) Covariance analysis of censored survival data. *Biometrics*, 30:59-100.
- 4) Breslow N.E., Day N.E. (1987) *Statistical methods in cancer research, Vol. 2, The Design and Analysis of Cohort Studies*. IARC Scientific Publications No. 82, Lyon (Fr), IARC.
- 5) Cox D.R. (1972) Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 34: 187–220.
- 6) Cox D.R. (1975) Partial likelihood. *Biometrika*, 62:269-276.
- 7) Dobson A.J. (2002) *An introduction to Generalized Linear Models - Second edition*. Chapman & Hall/CRC Press, Boca Raton.
- 8) Gehan E.A. (1965) A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. *Biometrics*, 52: 203-223.



- 9) Grambsch P.M., Therneau T.M. (1994) Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika* 81: 515-526.
- 10) Grassi M. (1994) In Grassi M. (1994) *Statistica in Medicina - Un approccio basato sulla verosimiglianza*. McGraw-Hill Libri Italia srl, Milano, Italy; p.415-455.
- 11) Harrington D.P., Fleming T.R. (1982) A class of rank test procedures for censored survival data. *Biometrika*, 69:553-566.
- 12) Hosmer D.W., Lemeshow S. (1999) *Applied survival analysis: regression modeling of time to event data*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 13) Kalbfleisch J.D., Prentice R.L. (1980) *The statistical analysis of failure time data*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 14) Kaplan E.L., Meier P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.*, 53:457-481.
- 15) Kleinbaum D.G., Kupper L.L., Morgenstern H. (1982) *Epidemiologic research: principles and quantitative methods*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 16) Mantel N., Haenszel W. (1959) Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl. Cancer Inst.*, 22: 719-748.
- 17) Mantel N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports* 50: 163-70.
- 18) Marubini E., Valsecchi M.G. (2004) *Analysing survival data from clinical trials and observational studies*. John Wiley and Sons Inc., New York.
- 19) Newman S. (2001) *Biostatistical methods in Epidemiology*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- 20) Parodi S., Bottarelli E. (2004) Introduzione allo studio caso-controllo in Epidemiologia. *Ann. Fac. Med. Vet. di Parma* 24:209-236.
- 21) Parodi S., Bottarelli E. (2007) The Mantel-Haenszel procedure in epidemiological studies: an introduction. *Ann. Fac. Med. Vet. di Parma* 27:17-32.
- 22) Peto R., Peto J. (1972) Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)*, 135: 185-207.
- 23) Prentice R.L. (1978) Linear rank tests with right censored data. *Biometrika*, 65:167-179, Correction 70:304 (1983).
- 24) Schoenfeld D. (1982) Partial residuals for the proportional hazards regression model. *Biometrika*, 69:239-241.
- 25) Tarone R.E., Ware J. (1977) On distribution free tests of the equality of survival distributions. *Biometrika*, 64: 156-160.
- 26) Therneau T.M., Grambsch P.M. (2000) *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York.



## **PRODUZIONE BIOLOGICA, VALORE AGGIUNTO E SICUREZZA PER IL CONSUMATORE DI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE: LE RECENTI NORMATIVE COMUNITARIE.**

Signorini G.<sup>1</sup>, Biagi G.<sup>2</sup>, Nannipieri S.<sup>3</sup>, Marzotto G.<sup>4</sup>, Pandolfi C.<sup>5</sup>

### **INTRODUZIONE**

Allo scopo di garantire la sicurezza degli alimenti di origine animale H, negli ultimi decenni, sono stati emanati piani di sorveglianza e di vigilanza sanitaria dapprima indirizzati alla ricerca di residui di sostanze farmacologiche e successivamente più mirati al controllo dell'alimentazione degli animali allevati per la produzione di alimenti destinati al consumo umano.

L'attenzione si è orientata poi verso la produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici: si sono posti quindi nuovi problemi di filiera e si sono presentate problematiche peculiari relative alla gestione della produzione e dell'etichettatura e al controllo dei prodotti stessi.

In tale contesto è stato emanato il Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio del 28 giugno 2007 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici (GUUE n. L189, 20.07.2007) che, in 40 considerando e 42 articoli, ridisegna le nuove formulazioni fissando gli obiettivi riguardanti la produzione biologica ed abroga il Regolamento CEE 2092/91 del Consiglio del 24 giugno 1991 relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e alla indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari (GUCE n. L198, 22.07.1991).

Successivamente è stato pubblicato sulla GUUE n. L 250 del 18 settembre 2008 il regolamento CE 889/2008 della Commissione "recante modalità di applicazione del Regolamento (CE) 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, per quanto riguarda la produzione biologica, l'etichettatura e i controlli". Sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. L 337 del 16 dicembre 2008 è stato pubblicato poi il Regolamento (CE) n. 1254/2008 del 15 dicembre 2008 che a sua volta apporta modifiche al Regolamento (CE) n. 889/2007.

Dal momento che il settore dell'agricoltura biologica sta assumendo dimensioni sempre maggiori in funzione dell'aumentata richiesta dei consumatori, la normativa sulla produzione biologica assume un'importanza sempre più rilevante nell'ambito della politica agricola.

Il primo considerando del Regolamento n. 834/2007/CE definisce detta produzione "*un sistema globale di gestione dell'azienda agricola e di produzione agroalimentare basato sull'interazione tra le migliori pratiche ambientali, un alto livello di*

---

1 Scuola di Specializzazione in "Ispezione Alimenti Origine Animale" – Università di Parma

2 Dipartimento di Clinica Veterinaria – Università di Pisa

3 Veterinario Dirigente - USL 6 Zona Livorno

4 Veterinario Libero Professionista - Ancona

*biodiversità, la salvaguardia delle risorse naturali, l'applicazione di criteri rigorosi in materia di benessere degli animali e una produzione confacente alle preferenze di taluni consumatori per prodotti ottenuti con sostanze e procedimenti naturali. Il metodo di produzione biologico esplica pertanto una duplice funzione sociale, provvedendo da un lato a un mercato specifico che risponde alla domanda di prodotti biologici dei consumatori e, dall'altro, fornendo beni pubblici che contribuiscono alla tutela dell'ambiente, al benessere degli animali e allo sviluppo rurale".*

In tale ottica l'agricoltura biologica dovrebbe fare affidamento prevalentemente sulle risorse rinnovabili nell'ambito di sistemi agricoli organizzati a livello locale, limitare al minimo l'uso di risorse non rinnovabili, i rifiuti e i sottoprodotti di origine animale e vegetali. Al fine di evitare l'inquinamento dell'ambiente, in particolare delle risorse naturali come il suolo e l'acqua, la produzione animale biologica dovrebbe prevedere uno stretto rapporto tra tale produzione e la terra, idonei sistemi di rotazione pluriennale e l'alimentazione degli animali con prodotti vegetali derivanti dall'agricoltura biologica.

Da quanto sopra descritto appare chiaro che l'allevamento biologico è una attività strettamente connessa alla terra. Ne consegue che tale tipo di allevamento deve rispettare criteri rigorosi in materia di benessere degli animali e soddisfarne le specifiche esigenze per quanto attiene le condizioni di stabulazione, le pratiche zootecniche, la densità degli animali. È assolutamente vietato l'impiego di OGM nella produzione biologica.

I considerando del regolamento che stiamo esaminando pongono particolare attenzione ai prodotti biologici trasformati che devono essere ottenuti mediante procedimenti in grado di "garantire la persistenza dell'integrità biologica e delle qualità essenziali del prodotto in tutte le fasi della catena di produzione". Per dare chiarezza e garanzia ai consumatori, in tutto il mercato comunitario si rende obbligatorio il logo UE per tutti i prodotti alimentari biologici in imballaggio preconfezionato ottenuti nella Comunità. Da quanto esaminato si evince che la definizione "produzione biologica" sottintende l'impiego di metodi di produzione in conformità delle norme stabilite nel Regolamento n. 834/2007/CE in tutte le fasi della produzione, preparazione e distribuzione.

## **IL REGOLAMENTO N. 834/2007/CE**

### ***Art. 1 – Ambito applicazione***

Si prevede che dette norme siano applicate ai prodotti provenienti dall'agricoltura, inclusa l'acquacoltura, qualora siano immessi sul mercato e comprendono: prodotti agricoli vivi o non trasformati; prodotti agricoli trasformati destinati ad essere utilizzati come alimenti; mangimi, materiale di propagazione vegetativa e sementi per la coltivazione.

### ***Art. 3 - Obiettivi e principi della produzione biologica***

Si stabiliscono i seguenti obiettivi generali: stabilire un sistema di gestione sostenibile per l'agricoltura basato sul rispetto dei sistemi e dei cicli naturali e sul mantenimento e miglioramento della salute dei suoli, delle acque, delle piante e degli

animali e l'equilibrio tra di essi incrementando la diversità biologica ed assicurando un impiego responsabile dell'energia e delle risorse naturali come l'acqua, il suolo, la materia organica e l'aria e fondato sul rispetto di criteri rigorosi in materia di benessere degli animali soddisfacendo, in particolare, le specifiche esigenze comportamentali degli animali secondo la specie; realizzare prodotti di alta qualità; produrre un'ampia varietà di alimenti ed altri prodotti agricoli che corrispondano alla domanda dei consumatori di prodotti ottenuti con procedimenti che non danneggino l'ambiente, la salute umana, le caratteristiche dei vegetali, la salute e il benessere degli animali.

#### ***Art. 4 - Principi generali della produzione biologica***

Si progetta la gestione appropriata dei processi biologici fondata su sistemi ecologici che impiegano risorse naturali interne ai sistemi stessi. In particolare sono vietati gli OGM e i prodotti derivati o ottenuti da OGM da utilizzare come alimenti, mangimi, prodotti fitosanitari, concimi, sementi.

#### ***Art. 14 – Norme di produzione animale***

Particolare attenzione il legislatore dedica alle norme di produzione animale che sintetizza in cinque punti fondamentali riguardanti:

- a) l'origine degli animali, che devono essere nati ed allevati in aziende biologiche;
- b) le pratiche zootecniche, come la densità degli animali, e le condizioni di stabulazione, che devono essere in grado di soddisfare le esigenze fisiologiche, etologiche e di sviluppo degli animali;
- c) la riproduzione, che non deve essere indotta da trattamenti ormonali o sostanze simili a meno che non ricorra la necessità di una terapia veterinaria per un singolo animale (sono però escluse altre forme quali la clonazione e il trasferimento di embrioni) mentre particolare attenzione deve essere rivolta alla scelta della razza appropriata;
- d) l'alimentazione, per la quale sono previsti mangimi biologici e principalmente ottenuti dall'azienda in cui sono allevati gli animali o da altre aziende biologiche della stessa regione favorendo l'accesso al pascolo o a foraggi grossolani;
- e) la prevenzione delle malattie, realizzata mediante la selezione delle razze e dei ceppi, le pratiche zootecniche, la somministrazione di mangimi di qualità, l'esercizio, un'adeguata densità degli animali e idonee condizioni di stabulazione e d'igiene, e le cure veterinarie, consentite per trattare immediatamente gli animali per evitare sofferenze impiegando in caso di necessità e a condizioni rigorose medicinali veterinari allopatrici di sintesi chimica, compresi gli antibiotici, se risultano inappropriati i prodotti omeopatici, fitoterapici e altri prodotti stabilendo in particolare restrizioni relative ai cicli di trattamento e al tempo di attesa. Sono consentite anche l'utilizzazione di medicinali veterinari ad azione immunologia e le cure connesse alla tutela della salute umana e animale, imposte a norma del diritto comunitario.

È possibile effettuare la pulizia e la disinfezione ed i prodotti utilizzabili nei locali di stabulazione e negli impianti sono solo quelli autorizzati per l'uso nella produzione biologica ai sensi dell'articolo 16 del regolamento.

## **REGOLAMENTO N. 889/2008/CE: MODALITÀ DI APPLICAZIONE DEL REGOLAMENTO N. 834/2007/CE**

Le modalità di applicazione del Regolamento n. 834/2007/CE sono dettate dal Regolamento n. 889/2008/CE modificato per alcune parti dal Regolamento n. 1254/2008/CE del 15 dicembre 2008.

Nonostante a livello comunitario sia esplicitamente ammesso nel testo del regolamento che *“la definizione di nuove norme di produzione biologica relative a determinate specie animali, all’acquacoltura biologica, alle alghe marine e ai lieviti utilizzati nell’alimentazione umana o animale richiederà ancora del tempo”* e che *“esse andranno pertanto elaborate nell’ambito di una procedura successiva”*, il legislatore pone come punto fermo che debbano essere applicate le norme comunitarie di produzione, controlli ed etichettatura, *mutatis mutandis*, a talune specie animali, a taluni prodotti dell’acquacoltura e a talune alghe marine come stabilito dall’art. 42 del Regolamento n. 834/2007/CE.

Questo infatti recita: *“qualora non siano fissate le norme dettagliate di produzione per talune specie animali, piante acquatiche e microalghe, si applicano le norme in materia di etichettatura e di controllo previste dal titolo IV e dall’art. 23 per quanto riguarda l’etichettatura; dal titolo V, art. 27 per quanto attiene i controlli. In attesa dell’inserimento di norme dettagliate di produzione si applicano norme nazionali o, in mancanza di queste, norme private, accettate o riconosciute dagli stati membri”*.

Riteniamo meritorio un’attenzione particolare le norme che trattano le condizioni di ricovero degli animali e le pratiche di allevamento specifiche per i mammiferi, soprattutto quelle relative all’isolamento, al riscaldamento e all’areazione dell’edificio per garantire che la circolazione dell’aria, i livelli di polvere, la temperatura, l’umidità relativa dell’aria e la concentrazione dei gas siano mantenuti entro limiti non nocivi per gli animali. La densità di bestiame negli edifici deve garantire il confort ed il benessere degli animali oltre alle esigenze specifiche della specie, della razza e dell’età degli animali allevati nonché delle esigenze comportamentali degli stessi. Relativamente alle condizioni strutturali, la pavimentazione deve essere priva di asperità, ma non sdruciolevole; l’area di riposo confortevole, pulita, e con lettiera ampia ed asciutta. Per quanto riguarda invece le condizioni di allevamento, i suinetti non possono essere tenuti in gabbie ma in spazi che consentano adeguata libertà di movimento e la possibilità di grufolare; i volatili non possono essere tenuti in gabbie.

Viene prestata anche un’attenzione particolare al parametro della densità di allevamento: i ricoveri per gli avicoli devono contenere al massimo 4.800 polli; 3.000 galline; 5.200 faraone; 4.000 femmine di anatra muta o 3.200 maschi; 2.500 capponi, oche o tacchini ed i locali devono essere costruiti in modo da consentire un facile accesso allo spazio all’aperto. Per quanto riguarda i tempi di macellazione l’età di macellazione per i polli viene portata ad 81 giorni, a 150 per i capponi, a 49 per le anatre di Pechino, per l’anatra muta rispettivamente a 70 per le femmine e 84 per i maschi, a 92 per le altre anatre, a 94 per le faraone, a 140 per i tacchini e le oche e a 100 giorni per le femmine di tacchino.

## 1. Profilassi e trattamenti veterinari

La prevenzione è realizzata privilegiando la selezione delle razze e dei ceppi, le pratiche zootecniche, la somministrazione dei mangimi di qualità, l'esercizio, idonee condizioni di stabulazione e di igiene. È tuttavia consentita l'utilizzazione di medicinali ad azione immunologica. Nel caso le misure preventive fossero inefficaci e gli animali si ammalano o si feriscono, devono essere immediatamente curati e se necessario, isolati in appositi locali. I prodotti fitoterapici, i prodotti omeopatici e gli oligoelementi sono da preferire ai medicinali veterinari allopatrici ottenuti per sintesi chimica e gli antibiotici, purché abbiano efficacia terapeutica per la specie animale e tenuto conto delle circostanze che hanno richiesto le cure. Tuttavia nel caso che le misure sopra esaminate non siano efficaci per le malattie o le ferite che hanno colpito gli animali e nel caso che la terapia sia essenziale per evitare sofferenze o disagi all'animale, possono essere impiegati antibiotici o medicinali veterinari allopatrici ottenuti per sintesi chimica e sotto la responsabilità di un medico veterinario. Per quanto riguarda il tempo di sospensione deve essere di durata doppia rispetto a quello stabilito per legge e nel caso non sia precisato tale tempo deve essere di 48 ore. Sono ammesse le cure correlate alla tutela della salute umana e degli animali imposte dalla normativa comunitaria. Per la pulizia e la disinfezione dei locali di stabulazione e degli impianti devono essere impiegati prodotti autorizzati per l'uso nella produzione biologica.

Per quanto riguarda l'apicoltura le norme specifiche prevedono la possibilità di utilizzare i rodenticidi, fosfato di ammonio, feromoni e piretroidi (solo in trappole e/o distributori automatici) per la protezione dei telaini, degli alveari e dei favi. Nei casi di infestazione da *Varroa destructor* possono essere usati l'acido formico, l'acido lattico, l'acido acetico e l'acido ossalico, nonché mentolo, timolo, eucaliptolo o canfora. I medicinali veterinari possono essere utilizzati in apicoltura biologica se il loro corrispondente impiego è autorizzato nello stato membro secondo la pertinente normativa comunitaria o secondo la normativa nazionale in conformità del diritto comunitario. Durante un trattamento in cui siano applicati prodotti allopatrici ottenuti da sintesi chimica, le colonie trattate devono essere isolate in apposito apiario e la cera deve essere completamente sostituita con altra cera proveniente da apicoltura biologica. Successivamente esse saranno soggette al periodo di conversione di un anno.

## 2. Norme generali di produzione agricola

Il legislatore rivolge specifica attenzione alla produzione agricola. Già in precedenti occasioni abbiamo avuto modo di soffermarci sul noto binomio "allevamento e gestione dei rischi correlati" dato che la produzione animale svolge nella Comunità un ruolo molto importante e i risultati ottimali di tale attività dipendono in larga misura dall'impiego di una alimentazione sicura e di buona qualità in cui i mangimi ricoprono un ruolo preponderante. In tale contesto pertanto la ricerca di un elevato modello della protezione della salute umana e della salute degli animali è uno degli obiettivi fondamentali della legislazione alimentare, così come stabilito nel Regolamento n. 178/2002/CE (GUUE n. L 031, 01/02/2002) che fissa i principi e i requisiti generali della legislazione alimentari, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e stabilisce procedure nel campo della sicurezza alimentare.

Ovviamente il problema acquista una particolare rilevanza nel settore delle bioproduzioni in quanto l'intera azienda agricola deve essere gestita secondo quanto stabilito nei requisiti applicabili alla produzione biologica. Tuttavia, la Commissione, assistita da un comitato di regolamentazione per la produzione biologica, può autorizzare che un'azienda possa essere suddivisa in unità ben distinte e, per quanto attiene l'acquacoltura, siti di produzione non tutti in regime di produzione biologica purché ci sia una adeguata possibilità di separazione tra i siti di produzione. Per quanto riguarda gli animali, ciò si applica a specie distinte; per quanto invece attiene le piante l'autorizzazione si applica a varietà distinte facilmente distinguibili. In tale contesto la produzione biologica vegetale impone tecniche di lavorazione del terreno e pratiche colturali atte a salvaguardare o ad aumentare il contenuto di materia organica del suolo, ad accrescere la stabilità del suolo e la sua biodiversità, nonché a prevenire la compattazione e l'erosione del suolo. È consentito l'uso di preparati biodinamici; inoltre l'uso di concimi è ammesso solo sulla base di un elenco ristretto che comprende prodotti fitosanitari, concimi e ammendanti, materie prime per mangimi non biologiche di origine vegetale, materie prime per mangimi di origine animale e minerale e talune sostanze usate nella alimentazione degli animali, additivi per mangimi e ausiliari di fabbricazione; tali prodotti sono stati autorizzati per essere impiegati nella produzione biologica.

L'impiego di concimi minerali azotati e di tutte le materie di produzione vegetale se non evitano o limitano al minimo l'inquinamento dell'ambiente non è invece consentito; i prodotti per la pulizia e la disinfezione nella produzione vegetale sono utilizzati soltanto per se sono stati autorizzati per la produzione biologica.

### **3. Norme di produzione animale.**

Per quanto riguarda la produzione animale, punti specifici riguardano:

- a) l'origine degli animali stabilendo che gli animali biologici devono nascere e sono allevati in aziende biologiche;
- b) le pratiche zootecniche e le condizioni di stabulazione stabilendo che le persone addette alle cure degli animali possiedono le necessarie conoscenze e competenze di base in materia di salute e benessere degli animali. Le pratiche zootecniche inoltre prevedono che la densità degli animali garantiscono le esigenze fisiologiche, etologiche e di sviluppo degli animali. È vietato tenere gli animali legati o in isolamento, agli animali inoltre devono essere risparmiate sofferenze e mutilazioni, e in caso di trasporto questo deve avere una durata il più possibile limitata;
- c) per quanto attiene la riproduzione questa deve avvenire con metodi naturali, pur essere ammessa l'inseminazione artificiale. La riproduzione non deve essere indotta da trattamenti ormonali a meno che riguarda una terapia veterinaria per un singolo animale;
- d) per quanto riguarda l'alimentazione e la somministrazione di mangimi è raccomandabile che questi siano ottenuti dall'azienda in cui sono allevati gli animali o da altre aziende biologiche della stessa regione. È vietato l'uso di stimolanti della crescita e di aminoacidi sintetici;
- e) per quanto riguarda la prevenzione delle malattie e le cure veterinarie queste si realizzano mantenendo gli animali in ottime condizioni, l'applicazione di buone



pratiche zootecniche e di gestione comprese la pulizia e la disinfezioni periodiche dei locali e la somministrazione di mangimi di qualità.

#### **4. Etichettatura**

L'art. 23 del Regolamento n. 834/2007/CE stabilisce che un prodotto deve riportare i termini riferiti al metodo di produzione biologico quando nella etichettatura, nella pubblicità o nei documenti commerciali, il prodotto stesso, i suoi ingredienti o le materie prime per mangimi sono descritti con termini che riferiscono all'acquirente che il prodotto, i suoi ingredienti o le materie prime per mangimi sono stati ottenuti conformemente alle norme stabilite dal Regolamento n. 834/2007/CE. In particolare i termini elencati nell'allegato, nonché i rispettivi derivati e abbreviazioni, quali "bio" e "eco", possono essere utilizzati singolarmente o in abbinamento nell'intera Comunità e in qualsiasi lingua comunitaria, nell'etichettatura e nella pubblicità dei prodotti. Per quanto riguarda i prodotti trasformati, la normativa obbliga l'utilizzo del marchio europeo quando almeno il 95% in peso degli ingredienti di origine europea sia biologico. Tra le obbligazioni è previsto che sulla confezione sia impresso il logo comunitario per quanto riguarda gli alimenti preconfezionati. Nel campo visivo del logo comunitario compare inoltre l'indicazione del luogo in cui sono state coltivate le materie prime agricole di cui il prodotto è composto secondo la seguente formula: "Agricoltura UE" quando la materia prima agricola è stata coltivata nell'UE; "Agricoltura non UE" se la materia prima agricola è stata coltivata in Paesi terzi; "Agricoltura UE/non UE" quando parte della materia prima agricola è stata coltivata nella Comunità e una parte di essa è stata coltivata in un Paese terzo. Tali indicazioni devono essere esposte in modo facilmente visibili, chiaramente leggibili ed indelebili. Il logo comunitario di produzione biologica può essere utilizzato nella etichettatura, presentazione e pubblicità di prodotti che soddisfano i requisiti di cui al Regolamento n. 834/2007/CE.

#### **5. Requisiti minimi di controllo, regime di controllo e impegno dell'operatore.**

Alla prima applicazione del regime di controllo, l'operatore redige e successivamente aggiorna:

- a) una descrizione completa dell'unità, e/o del sito, e/o dell'attività;
- b) tutte le misure concrete da prendere a livello dell'unità; e/o del sito e/o dell'attività per garantire il rispetto delle norme di produzione biologica;
- c) le misure precauzionali da prendere per ridurre il rischio di contaminazione da parte di prodotti o sostanze non autorizzate e le misure di pulizia da prendere nei luoghi di magazzinaggio e lungo tutta la filiera di produzione dell'operatore;
- d) la natura e la frequenza dei controlli determinati in base ad una valutazione del rischio di regolarità e di infrazione per quanto riguarda il rispetto dei requisiti stabiliti nel regolamento n. 834/2007/CE.

L'Organismo di controllo deve essere accreditato secondo la versione più recente pubblicata in GUUE, serie C, della norma europea EN 45011 o della guida ISO "requisiti generali relativi agli organismi che gestiscono sistemi di certificazione dei prodotti" ed autorizzato dalle autorità competenti. L'Organismo di controllo comunica i risultati dei controlli effettuati all'autorità competente in modo regolare e

ogni qualvolta quest'ultima ne faccia richiesta. Qualora i risultati dimostrassero una non conformità o anche solo un sospetto, l'Organismo di controllo ne informa immediatamente l'autorità competente. Entro il 31 gennaio di ogni anno, le autorità di controllo e gli organismi di controllo trasmettono alle autorità competenti un elenco degli operatori da essi controllati al 31 dicembre dell'anno precedente. Entro il 31 marzo di ogni anno viene presentata una relazione di sintesi sulle attività di controllo svolte nel corso dell'anno precedente.

## VALUTAZIONI CONCLUSIVE

Dal 1° gennaio di questo anno, dopo diciassette anni, viene superata la normativa finora vigente in materia di produzioni biologiche; la nuova normativa riguarda i prodotti agricoli vivi o non trasformati; i prodotti agricoli trasformati destinati ad essere utilizzati come alimenti eccetto i prodotti dell'acquacoltura, della caccia e della pesca, le alghe marine e i lieviti; i mangimi ed il materiale di propagazione vegetativa e sementi per la coltivazione. Abbiamo preso in considerazione specificatamente il Regolamento n. 834/2007/CE del Consiglio del 28 giugno 2007 ed il Regolamento n. 889/2008/CE della Commissione del 5 settembre 2008 *“recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 per quanto riguarda la produzione biologica, l'etichettatura ed i controlli”* poiché riteniamo che questo tipo di produzione, considerata l'aumentata richiesta da parte dei consumatori, debba essere considerata parte integrante del pacchetto riguardante la sicurezza alimentare; la materia merita quindi una specifica trattazione, anche in considerazione degli obiettivi che si prefigge.

In sintesi possiamo dire che tale regolamentazione comunitaria rappresenta una sorta di “norma quadro” in quanto esplicita gli obiettivi, i principi e le norme di produzione dell'agricoltura biologica, garantendo che questi si applichino ugualmente a tutte le fasi della produzione biologica animale, vegetale, dell'acquacoltura e dei mangimi, nonché alla produzione di alimenti biologici trasformati.

Relativamente agli OGM, oltre a ribadire l'assoluto divieto di utilizzarli, si precisa che, ai fini della presenza accidentale di OGM autorizzati, il limite di etichettatura dello 0,9%; rende obbligatorio il marchio UE per i prodotti biologici di origine comunitaria. Si ottiene la garanzia che l'etichetta “Bio” sia riservata soltanto agli alimenti contenenti almeno il 95% di ingredienti biologici; autorizzando contestualmente l'indicazione degli ingredienti biologici nella composizione dei prodotti non biologici. Il sistema di controllo viene migliorato e potenziato, allineandolo a quello già in vigore nell'Unione Europea per la generalità delle derrate alimentari e dei mangimi, ma mantenendo anche controlli specifici per la produzione biologica.

Si istituisce un nuovo regime permanente d'importazione, in base al quale i paesi terzi possono esportare sul mercato dell'Unione Europea a condizioni identiche o equivalenti a quelle applicabili ai produttori dell'Unione europea; a garanzia ulteriore del consumatore si prescrive l'indicazione in etichetta del luogo di provenienza dei prodotti, anche per quelli importati che recano il marchio Unione Europea; sono previste ulteriori disposizioni nel settore biologico per acquacoltura, vitivinicoltura, lieviti. L'elenco delle sostanze autorizzate in agricoltura biologica non subisce va-

riazioni; sono previste trasposizioni delle modalità di applicazione dal regolamento precedente al nuovo, con particolare riguardo all'elenco delle sostanze, alle norme in materia di controllo e ad altre disposizioni applicative.

Riteniamo di notevole interesse per il settore veterinario le norme relative alla produzione animale, alle pratiche zootecniche, alla profilassi e alla terapia delle malattie e soprattutto agli alimenti destinati agli animali da reddito poiché prevedono anche norme specifiche per la profilassi e i trattamenti veterinari in apicoltura, settore questo, finora, un poco dimenticato. Infine sono previste tutta una serie di deroghe (fino al 2013) per i sistemi di allevamento delle diverse specie animali al fine di consentire una transizione più "morbida".

Al fine di assicurare la conformità dei prodotti biologici ai requisiti previsti dalla norma, tutte le attività svolte in ogni fase della produzione e distribuzione dai vari operatori del settore saranno soggette ad un sistema di controllo istituito e gestito in conformità alle disposizioni del Regolamento n. 882/2004/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 "*relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali*" (GUUE n. L 165, 30.04.2004).

## RIASSUNTO

La produzione biologica è un sistema globale di gestione dell'azienda agricola e di produzione agroalimentare basato sull'interazione tra le migliori pratiche ambientali, un alto livello di biodiversità, la salvaguardia delle risorse naturali, l'applicazione di criteri rigorosi in materia di benessere degli animali e una produzione confacente alle preferenze di taluni consumatori per prodotti ottenuti con sostanze e procedimenti naturali. Il metodo di produzione biologico esplica pertanto una duplice funzione sociale, provvedendo da un lato a un mercato specifico che risponde alla domanda di prodotti biologici dei consumatori e, dall'altro, fornendo beni pubblici che contribuiscono alla tutela dell'ambiente, al benessere degli animali e allo sviluppo rurale. Gli autori prendono in considerazione e valutano il nuovo quadro normativo comunitario che disciplina il settore della produzione biologica: il Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio del 28 giugno 2007 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CEE) n. 2092/91 ed il il Regolamento CE 889/2008 della Commissione "recante modalità di applicazione del Regolamento (CE) 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, per quanto riguarda la produzione biologica, l'etichettatura e i controlli".

## SUMMARY

Organic production is an overall system of farm management and food production that combines best environmental practices, a high level of biodiversity, the preservation of natural resources, the application of high animal welfare standards and a production method in line with the preference of certain consumers for products produced using natural substances and processes. The organic production meth-

od thus plays a dual societal role, where it on the one hand provides for a specific market responding to a consumer demand for organic products, and on the other hand delivers public goods contributing to the protection of the environment and animal welfare, as well as to rural development. The authors take into consideration the rules regarding the new Community legal framework governing the sector of organic production: the Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91 and the Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control.

## **COMPORAMENTO SOCIALE DEL GATTO DOMESTICO: UNA RASSEGNA**

### **DOMESTIC CAT SOCIAL BEHAVIOUR: A REVIEW**

Barbieri M.<sup>1</sup>, Bracchi P.G.<sup>2</sup>

#### **PAROLE CHIAVE**

Comportamento sociale, adozione, benessere.

#### **KEY WORDS**

Social behaviour, adoption, welfare.

#### **RIASSUNTO**

Gli autori descrivono il rapporto uomo-animale con particolare attenzione alla qualità di vita del felino. In particolare il rilancio del modello comportamentale comprende: interazione sociale, comunicazione, personalità, stress, disordini comportamentali, aggressività e terapia. Tutte le condizioni riportate risultano essere influenzate più dalle caratteristiche del proprietario che da quelle del gatto.

#### **SUMMARY**

The Authors review cat-human relationship paying attention to the quality of life of cat in the home environment. In particular the behavioural patterns are revived: social interaction, communication, personality, stress, behavioural disorders, aggressivity and therapy.

All the conditions analysed result be influenced more by the owner's features than by the cat's ones.

#### **INTRODUZIONE**

L'uomo e il gatto appartengono a due specie diverse e hanno lingue distinte, ma fin dal loro primo incontro, entrambi hanno cercato di comunicare (1). Quando si decide di adottare un gatto, è opportuno valutare attentamente a cosa si va incontro, quindi conoscerne le caratteristiche, ed i bisogni (2). Quasi sempre, un buon rapporto, dipende dalla capacità del gatto di adattarsi alle aspettative del proprietario e questa è acquisita soprattutto nei primi due mesi di vita. Durante questo periodo, può apprendere la maggior parte delle informazioni che gli consentono di rapportarsi

1 Medico Veterinario Libero Professionista, E-mail: [mary.barbieri@yahoo.it](mailto:mary.barbieri@yahoo.it)

2 Dipartimento di Produzioni Animale, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti. Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma E-mail: [pg.bracchi@unipr.it](mailto:pg.bracchi@unipr.it)

con l'ambiente circostante e gli altri esseri viventi (3). Una scorretta socializzazione può determinare l'insorgenza di disturbi comportamentali più o meno gravi. Il felino ha straordinarie capacità d'apprendimento e d'adattamento, difatti spesso, siamo noi esseri umani che non ci rendiamo conto delle mancanze e degli abusi che infliggiamo per ignoranza.

## SOCIALIZZAZIONE

La socializzazione è un processo complesso che il gatto sviluppa in età evolutiva attraverso il contatto con i simili, altri animali e l'uomo, integrati con l'insegnamento e l'esperienza forniti dall'ambiente sociale; ciò porta a modellare le proprie caratteristiche e comportamento conformandoli all'ecosistema sociale in cui s'inserisce. Conoscere i primi momenti della vita può aiutare a capire come si sviluppano i disturbi comportamentali e come porvi rimedio. I primi due mesi di vita sono fondamentali, in quanto presenta una maggiore capacità di apprendere ed adattarsi agli stimoli. La socializzazione, quindi, si divide in periodi temporali in base alle modificazioni emozionali del soggetto (4).

○ *Periodo prenatale*: durante la gestazione risente degli stimoli ambientali, quindi lo stato emozionale della madre, le variazioni di temperatura sono importanti e già dal ventunesimo giorno inizia lo sviluppo della sensibilità tattile (è importante accarezzare con delicatezza la pancia della gatta).

○ *Periodo neonatale*: va dalla nascita all'apertura degli occhi (sette - dieci giorni), le palpebre sono chiuse, ma reagiscono ugualmente a forti stimoli luminosi. La maggior parte del tempo dormono e mangiano, per spostarsi si trascinano e la madre si occupa totalmente dei loro bisogni.

○ *Periodo di transizione*: inizia con l'apertura degli occhi e termina con lo sviluppo della vista e dell'udito. In questo periodo sviluppa il legame con la madre e i fratelli.

○ *Periodo di socializzazione propriamente detto*: è caratterizzato da enorme plasticità d'adattamento e capacità d'elaborazione e va da due a nove settimane d'età. E' importante che entri in contatto con il maggior numero di stimoli (altri gatti, cani e persone), queste conoscenze gli permetteranno di interagire con il mondo esterno. Dalla madre e dai giochi con i fratelli impara comportamenti specie specifici (corretta intensità di gioco, morso e graffio), sperimenta situazioni sociali e predatorie che lo preparano alla vita adulta. Il contatto con gli uomini è indispensabile per gettare le basi del futuro legame con il proprietario (5). Sviluppa risposte persistenti nel tempo, adattive, che gli permettono di creare un rapporto di buona coabitazione con il futuro gruppo familiare.

○ *Periodo del distacco*: in questa fase inizia a distaccarsi gradualmente dalla madre e comincia ad interagire maggiormente con tutto il resto, di solito coincide con l'adozione. Questo particolare momento, non deve essere né prematuro né tardivo.

○ *Periodo giovanile*: va fino alla fine dell'adolescenza che lo trasforma in un gatto adulto. Esplora, mette in pratica ciò che ha acquisito (gioco, attività predatoria, ecc.) nell'ambiente in cui si trova e intraprende relazioni con gli

individui con cui lo divide.

Ogni stimolo che incontra, condiziona le azioni future, per esempio una madre stressata, eccessivamente aggressiva, o timorosa nei confronti ad esempio dell'uomo condizionerà certamente in modo negativo il gattino, il contrario si avrà con una madre tranquilla. La *manipolazione* da parte dell'uomo, sin dalle prime settimane di vita, lo rende più socievole nell'età adulta e ciò sembra influenzare la velocità di sviluppo. Il contatto con animali di altre specie in età sensibile determina la sua maggiore accettazione di questi individui. L'isolamento e il mancato rapporto con la madre e i fratelli nelle prime settimane determina difficoltà di relazione con i propri simili (mancata inibizione del morso, paura, aggressività). La socializzazione intra ed extra specifica risulta essere così essenziale per l'acquisizione di fondamentali informazioni necessarie per la costruzione della struttura sociale del singolo individuo, senza le quali non si potrebbe relazionare con il mondo esterno (6).

Durante questo complesso ed articolato periodo si ha l'acquisizione d'importanti elementi :

- L'*autocontrollo*, se stimolato ha una reazione e poi una fase d'arresto.
- La *comunicazione*, intra ed extraspecie.
- La *gerarchizzazione*, un animale sociale deve imparare determinate regole che gli permettono di interagire.

Quanto esposto, mostra la correlazione tra uomo e animale, l'effetto di questo rapporto sullo sviluppo della personalità e dell'eventuale comportamento indesiderato (7).

Per affrontare un così difficile argomento vi sono studi comparativi che agguinano nuove ed interessanti teorie, arricchendo sempre più il termine di personalità (8).

## COMUNICAZIONE

Il mantenimento dei sistemi sociali si basa sullo scambio d'informazioni tra soggetti singoli e gruppo. Si avvale di sistemi visivi, vocali (uditivi), tattili ed olfattivi, questi cambiano e si arricchiscono con la crescita (4).

○ La *comunicazione visiva* si ha tramite espressioni facciali (dilatazione pupillare, direzione delle orecchie e apertura o meno della bocca) e posture corporee (posizione della testa, del corpo, degli arti e della coda), che si attuano soprattutto a distanza ravvicinata. Lo sguardo diretto è considerato un atteggiamento di sfida, tipico di un gatto sicuro di sé. Il diametro pupillare deve essere valutato in base alla luminosità dell'ambiente; la pupilla rotonda indica paura, ovale aggressività, leggermente tonda tranquillità. Le orecchie possono essere mosse rapidamente in ogni direzione poiché molto flessibili e il portamento indica stati d'animo diversi. Le orecchie erette indicano attenzione, leggermente flesse tranquillità, ruotate lateralmente (con visione della faccia interna del padiglione auricolare) aumento della tensione ed aggressività, ruotate lateralmente e abbassate sottomissione o azione difensiva, ruotate posteriormente e totalmente abbassate aggressione se la fuga è impossibile.

La bocca aperta, con la dentatura in evidenza e soffi indicano aggressività sia difensiva, sia offensiva. Il gatto sdraiato con esposizione del ventre mostra tranquillità, accucciato e immobile difesa, eretto sul posteriore con le zampe anteriori sollevate pronte a colpire (se intrappolato) mostra aggressività difensiva e offensiva, mentre la schiena inarcata e il pelo irto gli servono per apparire forte e minaccioso. La coda è uno strumento molto utile: eretta con il pelo irto è presente nel gatto in uno stato d'estrema reattività, abbassata e appoggiata a terra perpendicolare al suolo mostra aggressività, portata esternamente e posteriormente, ma anche eretta e leggermente ricurva si ha in condizioni di tranquillità e sollecitazioni amichevoli, mantenuta abbassata tra gli arti posteriori indica sottomissione e paura (9).

○ La *comunicazione vocale* è molto ricca: *le fusa* sono tipiche di un gatto contento e rilassato, *brontolare* e soffiare a bocca aperta si hanno in una situazione agonistica che può essere difensiva od offensiva, *battere i denti* si ha nell'osservare una preda irraggiungibile (stato di frustrazione), *miagolare* è tipico per salutare e chiamare (comunicare), ma, se diventa acuto come uno *stridio* (quando ha dolore) indica paura e aggressione.

○ La *comunicazione tattile*: rappresenta il contatto fisico, può essere con gatti, altri animali, persone od oggetti, ed essere amichevole, difensiva, offensiva. Dormire insieme, pulirsi, strofinarsi a vicenda, giocare e lottare sono tutti atteggiamenti nei quali gli animali si scambiano reciproche informazioni e socializzano. I baffi del gatto (macro e microvibrisse), sono veri e propri organi sensoriali, localizzati sulle guance, sopra agli occhi e sul mento, orientate lateralmente e in file orizzontali. Le macrovibrisse sono più lunghe, affondano le proprie radici profondamente nelle labbra superiori e sono dotate di recettori a rapido adattamento che risentono di qualsiasi spostamento del pelo, determinando distanza e profondità. Le microvibrisse sono più corte e sottili, permettono al felino di muoversi di notte più facilmente, perchè gli consentono di percepire la presenza d'oggetti vicini anche senza toccarli grazie alla percezione di piccoli vortici e correnti d'aria durante il movimento (10).

○ La *comunicazione olfattiva*: è di grande importanza, può essere diretta o indiretta (a distanza) e rimane per lungo tempo. I feromoni, sono responsabili della traccia odorosa lasciata dall'animale, comunicano il suo passaggio, stato d'animo ed intenzioni presenti e prossime. Sono prodotti da ghiandole posizionate in diverse parti del corpo e rilasciabili sia per strofinamento, che per emissione con le urine (11). Le feci normalmente sono sotterrate e nel momento in cui ciò non è fatto significa che il gatto vuole sottolineare il suo passaggio.

Quanto scritto fino ad ora deve essere interpretato in base allo stato emozionale dell'individuo e dell'ambiente, in quanto, la realtà può essere diversa da quella percepita a prima vista.



## PERSONALITA'

In psicologia umana il termine *personalità* comprende l'unione di due termini fondamentali, *temperamento* e *carattere* (12).

Il primo, indica l'insieme degli aspetti innati determinati geneticamente, consente all'individuo di reagire agli stimoli ambientali con determinate modalità piuttosto che altre (intensità, frequenza e soglia delle risposte effettive); questo comporta che ogni individuo ha tipiche soglie d'attivazione e che il funzionamento di questo meccanismo è innato (13).

Il secondo, deriva dalle esperienze ambientali e lo acquisisce per lo più nella prima infanzia. La personalità è associata alle differenze individuali, data dagli apprendimenti condizionati e rinforzati dal soggetto durante il suo percorso di vita. E' facile comprendere la complessità dell'interazione fra basi di partenza ed eventi che vanno a formare la personalità del gatto e quanto l'uomo incida nella sua evoluzione (14).

Le capacità individuali e le esperienze si sviluppano soprattutto durante i primi mesi di vita e sono importanti per l'evoluzione del comportamento. Ogni animale ha atteggiamenti simili a quelli della propria specie, ma contemporaneamente ne ha di diversi, che lo distinguono dagli altri (15).

## STRESS

L'uomo è portato a considerare il gatto un membro della famiglia, lo umanizza e ciò è spesso la causa incriminante di molti squilibri sociali che l'animale può manifestare (16).

Il comportamento d'ogni individuo, facente parte di un gruppo familiare, è strettamente correlato a quello degli altri membri (uomo compreso). Questa delicata interazione è sottoposta a precise regole. Un ambiente confortevole, privo di pericoli, non sovraffollato e ricco di stimoli è essenziale perché il felino si senta tranquillo e ben disposto verso gli altri. Un ecosistema adatto a soddisfare le sopra citate esigenze deve essere ampio e ricco di nascondigli (in modo da permettergli di isolarsi e muoversi liberamente), ed interessante (dove può giocare, cacciare, sdraiarsi al sole, essere libero d'interagire o rilassarsi) (17, 18). Spesso l'uomo non rispetta i tempi e le esigenze del proprio animale scatenando in lui atteggiamenti aggressivi. Una corretta socializzazione è necessaria per rapportarsi sia a livello intra che extraspecifico, ciò si realizza durante il periodo sensibile dello sviluppo, soprattutto attraverso il gioco dove il gatto interagisce ed impara a comunicare correttamente. Qualsiasi cambiamento dell'ambiente o l'introduzione di un nuovo individuo, può scatenare una reazione conflittuale dagli esiti non sempre prevedibili (19). Il perdurare di una situazione sgradevole può sfociare in un vero e proprio stato d'ansia. Diversi sono gli aspetti da considerare e molte sono le possibilità per migliorare tale situazione. E' evidente che se le condizioni non sono rispettate possono portare all'aumento dello *stress* e riflettersi sullo stato emozionale dell'animale. La percezione e la quantificazione dello stress possono essere difficoltose in quanto il gatto *non può parlare*. Il precoce riconoscimento dello stimolo scatenante il comportamento alterato, permet-

te, se possibile di rimuoverlo, oppure in caso contrario di presentarlo a piccole dosi in modo tale che il gatto si abitui. Se ciò non avviene, la deviazione comportamentale può complicarsi e rendere la vita familiare impegnativa. Generalmente stati di paura, d'irritazione ed altri disagi si manifestano con espressioni posturali, facciali, vocali, emissione di sostanze (feci, urina, spremitura dei sacchi anali), automutilazione e danni all'ambiente domestico (4, 20). La risposta fisiologica ad un particolare stimolo è multifattoriale: dipende da variabilità genetica individuale, fattori anamnestici, sesso, età e se la reazione è risolutiva in quella circostanza (4). Per esempio l'inesperienza durante lo sviluppo sociale, o la non corretta o troppo aggressiva esposizione ad uno stimolo, può essere l'origine di una fobia (21). L'animale apprende precocemente che, se non ottiene l'attenzione desiderata con atteggiamenti positivi, può ottenerla con altri meno accettabili e non particolarmente apprezzati dal proprietario. Quando il comportamento è effettivamente una richiesta d'attenzione, l'ignorare e il non reagire da parte del proprietario sono errori da evitare. L'interpretazione dei segnali che percepiamo è complessa e difficile, per questo motivo l'intervento del Medico Veterinario Comportamentista è sempre più richiesto.

## DISTURBI COMPORTAMENTALI

I principali disturbi comportamentali riscontrabili nei felini sono: aggressività, paura, ansia, pica, stereotipie, disordini eliminatori (marcatura urinaria ed eliminazione inappropriata) e distruzione dell'ambiente (22). Per queste patologie il proprietario spesso si rivolge al Veterinario. Come prima cosa, si deve appurare la causa del problema: se essa è di natura anatomica - fisiologica (dolore o patologia clinica), o se l'origine è da ricercarsi a livello psicologico. Ogni disturbo può avere motivazioni e possibili terapie (4):

- *Aggressività*: può essere difensiva, offensiva e protettiva, può essere suddivisa in categorie a seconda del motivo che la sollecita. Solitamente, si manifesta in uno stato di disagio dal quale l'animale non riesce a sottrarsi, ma si può esprimere anche durante il gioco. In entrambe le situazioni, se il gatto utilizza troppa forza, diventa fonte di disturbo (23, 24).
- *Paura ed ansia*: il gatto si trova in forte disagio e non riesce a sottrarsi (quando prova dolore, si sente aggredito o abbandonato). Le reazioni possono includere aggressività difensiva, distruzione dell'ambiente e marcatura urinaria (20).
- *Stereotipie*: sono auto-toelettatura esagerata (con rimozione di pelo), auto-traumatismi, vocalizzazioni eccessive, aggressività, movimenti ripetuti, suzione della lana e pica (ingestione di tessuti od altri oggetti). Sono atteggiamenti espressi in modo esagerato, senza alcuna motivazione e spesso sono ripetuti nel tempo (25).
- *Eliminazione inappropriata* è di due tipi: eliminazione impropria e marcatura urinaria. La prima è la minzione normale d'urina per quantità, ma in luogo inappropriato e le cause sono da attribuirsi alla cassetta (locazione, associazione a passato stimolo doloroso, substrato o odori sgradevoli e numero insufficiente nel caso di più animali). La seconda si ha per diversi motivi:

marcatura territoriale, natura sessuale e rassicurazione. E' emessa con spruzzo diretto su superficie verticale, in stazione quadrupedale (alcune femmine in posizione più abbassata) e con la coda sollevata (26).

○ *Distruzione ambientale*: distrugge o rovina mobili, tendaggi e altri oggetti (17). Lo fa per diversi motivi: paura, ansia da separazione, marcatura del territorio, gioco. Si deve tenere conto che in natura i gatti graffiano, in parte per rimuovere gli astucci corneali delle unghie e in parte per abitudine; quindi è importante permettere al gatto di potere svolgere questo atteggiamento innato (ad esempio con un graffiatoio).

## AGGRESSIVITA'

L'origine del comportamento aggressivo può e deve essere valutato prendendo in considerazione molteplici fattori, possono essere singole cause scatenanti o molto più spesso essere il risultato di più variabili. Prima di tutto si deve distinguere fra problemi d'origine puramente anatomo fisiologica (27), da quelli legati alla personalità. E' importante distinguere se si parla d'aggressione verso esseri umani o altri gatti, se sono episodi occasionali o continui e individuare la causa scatenante.

Il rapporto che si crea all'interno di un gruppo familiare, si crea nel tempo attraverso continui contatti e una corretta educazione da parte dell'uomo che cerca di comprendere i bisogni del proprio animale. L'aggressività può avere diversi bersagli, essere intraspecifica (tra gatti) ed interspecifica (uomo ed altri animali) e dividersi in categorie a seconda della causa scatenante (4):

1. *Aggressività provocata da mancata socializzazione* nei periodi sensibili della crescita.
2. *Aggressività da gioco*, è l'incapacità di modulare le proprie risposte perchè svezziati precocemente e educati solo dall'uomo.
3. *Aggressività da paura*, timore di qualche cosa.
4. *Aggressività da dolore*, si ha come conseguenza di una patologia clinica o di un trauma.
5. *Aggressività intraspecifica* (in genere tra maschi), si ha per la lotta associata alla riproduzione e allo stato gerarchico nel gruppo.
6. *Aggressività materna*, per proteggere la prole.
7. *Aggressività predatoria*, normale per un felino randagio che si deve procacciare il cibo, preoccupante se indirizzata verso un membro della famiglia (28, 29).
8. *Aggressività territoriale*, difesa della zona considerata propria, strettamente legata alla gerarchia.
9. *Aggressività ridiretta*, collera che non può essere scaricata verso la fonte che l'ha provocata e che viene reindirizzata verso un altro individuo che è presente nell'ambiente.
10. *Aggressività riguardante l'affermazione dello status*, relativa allo stato sociale, desiderio di controllare la situazione (alcuni felini mordono e poi se ne vanno).
11. *Aggressività idiopatica*, non provocata da alcuno stimolo, imprevedibile.

Nella valutazione dei fattori che contribuiscono a comportamenti indesiderati si deve considerare il rapporto tra età, sesso, stato riproduttivo, razza e gruppo familiare, tenendo presente che tutti questi problemi possono evolvere in diverse direzioni secondo la reazione individuale (30, 31).

Ogni soggetto, quindi, possiede una personalità complessa che deriva dal *temperamento* (insieme delle capacità innate) e dal *carattere* (dato dall'esperienza); l'intreccio dei due elementi porta ad una variabilità d'espressione ampia e di non facile valutazione (32, 33).

## TERAPIA

La cura dei problemi comportamentali può riguardare l'uso di sostanze chimiche che agiscono a livello sistemico, ma la maggior parte delle volte è sufficiente migliorare l'ambiente e educare l'animale correttamente (34, 16).

○ *Terapia ambientale*: è il miglioramento dell'ambiente (per esempio tenere la cassetta pulita e in un luogo tranquillo, assicurarsi che ve ne sia un numero sufficiente e che il substrato sia gradevole), aumentare gli spazi a disposizione e cercare di farlo sentire al sicuro (strofinare i punti di marcatura con coperte dove ha lasciato il suo odore, evitare cambiamenti bruschi). L'ambiente deve essere arricchito con giochi in modo da stimolare continuamente l'attenzione e permettere al felino di sfogare su questi la propria energia. Durante la giornata si devono rispettare i ritmi di riposo, gioco ed alimentazione, in quanto le alterazioni possono infastidirlo (17).

○ *Terapia feromonale*: è rappresentata da sostanze chimiche (feromoni d'appagamento), che danno sensazioni di benessere e tranquillità, neutralizzando quelle di paura ed ansia. Il farmaco maggiormente prescritto è il Feliway (analogo sintetico della *frazione F3 del complesso feromonale facciale del gatto*), è utile in tutte le situazioni in cui il felino mostra disagio (35, 11).

○ *Terapia comportamentale*: va applicata sullo stimolo scatenante, sul comportamento che ne deriva e sulle conseguenze nel momento stesso in cui si verificano. I comportamenti sgraditi persistono soprattutto per due motivi, quando l'animale ne trae condizioni favorevoli o non ha alternative. Nel caso in cui lo stimolo è riconoscibile, è sufficiente eliminarlo per arrestare l'azione, oppure, si può presentare a piccole dosi crescenti e presentarlo in un momento in cui è rilassato, come quando gioca o mangia, in modo da desensibilizzarlo (17, 36). La desensibilizzazione ha lo scopo di diminuire la sensibilità allo stimolo e permettere all'animale di adattarsi. In questo modo si cerca di sostituire lo stato psicologico stressante con uno rassicurante, come il pasto od il gioco (37). La punizione, se somministrata immediatamente, sistematicamente e se risulta sgradevole si può considerare una delle possibili soluzioni; l'importante è non infliggerla in preda all'*ira* per non generare paura. L'atto di premiare con qualche cosa di gradevole è un'altra alternativa.

○ *Terapia farmacologica*: si avvale dell'utilizzo di farmaci che svolgono un ruolo importante nell'influenzare il comportamento del felino e la sua capacità di relazione con l'ambiente. Prima di somministrarli, è opportuno provare

tutte le soluzioni alternative, in quanto, tali prodotti hanno sempre degli effetti collaterali anche se minimi. La terapia comportamentale deve sempre e comunque supportarla. Tra i farmaci più utilizzati abbiamo: clomipramina e fluoxetina, entrambi si utilizzano per una varia gamma di disturbi comportamentali e presentano diversi effetti collaterali più o meno rilevanti (38, 39).

## FEROMONI

I feromoni sono sostanze odorose prodotte dall'animale e cedute all'esterno con la finalità di orientarsi nel proprio ambiente, comunicare con i simili e svelare lo stato emozionale (40). Dal punto di vista chimico sono costituiti da varie molecole di acidi grassi, la cui formulazione e quantità li rendono attivi e specifici per ogni specie animale. Sono prodotti in diverse zone del corpo, stimolano specifici recettori e forniscono diversi messaggi (11, 35). Si rilasciano su altri esseri viventi, sul territorio esplorato, così da lasciare il proprio "*biglietto da visita*". Sono percepiti grazie all'organo vomeronasale, localizzato in un diverticolo della mucosa olfattoria all'interno del condotto naso-palatino. Tale organo è utilizzato per decifrare i messaggi veicolati da queste sostanze. Nel momento in cui il gatto li annusa manifesta un particolare atteggiamento definito *flehmen*, caratterizzato da una caratteristica espressione facciale. Il gatto solleva il labbro superiore, apre lievemente la bocca e muove la lingua per favorire il passaggio della sostanza verso l'organo vomeronasale. Le informazioni chimiche trasportate sono trasformate in impulsi elettrici dal *sistema vomeronasale* (nervo vomeronasale, bulbo olfattivo accessorio, amigdala e ipotalamo), raggiungendo così il cervello (11). Sono classificati in tre categorie in base al tipo d'emozione evocata e alla zona di produzione (11).

1. *Feromoni d'appagamento*: sono prodotti nella zona facciale (ghiandole temporali, periorali, vibrisse e mento) e al momento del parto lungo la linea inter-mammaria. Trasmettono una sensazione di benessere, diminuisce l'aggressività all'interno di un gruppo favorendone la convivenza e vengono emessi quando gli animali *si strusciano* con il muso tra loro, sugli oggetti della casa o sulle persone (41).

2. *Feromoni d'allarme*: sono prodotti a livello delle ghiandole perianali (il secreto è spruzzato all'esterno) e dei cuscinetti plantari. Sono prodotti in momenti d'intensa paura ed ansia (42). Sono rilasciate sulle superfici, indicano uno stato emozionale di forte disagio dell'individuo e hanno lo scopo di mettere in allerta i simili.

3. *Feromoni territoriali e sessuali*: sono prodotti a livello dell'apparato genito-urinario, da entrambi sessi, sterilizzati e non. Il loro rilascio è concomitante alla marcatura urinaria. Sono rilasciati nel territorio per indicare il proprio passaggio, ed aumentano nel caso vi siano dei cambiamenti olfattivi (estranei, mobili nuovi, le superfici marcate sono pulite, si sovrappone un altro odore o quello presente svanisce). La marcatura urinaria si ha con un particolare rituale: il gatto individua la superficie verticale interessata, in posizione quadrupete e con le zampe anteriori fa dei movimenti come se "impastasse", dopodiché si gira con il posteriore verso la zona, alza la coda che vibra leggermente e

spruzza orizzontalmente l'urina. L'urina emessa in posizione eretta è annusata dagli altri gatti più a lungo rispetto a quella in posizione accucciata perché trasmette informazioni diverse.

I feromoni sono stati studiati a lungo ed è stato scoperto il *complesso feromonale facciale del gatto*, composto da quaranta elementi di cui solo tredici comuni a tutti i gatti ed ogni gatto può non secernerli sempre tutti. Le secrezioni sono state analizzate e si è riusciti a identificarne cinque frazioni che comunicano differenti messaggi.

La frazione F3 contiene tre messaggi della normale secrezione facciale del gatto:

- *Inibizione della marcatura urinaria*
- *Facilitazione dell'inserimento in un nuovo ambiente*
- *Facilitazione nell'esplorazione di un nuovo ambiente*

In Italia è commercializzato unicamente il Feliway in due differenti formulazioni: spray e diffusore per ambienti. E' un analogo sintetico della frazione F3 del complesso feromonale facciale di gatto alla concentrazione del 2% con eccipienti alcolici. E' indicato per prevenire i principali disturbi comportamentali felini (43). I feromoni d'appagamento hanno lo scopo di neutralizzare quelli d'allarme, stabilizzare lo stato emozionale, in modo da tranquillizzare l'animale. Si utilizzano in diverse situazioni: interruzione e prevenzione della marcatura urinaria, in caso di graffi sugli oggetti e o distruzione di mobili e tappezzeria, rendere più facile l'introduzione in un nuovo ambiente o l'arrivo di un nuovo soggetto (adozione), il trasporto del gatto e gli eventuali cambiamenti ambientali o dello stato emozionale (44).

## CONCLUSIONI

Il rapporto tra uomo e gatto si crea nel tempo attraverso l'esperienza e il suo equilibrio dipende da entrambe le specie, dalle aspettative e dalle capacità di comunicare che si vengono ad instaurare (45, 46). Spetta all'essere umano, conoscere, comprendere le problematiche che si presentano e trovare il modo corretto di risolverle. L'origine del problema è quasi sempre l'incapacità di capire e correggere la fonte di disagio dell'animale. E' importante cambiare il modo di vedere lo stato di benessere e di stress dell'animale per riuscire a migliorare le condizioni di entrambi. Infatti i gatti, come tutti gli animali da compagnia, rivestono un importante ruolo nello stato di benessere della persona che lo accudisce (47, 48). Il segreto di una buona convivenza? Tanta pazienza, disponibilità e un po' d'amore.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Blackshaw J.K. (1996) Developments in the study of human-animal relationships. *Applied An. Behav, Science*.
- 2) Shore E.R., Shore E.R. (2005) Returning a recently adopted companion animal: adopters' reasons for and reactions to the failed adoption experience. *J. Appl. Anim. Sci. Welf.*, 8 3: 187-198.
- 3) Crowell Davis S.L., Curtis T.M., Knowles R.J. (2004) Social organization in

- the cat: a modern understanding. *J. Feline Med. Surg.*, 6, 1: 19-28.
- 4) Overall K.L. (2001) La clinica comportamentale del cane e del gatto, E.G. Edizioni Medico Scientifiche, 4: 77-103, 7: 206-218, 8: 235-262, 11: 361-366.
  - 5) Wright J.C., Amoss R.T. (2004) Prevalence of house soiling and aggression in kittens during the first year after adoption from a humane society. *J Am Vet Med Assoc.*, 224, 11: 1790-1795.
  - 6) Pageat P. Patologia comportamentale del cane. *Point Veterinarie Italie*, 1: 18-20, 1: 31-33.
  - 7) Gosling S.D., John O.P. (1999) Personality dimension in non-human animals: A cross-species review. *Current Directions in Psychological Science*, 8: 69-75.
  - 8) Gosling S.D., Vazire S. (2002) Are we barking up the right tree? Evaluating a comparative approach to personality. *Journal of Research in Personality*, 36: 607-614.
  - 9) Cafazzo S., Natoli E. (2009) The social function of tail up in the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Behavioural Processes*, 80, 1: 60-66.
  - 10) Quaranta A., De Cola F., Siniscalchi M. (2001) Funzioni sensoriali delle vibrisse del gatto ed implicazioni etologiche. *Rassegna di Medicina Felina*, 1: 29-33.
  - 11) Macelloni S., Antoni M., Mengozzi G., Guidi G. (2002) La comunicazione chimica negli animali: i feromoni (Impiego clinico nel gatto). *Rassegna di Medicina Felina*, 3: 7-18.
  - 12) De Palma C., Viaggiano E., Bacillari E., Palme R., Dufour A.B., Fantini C., Natoli E. (2004) Osservazioni etologiche per determinare il temperamento di cani residenti nel pubblico canile e ospedale veterinario. *Progresso veterinario*.
  - 13) Takeuchi Y., Houpt K.A. (2003) Behavior genetics. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 33, 2: 345-363.
  - 14) Gosling S.D., Kwan V.S.Y., John O.P. (2003) A dog's got personality: A cross-species comparative approach to evaluating personality judgments. *Journal of Personality and Social Psychology*, 85: 1161-1169.
  - 15) Jones A.C., Gosling S.D. (2005) Temperament and personality in dogs (*Canis Familiaris*): A revive and evaluation of past research. *Applied Animal Behaviour Science*, 95: 1-53.
  - 16) Guidi G., Mazzini D. (2008) Approccio sistemico ai disturbi comportamentali del cane: il "cane-problema". *Bollettino AIVPA*, 4: 21-27.
  - 17) Dehasse J. (2005) Gestione e trattamento dei comportamenti di aggressione nel gatto. *Rassegna di Medicina Felina*, 1: 7-22.
  - 18) McCobb E.C., Patronek G.J., Marder A., Dinnage J.D., Stone M.S. (2005) Assessment of stress levels among cats in four animal shelters. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 226, 4: 548-555.
  - 19) Lord LK , Reider L , Herron ME , Graszak K. (2008) Health and behavior? problems in dogs and cats one week and one month after adoption from animal shelters. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 233, 11: 1715-1722.
  - 20) Levine E.D. (2008) Feline fear and anxiety. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim.*

- Pract., 38, 5: 1065-1079.
- 21) Antoni M. (2005) Sviluppo comportamentale del gattino e disturbi ad esso correlati. *Rassegna di Medicina Felina*, 1: 29-33.
  - 22) Horwitz D.F. (2008) Managing pets with behavior problems: realistic expectations. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 38, 5: 1105-1121.
  - 23) Beaver B.V. (2004) Fractious cats and feline aggression. *J Feline Med Surg.* Febbraio 2004; 6, 1: 8-13.
  - 24) Amat M., Manteca X., Brech S.L., Ruiz de la Torre J.L., Mariotti V.M., Fatjó J. (2008) Evaluation of inciting causes, alternative targets, and risk factors associated with redirected aggression in cats. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 233, 4: 586-589.
  - 25) Horwitz D.F., (2000) I disturbi compulsivi del gatto. *Sisca Observer*, Dicembre: 16-18.
  - 26) Notari A. (2005) Disordini eliminatori nel gatto. *Rassegna di Medicina Felina*, 1: 35-40.
  - 27) Dodman N.H., Shuster L. (2000) *Farmacologia comportamentale*. Edizioni Veterinarie e Masson.
  - 28) Palacio J., León Artozqui M., Pastor Villalba E., Carrera Martín F., García Belenguer S. (2007) Incidence of and risk factors for cat bites: a first step in prevention and treatment of feline aggression. *J. Feline Med. Surg.*, 9, 3: 188-195.
  - 29) Dehasse J. (2005) Comportamenti aggressivi del gatto verso l'uomo. *Rassegna di Medicina Felina*, 1: 23-28.
  - 30) Bamberger M., Houpt K.A. (2006) Signalment factors, comorbidity, and trends in behavior diagnoses in cats: 736 cases (1991-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 229, 10: 1602-1606.
  - 31) Curtis T.M. (2008) Human-directed aggression in the cat. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 38, 5:1131-1143.
  - 32) Gosling S.D., (1998) Personality dimension in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). *Journal of Comparative Psychology*, 112: 107-118.
  - 33) Corr P.J., Perkins A.M. (2006) The role of theory in the psychophysiology of personality: from Ivan Pavlov to Jeffrey Gray. *Int. J. Psychophysiol.*, (62) 3: 367-376.
  - 34) Notari L., Gazzano A., Gallicchio B. (2007) Le competenze comportamentali in terapia comportamentale degli animali da affezione: una questione di tutela del benessere animale. *Bollettino AIVPA*, 2: 25-32.
  - 35) Antoni M (2002) La comunicazione chimica: i feromoni ed il loro utilizzo nel cucciolo e nel gattino. *Sisca Observer*, Ottobre: 11-15.
  - 36) Notari L. (2002) Gli animali da compagnia e il gioco. *Sisca Observer*, Ottobre: 17-21.
  - 37) Endenburg N., Knol B.W. (1994) Behavioural, household, and social problems associated with companion animals: non-owners. *Veterinary Quarterly*, 16: 130-134.
  - 38) Jöchle W. (1998) Abnormal behavior and adaptation problems in dogs and cats and their pharmacologic control. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Klientiere. Heim-*



- tiere., 26, 6: 410-421.
- 39) Notari L. (2001) Un disturbo comportamentale trattato con fluoxetina in un gatto. *Rassegna di Medicina Felina*, 1: 23-27.
  - 40) Proverbio D., Perego R., Baggiani L., Spada E., Domenichini G., Camoni E. (2008) Valutazione della sala d'attesa come fattore stressogeno: nel gatto: influenza di un analogo della frazione F3 dei feromoni facciali di specie. *Rassegna di Medicina Felina*, 4: 7-14.
  - 41) Bergman L., Gaskins L. (2008) Expanding families: preparing for and introducing dogs and cats to infants, children, and new pets. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 38, 5: 1043-1063.
  - 42) Schwartz S. (2002) Separation anxiety syndrome in cats: 136 cases (1991-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 220, 7: 1028-1033.
  - 43) Frank D., Dehasse J. (2003) Differential diagnosis and management of human-directed aggression in cats. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 33, 2: 269-286.
  - 44) Moffan K. (2008) Addressing canine and feline aggression in the veterinary clinic. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 38, 5: 983-1003.
  - 45) Lee C.M., Ryan J.J., Kreiner D.S. (2007) Personality in domestic cats. *Psychol Rep.*, 100, 1: 27-29.
  - 46) Barbieri M., Gandolfo A., Bracchi P.G. (2008) Behavioural profile of the aggressive dog: a review. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria Vol. XXVII 2007*, 73-82.
  - 47) Dehasse J. (2002) *L'enfant et l'animal*. Zoopsy, Bordeaux.
  - 48) Prosser L., Townsend M., Staiger P. (2008) Older people's relationships with companion animals: a pilot study. *Nursing Older People*, 20, 3: 29-32.



## LEGAL AND BIOLOGICAL PROFILE OF CITY PIGEON

### INQUADRAMENTO BIOLOGICO E GIURIDICO DEL COLOMBO DI CITTA'

Bursi Eleonora \*, Bracchi Piergiovanni \*\*, Zannetti Giuseppe\*\*\*

#### KEY WORDS:

Urban hygiene, pigeon, city pigeon, animal pollution.

#### PAROLE CHIAVE:

Igiene urbana, colombo, colombo di città, pullulazione animale.

#### SUMMARY:

The AA analyse the biological profile of feral pigeon for define the legals aspects of the control of urban populations of these animals.

#### RIASSUNTO:

Gli AA analizzano il profilo biologico del colombo di città per definire gli aspetti giuridici del controllo delle popolazioni inurbate di colombi.

#### INTRODUCTION

A big challenge for the veterinary science and profession is the urban hygiene, where the veterinarian, in the past years chiefly engaged in agro-zootecnic activities and milieu, is called to face and resolve problems developing from animals in the metropolitan circle.

The animals, in fact, are changing and, more, are trasforming their relation with the man irself, revealing an unexpected fitting, which tend to subvert the more accepted eco-ethological schemes, also those associated to species diseases or trasmitted to the man.

At this context, well then, are added new aspects of the man-animal living together, also those which create new epidemiologic ways of zoonoses and before unimaginable, negative inferences on the artistic, architectonic and urbanistic patrimony of Italy.

---

\* Doctor's degree in "veterinary medical sciences", curriculum "laws of european union countries for animal protection and welfare", department of veterinary public health, university of messina, italy

\*\* Department of animal production, veterinary biotechnology, food safety and quality, university of parma, italy

\*\*\* Department of animal health, university of parma, italy

A good example of this situation is the city pigeon, till no many years ago an only “historical” (and, therefore, untouchable !) component of many italian urban panoramas (Venice, Florence, etc.), while today the same animal is pointed as responsible of severe risks for human health and of real damages to the artistic public property in the towns invaded from these nice animals.

This is a “crawling” invasion from these animals which, from not much ten of subjects, have reached numbers “with four zero” (1), recalling the attention of local authorities only when the risks and damages are most evident, sometime in painful or economically relevant forms.

At the beginning, in fact, the “technical” reactions of the administrative, both human and veterinary, authorities, psychologically used to prophylactic activities with decrees, seizures and coercive killing, halted immediately against protectionist and animalist “wall”, which have opposed a efficacious resistance based on correct juridical argumentations. These, however, have been opposed in many circumstances by as much opposite facts and remarks, also expressed in some juridical sentences, by which are absolved mayors and local administrations from the accusation of authoritative abuse in reducing the demographic “pression” of city pigeons.

More recent sentences, however, chiefly from the administrative justice, have rekindled the discussion about the lawfulness or not of the actions for the control of citified pigeon populations. For resolve this contrast, it is necessary revisit the juridical framing of the avian inurbed pigeon population, which is also strictly conditioned by their zoo-biological profile, compared with the exigencies of sanitary prophylaxis and protection of artistic patrimony of the cities.

In the present script, we just discuss these two biological and juridical profiles of the city pigeon, for give to the operators and the experts in this matter valid fundaments for choices and decisions which concern the veterinary competences.

## **BIOLOGICAL PROFILE OF CITY (ALSO CALLED “FERAL”) PIGEON**

### **Historical origin of this species**

The first data about the presence of the pigeon near the man dates back to the some ancient period.

The first fossils of pigeons living near to human installations in Jordan and in Palestine are of 300.000 years ago and justify the extensive citations of this animal in the Bible, in Homer Iliad, but often represented also in the Egyptian, Greek and Roman iconography. In most ancient civilisations, the pigeon is a symbol of divine virtues and, in more recent times, the dove is used for represent the peace and the purity and, in the Catholic iconography, the Holy Spirit, third person of the Trinity.

The oldest written documents about these birds came from the end of IV century A.C. and refer to the pigeon-houses in the ancient Mesopotamia, where the pigeons are used as real compass for the navigation and, for this purpose, are shipped, as for other navigator nations (Greek, Indian, Chinese, etc.). Also for this reason, the Phoenicians diffuse the veneration of the pigeons in the entire Mediterranean area (2).

The Greeks, first, discovered and use the *animus revertendi* of the pigeons as carriers of messages, developing the pigeon breeding, which diffuses by the Romans

in all the Europe. In the ancient Rome there are great pigeon-houses, also because the Romans much appreciated the meat of these animals, which received a consistent selective “pression” for ameliorate the meat quality.

In this period, so, appear the first meat breeds and, in the following Middle Ages, the ornamental and racing breeds, used for the messages transport.

More near to our times the selective process for meat production increases, so that in North Europe the pigeon for many century is one of the avian species more used for human nutrition. For racing use, it is said that there are 60 millions of pigeons in Europe used in different agonistic activity (long and middle distance, full speed). Until the last post-war, the carrier pigeon has a consistent use as communication means for military purposes.

### **Biology of species**

The pigeon differ from other avian species for their ability of “suckling” drink water ad for the production of “crop milk”, a caseous material derived from the physiologic degeneration of the ingluvies wall, regulated by the prolactin of both the parents after egg opening.

This bird have minimal sexual dimorphism, wich is expressed by a more sweet head profile, more thin beak and more slender body silhouette in female subjects; both sexes are more simply differentiate by the behaviour and by the calls during the courtship.

The wings of the pigeons are structured for both quick or long endurance flights; this animal is so able to flight for 800 km going a mean 70 km/hour.

This species is monogamic and each pair produces two egg for any coition. Both the parents are engaged in the parental cares.

### **Conventional “types” and denominations of the pigeon**

The long history of the pigeon as domestic animal or taken off in the natural surrounding of the human communities produces different “types” of pigeons, so characterized by habits or aptitudes, to which correspond so much denominations, not always corrects, however, in the zoological or juridical perspectives.

- **Wild pigeon – pigeon biset, blue barred rock pigeon:** is the reference wild species and have the taxonomic denomination of *Columba livia* (3). These have populated in small flocks the agrosylvestrian environments with some peculiar characteristics (rocky and steep grounds, with small cavities where the nidification is easy and safe). “Residual” population of these wild pigeons with these eco-etological characteristics are described in some circummediterranean areas, especially in big islands, where remain perhaps conditions of some genetic “purity”, already lost in continental area by heavy contaminations from domestic pigeons. Also for the environmental and climatic changes of the last decades, this “type” of pigeon numerically is very reduced (4).

- **Torraiolo pigeon (tower’s pigeon):** of this bird during the 17° and 18° century is encouraged the urbanisation, both facilitating the colonisation of winding paths in the stone buildings (nobiary palaces, bell-towers, boundary walls, etc.) and by the realisation of dove-cots, at these times sign of nobiliary privilege as important

source of food (5,6). Of these pigeon populations is remarked a consistent drop of their number, at least for the original phenotype, so much for many zoologists this pigeon is to be considered died out.

- **Domestic pigeon:** all the pigeon breeds selected from man for utilitarian purposes (ornamental, racing or meat production) (7).

- **City or feral pigeon:** is the pigeon which lives in the cities, descended from repeated cross of different breeds of domestic pigeons lost in racing events or surviving after pigeon-shooting competitions with wild pigeons or autochthonous "torraioli" (8).

### Taxonomy of domestic pigeon

In *Columba* genus there are 60 species, of which 3 are european: *Columba livia* (wild pigeon), *Columba oenas* (stock-dove) and *Columba palumbus* (wood-pigeon) (9,10).

*Columba livia*, have 12 subspecies according to (11) and 13 according to (2).

The wild pigeons have a poor consistence in Italy and in all the mediterranean basin at this time and for these animals is proposed the linnaean name of *Columba livia livia*.

From this wild primordial genetic origin is derived domestic pigeon (*Columba livia domestica* (12,13), living near the man and its communities, at the research of more safe nidification sites (temples hypothesis, according to (14) or of certain and steady food sources, as these created by diffusion of cereal cultivation (synanthropic hypothesis of 2, 5, 13). On these animal populations have push the selective pressure of man which select at each time the more productive characteristics, as fertility, precocious body development, etc.

From the first domestication, in any case, the breeders stimulate the *animus revertendi*, already developed in some degree in the wild pigeon, for reinforce the binding of these animals to their houses and for oppose the migratory habit of this species when living in wild status.

The morphological and ethological characteristics of hundred and hundred breeds of pigeons selected by the man differ deeply from these of their forefathers, so that these birds are unable today to live far from the man.

According also with the theory of Darwin (16), the major zoologists of this field of study and research (16,17,18, 19) agree that the domestic breeds of pigeons have monophyletic origin from an only paleartic-oriental progenitor of many million of years ago. At these times, this animal lived in the south Asia deserts, from where the original "pure" nucleus diffused to the mediterranean area, the true "cradle" of the domestication of this species.

Different opinions about this matter, however, are expressed (20, 21); these points of view, based on the polyphyletic origin of various breeds of pigeons (8, 22) emphasize the fundamental contribute to the genetic definition of domestic pigeon from others species, as *C. palumbus*, *C. oenas*, *C. leuconota*, *C. rupestris* and *C. guinea*, with the contribution also of other now extinct breeds, as *Raptus cucullatus*, *Didus ineptus* and *Ectopistes migratorius* (7).

Notwithstanding this zootaxonomic *quaestio* is not yet exhausted, it is evident the common origin of all species and dominant phenotypes of domestic pigeon, com-

monly named *C. livia domestica*, from the surely wild species *C. livia*, also in their sub species *C. livia livia*.

This discussion about the phylogenetic origin of domestic pigeon have not only an academic significance, because their juridical evaluations are most influenced by the biological profile of this animal defined in the perspective of his phylogenesis.

### **Genetic and biological profile of city pigeon**

The appearance of consistent and socially organised numbers of pigeons in urban environment is the consequence of a removal of just number of animals from the rural and forest milieu to that created by the human communities. There was initially a slow process, where pigeons in pair or in large flocks from wild areas have reached the towns, forwarding or reabsorbing or forcing to extinction the autotone populations of pigeons.

The affinity of the species had then supported the the continuous cross-breeding of these wild populations (*C. livia*, *C. livia livia*, etc.) with these of domestic origin (*C. livia domestica*) in a biological and numerical “crescendo”, which have some limits only in the urban hunting by human poor class, which in the urban pigeon have a consistent and cheap source of food: some popular dishes with pigeon meat in various italian regions, as the “bomba di riso” in Emilia, have really this origin!

The improvement of economic conditions in our cities has reduced the necessity of pigeons as source of nutritional proteins for humans and therefore the demographic-depressive action due to “urban” hunting. The pigeon, moreover, is a very plastic and resistant species, so that for these animals there are no relevant damages from environmental and atmospherical pollution, the same that have put to flight away the most part of rapacious birds, as kestrels, falconers, etc., natural enemies of pigeons (5, 23, 24).

Some aspects of urban milieu, as these associated to the presence of solid wastes, have even improved the diet of the pigeons, giving to these animals a rich and more various feeding in all year seasons.

The city pigeons, therefore, became a “waste cast” animals, are very different from these strictly granivorous of their origin, have a rich feeding which improve their reproductive behaviour, also modified by the urban microclimate: the city is warm and, during the winter months, the artificial lights goad the photoperiodical events and, consequently, the most efficiency of reproductive apparatus and the demographic rise of inurbed animal populations (25).

These urban flocks, moreover, have a continuous genetic contribution not only of wild origin, but also of domestic origin, as that from race pigeons, missing during the competitions because of atmospherical events, fatigues, hunger, etc., which induce the landing of these birds. Those are so “abosorbed” from the urban pigeons and remain in the urban milieu.

In Italy, during the period between the two World Wars, there was the custom of celebrate some public anniversary with choreographic “flights” of pigeons which not alway return to their native pigeon-houses.

For that, it is impossible defines the characteristic phenotipe of urban pigeon, because these animals are really a *pot pourri* of genetic heritage, exterior aspect and behaviour, where however dominate the domestic pigeon. Is as many difficult, therefore, distinguish these two species, also for the *animus revertendi*, always present in all the city animals, but with different intensity. For this aspect, in facts, the reference sites of this important istinct is not the pigeon-house or the garret of a specific house of humans, but a single way or district where the animals are born and at which the animals shall return when someone have removed the single pigeons (28, 29).

\* \* \* \*

For these reasons, the city pigeon is not an entity generated from progressive expansion of an original homogeneous nucleus, as in the wild animals, but these populations derive from distinct and contingent events, from which develop biologically autonomous forms and expressions (5). There fore, the urban pigeons are not animal communities returned to a wild status, because these animals have permanent and important requirement of live near (even into!) the human communities, often with unchanging topographic references, as is expected from animals with dominant domestic, biological and behavioural, components, while their wild components are diluted in frequent and consistent “contaminations” from domestic origin.

By analogy with other species, particularly the dog, the more common domestic animal, the domestic pigeon has a obligate relation with human species and his communities, also if this relation is not strictly limited to a single person or at the house of this. As the dog in the same conditions, therefore, the urban pigeon is a stray animal (30), very different from the wild or the wild again animal, which run away the man and refuse the contact with its settlement, refuging in hidden gorges, far from the human communities.

## LEGAL PROFILE OF URBAN PIGEON

### **Penal responsibility from presence of pigeons in the urban community**

The above described biological qualification of the city pigeon is very important to define the lawfullness of public and private interventions on these animal populations.

Are well known the risks linked to the presence of these uncontrolled numbers of animal for the human health (31, 32, 33), for the artistic and architectonic patrimony and for the costs of cleaning and keeping the decorum of the city (36).

For these risks, sometime true hygienic and sanitary emergencies, the local authorities have alway institutional and legal obligation of intervene by the powers foreseen from art. 38, comma 2, of the Law 142/1990 about local autonomies, and from the Law 833/1978 which institute the National Health Service. Both these laws confirm the lawfulness of contingible and urgent actions in matter of public health and hygiene. For that, there is fault for omission of official acts (art. 328 of Penal Code) for the official local authorities which dont intervene with proper acts for reduce these risks dues to transmissible infectious diseases, which are associated to the presence of inurbed stray pigeons.



The intervention of the public officers is often opposed by the protezionistic or animalistic associations, ideologically contrary to all the activities anyhow reducing the animals in urban milieu, independently of the methods used for achieve these purposes. From the first years of this opposition, the legal actions of these protectionist movements refer to the abuse of official acts (art. 323 p.c.) in the reduction of avian population in cities, because is applied on “wild” pigeons. If really “wild”, in fact, these animals are protected by current laws, chiefly the art. 1 of L.157/1992 for the protection of wild fauna. These laws consider wild animals as *res communis*, unavailable property of the State and, therefore, protected for the interest of national community.

### **Legal profile of the urban pigeon**

The above mentioned juridical doubt has protracted for some years, producing a long legal and administrative contentious cases and paralysing the decisions from the public administrations in argument of city pigeons.

At last, a sentence of the Local Magistrate of Cremona (n. 83, 18.01.1988, Nuzzo), judging a mayor because of a decret of intervention for reduce inurbed pigeons, has defined that the city pigeons dont have requisites of wild animals, according to the indications of Supreme Court (Cass. Pen., sect. III, n. 5345, 6.06.1997): these birds, in fact, dont live in nature at free state, is not subdue to man, with which these animals have not any obliged or ethologically justified contact, this last characteristic, above all, is absent in the city pigeons, which is strictly linked to human communities, also when lack primary utilitaristic or constrictive reasons.

The National Institute for Wild Fauna (INFS), public agency of study and research, quickly has confirmed the opinion of the above cited magistrate, defining the urban or city pigeon as *stray*, i.e. ex-domestic animal, because their behaviour and biology (nutrition, reproduction, etc.) express itself only by their presence into the human communities.

The INFS has stated also (advice of 28.11.1996) that the urban pigeons are *property* of local public administrations which, in observance of the state laws, take the most suitable measures for limiting damages due to these animals.

In following years, the same I.N.F.S. (advice of 21.03.2004) confirm that the urban pigeons are “*man-dependent*” and *phenotypically domestic* animals and, therefore, are not included in the field of application of the L. 157/92 for that concern the protection of wild animals.

The above cited L.157/92, which also decree (art. 19, comma 2) the lawfulness and even the legal obligation for the regional administrations of control the wild species, also whith their kill for purposes of public health, preservation of hystoric-artistic works and of agricultural productions. This law, in fact, bind the regional administrations to operate in this matter with appropriate normative measures. These local law interventions are indeed promulgated in almost all the national territory, also for minor territorial units (provnces, communes, mountain communities, etc.).

Others provisions of law supporting the legality of interventions of private or public entities on the control of urbanized pigeons refer to the art. 638 of Penal Code which disposes that shall not punish the kill or deterioration of animals caught to

damage in private properties, but this rule is applied only in agro-zootechic context and hardly ever in urban environment.

### **Recent jurisprudential updating about city pigeon**

The sentence of local magistrate of Cremona on city pigeon where this animal is qualified as *stray domestic animal*, even though exemplary under his biological-scientific profile and based on serious juridical argumentations, has not blocked the evolution of the concepts concerning the city pigeon.

In particular, there are some sentences and legal advices which seem to go in opposite direction as regards the above cited sentence from Cremona, proposing again the city pigeon as wild animal. This jurisprudence, however, don't modify or change the principles already expressed in reference laws (L. 157/1992) and other sequential regional and local laws. These sentences confirm the legal correctness of all the interventions on the city pigeons, when there is a consistent and real risk for public health and for the monumental community property, but consider only some specific conditions, also evaluating these by questionable argumentations.

In this perspective, we cite the sentences n. 284/92 of the Court of Torino, n. 2598/2004 of the Supreme Court and n. 862/08 of the Regional Administrative Court of Veneto, which erroneously propose again the city pigeon as "tower pigeon" or "torraiole", therefore considered "wild animal". All the zoologist which have treated this matter are agreed not exist the "tower pigeon" since for many decades, because is "sucked" from stray ex-domestic pigeons, in the terms above discussed.

Other sentences, instead, refer to different methods in use for the control of city pigeons, rebuking the operators in these activities to the observance of rules for the protection of animals from abuses (art. 544 bis, 544 ter and art. 727 of Penal Code), also respecting the laws which limit the power of mayors for authorize the hunting of the city pigeons.

Further updating in this matter arrived from the decree n. 267/2000 (T.U. of local administration rules), which more limit the mayor powers as government officers also in the matter of public health, but without any substantial modification of his autonomy and authority in promulgation of contingible and urgent decrees into the limits fixed by specific sentence of State Council (n. 605/1985).

These juridical opinions and clarifications substantially have not modified the qualification of "stray animal" for the city pigeon, which also is confirmed by a recent note of I.N.F.S. (21 march 2007).

These laws, besides, don't raise the public bodies from the obligations for interventions when there are risks for the community dues to uncontrolled populations of city pigeons, but rest on these authorities the care of choosing the methods and instruments of intervention (38,39,40); we have reported these in tabular form (tab. 1), also because their specific treatment is off the purposes of the present article.

## **FINAL CONSIDERATIONS**

The potential damages produced by city pigeons quite justify the attention reserved to the arrival of these animals in the urban settlements and to the methods

and procedures for their control in the perspective of public health and protection of artistic and architectonic assets.

This situation, however, does not authorize interventions of extermination or bloody activities on these animals, which really have an important role in the scenario and in the historical profile of many Italian towns.

The right solution and the limits of these interventions are only defined by the public health services, especially the veterinary public health operators with their biological, urban and environmental competences.

These activities are supported by the good knowledge of the jurisprudence and the current laws. These, in spite of some apparent contradiction in their evolution, guarantee a good “covering” for the public authorities and for the public health veterinarians, when the last provide firm biological and clinico-pharmaceutical supports.

**Tab. 1.** Control methods for populations of city pigeons.

METHODS	COMMENT
CONTROL AND REDUCTION OF NESTING SITES	Efficacious only in association with other methods
CAPTURE AND SUPPRESSION OF PIGEONS	Only temporary effect because new pigeons from near sites occupy the empty spaces – Negative reply from public opinion
CAPTURE AND LIBERATION OF PIGEONS IN OTHER SITES	<i>Animus revertendi</i> quickly minimizes temporary reduction of population of pigeons
RESTRICTION OF FEEDING SOURCES	Decreases of prohibition of feeding for pigeons are ineffective if there is no other active intervention of control
USE OF PHYSICAL OR CHEMICAL REPULSIVES	Efficacious only for protection of limited areas or structures (monuments, part of buildings, etc.)
CAPTURE AND SURGICAL CASTRATION	Implies complicated and expensive interventions (sexage, surgery, etc.) and is not applicable to large numbers of animals
BIOLOGICAL WAR BY NATURAL ANTAGONISTS OF PIGEONS	The use of predatory birds is not efficacious in large urban areas and without the presence of falconer
SPECIFIC CONTRACEPTIVE VACCINATION	Still in experimental stage for use in large numbers of animals
KILLING OF PIGEONS WITH FIREARMS	Dangerous for the public safety - Negative replies from public opinion
KILLING OF PIGEONS BY POISONING	Dangerous for the public safety and environment- Negative reply from public opinion
PHARMACOLOGICAL CONTROL OF REPRODUCTION OF PIGEONS	Different results according to the used drug: busulfan, azacholesterol, progesterone and derived molecules, nicarbazine

## BIBLIOGRAPHY

- 1) **GAZZANO A., NICCOLINI A., SIGHIERI C., DELLA LONGA A., MARTELLI F., BOBOWIEC R., MENGOZZI G., DUCCI M.** (2002): Metodi di controllo delle popolazioni di colombo (*Columba livia*) in ambiente urbano - Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Pisa, LV, 185-194.
- 2) **HAAG-WACKERNAGEL D.** (2001): Die Strassen Taube - Tierschutz beider Basel, Basilea.
- 3) **JOHNSTON R.F., JANIGA M.** (1995): History and systematic biology - in: Feral pigeons, Oxford University Press, Oxford.
- 4) **A.A.V.V.** (2006): Linee guida per la gestione del colombo di città - Direzione Sanità Pubblica, Settore Sanità animale e igiene degli allevamenti della Regione Piemonte, Torino.
- 5) **BALDACCINI N. E.** (1989): Aspetti biologici in: Colombi in città: aspetti biologici, sanitari e giuridici, metodologie di controllo - **6**, 7-18, Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina, Bologna.
- 6) **SAVI M.** (1927): Ornitologia Toscana - Mistri, Pisa.
- 7) **LEVI W. M.** (1963): Breeds and Varieties in: The Pigeon - R.L. Bryan Company, Columbia, S.C.
- 8) **GHIGI A.** (1950): Piccioni domestici e columbicultura - R.E.D.A, Roma.
- 9) [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) - I UCN Red List of Threatened Species;
- 10) <http://birds.cornell.edu> - Cornell Lab of Ornithology;
- 11) **GIBBS D., BARNES E., COX J.** (2000): Pigeon and Doves: A Guide to the Pigeons and Doves of The World - United Kingdom Pica Press, London.
- 12) **COMUNE DI FIRENZE** (1997): Biologia e comportamento del colombo di città- in: Il colombo di città: biologia e contenimento, Edizioni Comune aperto, Firenze.
- 13) **SPEGNESI M., SERRA L.** (2003): Uccelli d'Italia - Quaderni di Conservazione della Natura, **16**, Istituto Nazionale Fauna Selvatica, Ozzano Emilia.
- 14) **BRACCHI P. G.** (2007): La pullulazione dei colombi in città: cause remote e contingenti Convegno "Sovraffollamento di popolazioni aviarie in città" Comune di Ravenna, 8 ottobre 2007.
- 15) **BREHM A.E.** (1929): La vita degli animali- III ed., UTET, Torino.
- 16) **DARWIN C.** (1859): The origin of species by mean of natural selection- Burt, New York.
- 17) **TOSCHI A.** (1939): Ricerche ed osservazioni sul colombo selvatico (*Columba livia* L.) - Ric. Zool. Appl. Caccia, **13**, 122.
- 18) **GOODWIN D.J.**, (1970): Pigeons and doves of the world - 2° ed., British Museum, London.
- 19) **BALDACCINI N.E.** (1986): Il colombo viaggiatore - Edagricole, Bologna.
- 20) **A.A.V.V.** (1950): Origine des oiseaux domestiques - In: Traité de zoologie, oiseaux, **XV**, Libraires de l'Académie de Médecine, Paris.
- 21) **LUMLEY W.F.** (1895): Fulton's book of pigeons - Lewis Wright-Cassel & Co, London.

- 22) **WHITMAN C.O.** (1919): Orthogenetic evolution of Pigeons - Carnegie, Washington.
- 23) **PONGHELLINI M.** (1996): Ricerche sui colombi catturati nella città di Parma: problemi sulla salute pubblica - Tesi, Scuola di Specializzazione in Tecnologia avicola e Patologia aviare, Università di Napoli.
- 24) **BALDACCINI N.E.** (1993): Inurbamento: processo attivo alla ricerca di spazi da colonizzare - In: Atti del Convegno "Il controllo delle popolazioni ornitiche sinantropiche (piccioni e storni): problemi e prospettive", Istituto Superiore di Sanità, Roma.
- 25) **MURTON R.K., THEARLE R.P.J., COOMBS C.F.B.** (1974): Ecological studies of the Feral Pigeon *Columba livia* var. domestica. III. Reproduction and plumage polymorphism - *J. Appl. Ecol.*, **11**, 841.
- 26) **ZANNETTI G.** (2003): Colombo di città: controllarne la riproduzione per tutelarne la salute - *La Settimana Veterinaria* 383, 20-21.
- 27) **SIMMS E.** (1979): The public life of the street pigeon- Hutchinson, London.
- 28) **BALDACCINI N.E.** (1985): Il Colombo di città è un'entità domestica o selvatica?- *Atti III Conv. Ital. Orn.*, 218, Pavia.
- 29) **BURSI E., FERRARESI M., GELATI A., ZANNETTI G.** (2001): Impiego della nicarbazina nel controllo della riproduzione del colombo randagio di città - *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Parma* **21**, 97-115.
- 30) **BALLARINI G.** (1985): Controllo delle popolazioni urbane di Colombi- *Atti III Conv. Ital. Orn.*, 211-215, Pavia.
- 31) **DE MARIA A.** (2007): Il rischio sanitario da presenza di popolazioni aviarie incontrollate in ambiente urbano - Convegno "Sovraffollamento di popolazioni aviarie in città", Ravenna, 8 ottobre 2007.
- 32) **FERRI M.** (2008): Infestazione umana causata da Acaro rosso *Dermanyssus gallinae*, collegata a colonie di colombi randagi - Convegno "Gestione delle popolazioni di colombi inurbati", Erba, 20 giugno 2007.
- 33) **GVAUDAN S.** (2007): Aggiornamenti di igiene urbana: considerazioni sull'eco-patologia delle malattie infettive, Convegno "Sovraffollamento di colombi: rischio sanitario, soluzioni, stato dell'arte", Pesaro, 9 ottobre 2007.
- 34) **ZANNETTI G.** (2008): Aspetti medico-legali e normativi del controllo farmacologico della riproduzione in popolazioni inurbate di colombi - Convegno "Gestione delle popolazioni di colombi inurbati", Erba, 20 giugno 2007.
- 35) **BALLARINI G.** (1989): Danni e rischi in: Colombi in città: aspetti biologici, sanitari e giuridici, metodologie di controllo - **6**, 25-34 Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina, Bologna.
- 36) **MAZZALI S.** (2007): Colombi randagi in città: problemi di nettezza urbana e tecniche di dissuasione - Convegno "Sovraffollamento di colombi: rischio sanitario, soluzioni, stato dell'arte", Pesaro, 9 novembre 2007.
- 37) **PEZZA F.** (1989): Aspetti giuridici in: Colombi in città: aspetti biologici, sanitari e giuridici, metodologie di controllo - **6**, 19-24 Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina, Bologna.
- 38) **FERRI M., FERRARESI M., GELATI A., ZANNETTI G., UBALDI A.**

- (2007): The use of Nicarbazine to control urban Pigeon colonies in Italy in 1990-2007 - Proc. 6 th International Conference on Fertility Control for Wildlife, York UK, 3-5 settembre 2007.
- 39) **FERRARESI M.** (2007): Chemiosterilizzazione con nicarbazina nel colombo urbano: considerazioni e prospettive – Convegno “Sovraffollamento di colombi: rischio sanitario, soluzioni, stato dell’arte” – Torino, 12 ottobre 2007.
- 40) **GELATI A.** (2008): Il controllo numerico delle popolazioni di colombi inurbati mediante trattamenti farmacologici con Nicarbazine, nell’ottica della tutela del welfare animale: risultati ottenuti 1990-2007 - Convegno “Gestione delle popolazioni di colombi inurbati- Erba, 20 giugno 2008.

## CONGENITAL HEART DEFECTS IN DOGS: A DOUBLE RETROSPECTIVE STUDY ON CASES FROM UNIVERSITY OF PARMA AND UNIVERSITY OF ZARAGOZA

Gregori T.<sup>1</sup>, Gomez Ochoa P.<sup>3</sup>, Quintavalla F.<sup>2</sup>, Mavropoulou A.<sup>2</sup>, Quintavalla C.<sup>2</sup>

### ABSTRACT

Congenital heart diseases are not rare pathologies in young dogs. This study describes the prevalence of congenital heart defects (CHDs) in dogs evaluated between 2004 and 2008 at the Cardiology Unit of the Veterinary Hospital of Parma (*VHP*) and the Veterinary Hospital of Zaragoza (*VHZ*). A total of 130 patients were included in the study. The most common CHDs were: aortic stenosis, subvalvular or valvular (45.2% at *VHP* vs 29.0% at *VHZ*), pulmonar stenosis (27.9% at *VHP* vs 21.4% at *VHZ*), and patent ductus arteriosus (9.6% at *VHP* vs 23.8% at *VHZ*).

### INTRODUCTION

Congenital heart defects (CHDs) are caused by abnormal cardiac embryonic development. The impact of heredity remains difficult to specify for most defects. In pediatric patients it is estimated that approximately one per cent of children born alive have a congenital heart defect (Taussig, 1982). Some Authors report a prevalence between 17% and 23.5% in dogs (Kittleson et al., 1998; Baumgartner et al., 2003) and 5% in cats (Kittleson et al., 1998): these percentages refer to those patients assisted at the cardiology units of the Authors' veterinary hospitals. The most common heart defects in dogs reported in veterinary literature are patent ductus arteriosus (PDA), aortic stenosis as subvalvular or valvular type (SAS or AS), pulmonic stenosis (PS), ventricular septal defect (VSD), mitral or tricuspid valve dysplasia (MVD, TVD) and finally, Fallot's tetralogy, a typical multidefect heart condition (Tidholm, 1997; Oyama et al., 2001; Mac Donald, 2006; Buchanan, 1992).

### MATERIALS AND METHODS

The purpose of this double-retrospective study was to observe the prevalence of congenital heart defects (CHDs) in two populations of heart-diseased patients, recently diagnosed (between 2004 and 2008) at Cardiology Unit of Veterinary Hospital of Parma (*VHP*) and Veterinary Hospital of Zaragoza (*VHZ*). A total of 130 patients were included in the study.

All patients' data about signalament (breed, age and sex), anamnesis, clinical signs at presentation, auscultation results and echocardiographic features in most

---

1 DVM "Scooby", Calle San Francisco 3 - Medina del Campo (Valladolid) - Espana

2 Ospedale Veterinario Didattico, Dipartimento di Salute Animale - Università degli Studi di Parma - Italy

3 Hospital Clinico Veterinario -Facultad de Veterinaria- Calle de Miguel Servet, Zaragoza Espana

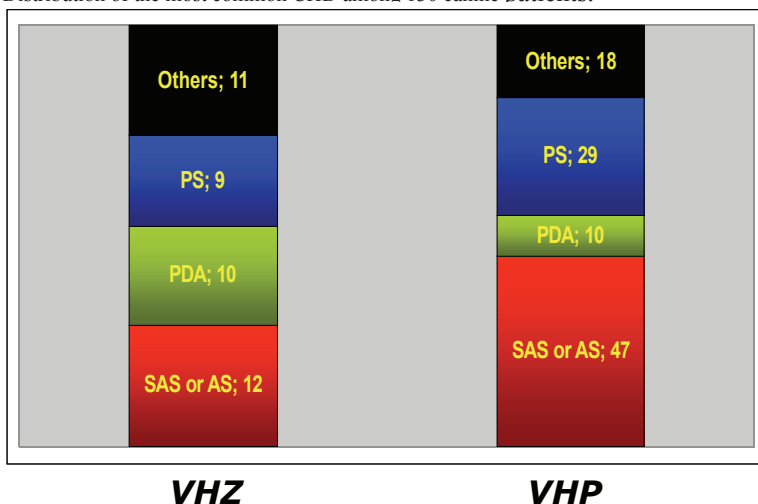
common CHDs have been considered retrospectively. All patients included in the study were evaluated by general clinical examination. Examination of the cardio-circulatory system through cardiac auscultation and echocardiographic exam was carried out. An ultrasonograph ATL HDI 5000® with a convex multifocal type ultrasonic transducer (frequency range: 5 - 7.5 MHz) at **VHZ** and a Megas CVX Esaote® equipped with 2,5-3,5 MHz and 5.0-7.5 MHz probes at **VHP** were used to perform echocardiographic exams. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat were used as reference (Thomas et al., 1993).

## RESULTS

A total of **92** cases and **104** congenital heart defects, considering isolated and associated forms, were diagnosed at **VHP** between 2004 and 2008. CHDs were thus distributed: **47** aortic stenosis, subvalvular or valvular (45,2%), **29** pulmonic stenosis (27,9%), **10** patent ductus arteriosus (9,6%), **5** mitral valve dysplasia (4,8%), **4** tricuspid valve dysplasia (3,8%), **3** ventricular septal defect (2,9%), **3** atrial septal defect (2,9%), **1** double-chambered right ventricle (1%), **1** persistent cranial vena cava (1%) and **1** false chordae tendinae (1%). Multiple cardiac defects were present in 10 patients (10,9%).

At **VHZ** **38** dogs, with **42** heart defects in total, were diagnosed as congenital cardiopathic patients in the same period. CHDs observed consisted in **12** aortic stenosis, subvalvular or valvular type (29%), **10** patent ductus arteriosus (23.8%), **9** pulmonar stenosis (21.4%), **4** interventricular septal defect (9.5%), **3** tetralogy of Fallot (7%), **2** tricuspid valve dysplasia (4.7%), **1** mitral valve dysplasia (2.3%) and **1** Ebstein's disease (2.3%). Patient presenting multiple cardiac defects were 10.5% of dog [**Table 1**].

**Table 1** Distribution of the most common CHD among 130 canine patients.





## 1- SIGNALMENT

### AGE

At the time of diagnosis, the median age of the patients was 12 months (range: 2-144 months) in both groups of dogs.

### BREEDS

Affected breeds for each CHD are listed in Table 2.

**Table 2**

Breeds and number of dogs affected by each CHD

CHD	VHZ Breed (number of cases)	VHP Breed (number of cases)
SAS	Boxer (1) Bull Terrier (1) Golden Retriever (1) Mongrel (1) German Shepard (1) Rottweiler (1) Belgian Shepard (1)	Boxer (16) Terranova (3) German Shepard (1) Corso (1) Schnauzer (1)
AS		Boxer (12) Kurzahar (1) Dalmatian (1) Suisse Shepard (1)
SAS + AS	Bull Terrier (1) German Shepard (1)	Boxer (1) Belgian Shepard (1)
PDA	Yorkshire Terrier (4) Basque Shepard (2) Mongrel (2) German Shepard (1) Maltese (1)	German Shepard (3) Mongrel (2) Poodle (1) Bichon Frisé (1) Maltese (1) Bernese Mountain Dog (1) Dobermann (1)
PS	Boxer (1) Yorkshire Terrier (2) French Bulldog (1) English Bulldog (1) Schnauzer (1) Maltese (1)	Boxer (10) English Bulldog (3) Mongrel (4) Bernese Mountain Dog (1) Golden Retriever (1) Rottweiler (1) American Staffordshire (1) Cocker (1) Terranova (1)
SAS + PS	Boxer (1)	Boxer (6)
VSD	Maltese (2) West Highland White Terrier (1) American Staffordshire (1)	Boxer (1) Beagle (1) Maltese (1)
ToF	West Highland White Terrier (1) Basque Shepard (1) Siberian Husky (1)	

TD	Setter (1) French Bulldog (1)	Poodle (1) Labrador (1) Bull Mastiff (1)
TD + PS	French Bulldog (1)	
Ebstein anomaly	Siberian Husky (1)	
MD	Bull Terrier (1)	Rottweiler (1) Bull Terrier (1) Corso (1) German Shepard (1)
DIA		Boxer (1) Chihuahua (1)
TD + MD+ DIA		Bulldog (1)
Persistent left cranial vena cava		Bichon Frisé (1)
Double-chambered right ventricle		Golden Retriever (1)
False chordae		Breton (1)
Legend: SAS=subaortic stenosis; AS=valvular aortic stenosis; PDA=patent ductus arteriosus; PS=pulmonic stenosis; TD=tricuspid dysplasia; MD=mitral dysplasia; DIA=interatrial defect; VSD=ventricular septal defect; ToF=tetralogy of Fallot.		

### SEX

CHDs were diagnosed in 57 males (62%) and 35 (38%) females at **VHP**, while at **VHZ** males were 24 (63%) and females 14 (37%).

## **2- HISTORY AND CLINICAL SIGNS**

Case history and clinical examination for all dogs included in this double-retrospective study are reported below.

At **VHP** 12 cases (13%) were reported to have episodes of syncope, 7 (8%) of exercise intolerance, and 5 (5%) of cough. At physical examination, ascitis and cachexia were present in 6 patients (6,5%) and dyspnea in 3 patients (3,3%). Two clinical cases were also described as having a certain degree of delay in muscle-skeletal development (2%).

At **VHZ** anamnesis revealed episodes of syncope in 14 (37%) dogs and exercise intolerance in 6 patients (15.8%). At clinical exploration ascitis and cachexia were observed in 2 dogs (5%) and dyspnea in 3 (7,8%).

However, the most part of dogs was asymptomatic at the time of diagnosis at both **VHP** and **VHZ** (65% and 63%, respectively).

## **3- CARDIAC AUSCULTATION**

Cardiac auscultation was performed on all dogs from both groups.

Ninthy (97.8%) and 34 dogs (89.5%) presented a heart murmur on cardiac

auscultation at **VHP** and **VHZ**, respectively.

Cardiac murmurs had, as expected, different localizations for best auscultation, depending on the congenital defect. It was thus possible to distinguish between cardiac base or apex related murmurs and left-sided or right-sided murmurs, allowing a presumptive diagnosis of the underlying congenital heart disease (Ware, 2006).

#### 4- ECHOCARDIOGRAPHIC FINDINGS

##### Aortic Stenosis (Valvular and Subvalvular types)

###### - Bidimensional Mode

A certain degree of leaflet thickening or partial fusion was evident in 17 aortic valvular stenosis cases at **VHP**. Pathologic alterations of the subvalvular type stenosis were detected in 30 cases at **VHP** and 7 cases at **VHZ** (i.e. discrete nodules, fibro-muscular wall thickening), causing partial obstruction of the left ventricular outflow tract. Left ventricular concentric hypertrophy (caused by pressure overload) was clear in 11 dogs at **VHP** and 6 at **VHZ**.

Post-stenotic dilatation of the first tract of ascending aorta was present in 9 **VHP** and in 8 **VHZ** cases.

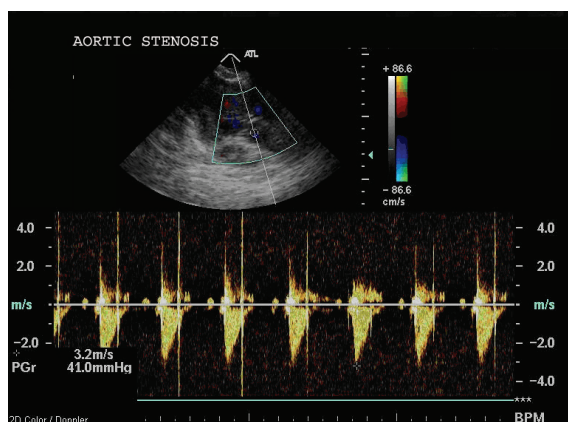
###### - Spectral and Color Doppler

14 **VHP** and 4 **VHZ** dogs were positive for the presence of aortic regurgitation on Color Doppler.

Continuous Doppler was used to evaluate flow speed through aortic stenosis (Koplitz et al., 2006) and the classification proposed by Bussadori et al. (2000) was used to define the degree of stenosis.

At **VHP**, 23 mild, 9 moderate and 13 severe stenosis were found, while in **VHZ** 2 mild, 5 moderate and 3 severe (Figure 1).

**Figure 1** - Typical example of Spectral Doppler Continuous graph, used in duplex mode. Blood flow speed through an aortic stenosis is measured.



### Pulmonic Stenosis

#### **- Bidimensional Mode**

At **VHP**, leaflet thickening or partial fusion was found in 25 pulmonic stenosis, classified as type A stenosis. *Pulmonic annulus* reduction, indicative of type B stenosis, was evident in 4 patients (Bussadori et al., 2001).

A characteristic concentric hypertrophic right ventricle, along with paradoxal septal movement, were evident in 11 **VHP** dogs and 6 **VHZ** dogs.

In both groups, a post-stenotic dilatation of the main pulmonary artery was present: 8 for **VHP**, 7 for **VHZ**.

#### **- Spectral and Color Doppler**

Color Doppler was used to observe pulmonic regurgitation: this finding was detected in 10 **VHP** patients and 2 **VHZ** patients.

Tricuspid regurgitation was evaluated in 3 dogs with Doppler (Boon, 1998). Continuous Doppler was useful to evaluate severity of pulmonic stenosis (Bussadori et al., 2000). In **VHP** we found 17 mild, 3 moderate and 9 severe stenosis while in **VHZ** there were 1 mild, 2 moderate and 6 severe.

### Persistent Ductus Arteriosus (PDA)

#### **- Bidimensional Mode**

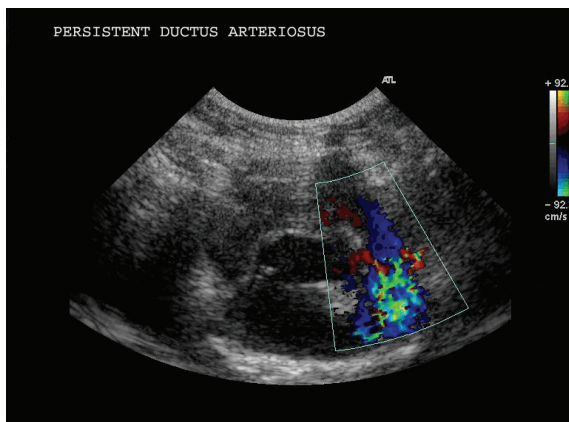
Bidimensional mode was used to evaluate left heart morphology and pathological alterations caused by volume overload. Excentric hypertrophy in the left atrium and ventricle were found in 10 **VHP** patients and 8 in **VHZ**.

#### **- Spectral and Color Doppler**

Flow turbulence in the main pulmonary artery was detected with Color Doppler in all dogs diagnosed with PDA (figure 2). In 5 cases at **VHP** mitral regurgitation flow was present.

Continuous Doppler measured transductal blood flow speed: at **VHP** 2 patients had PDA flow speed < 3,5 m/s (or < 49 mmHg), while at **VHZ** there were 3. This condition is considered indicative of developing pulmonary hypertension (Oyama et al. 2001), that can cause Eisenmenger's syndrome, a reversion of a left-right to a right-left shunt.

**Figure 2** – Color Doppler representing turbulent flow in the main pulmonary artery. This turbulence in main pulmonary artery is caused by blood flow proceeding from a persistent ductus arteriosus.



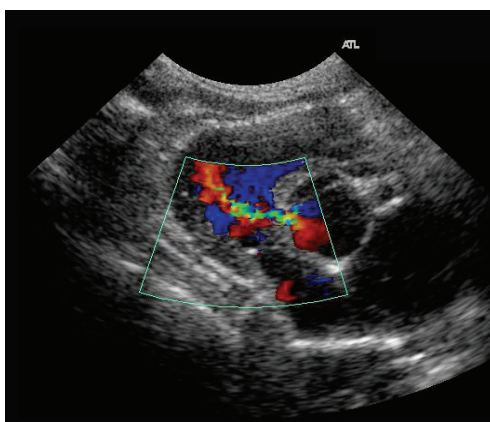
*Mitral Valve Dysplasia and Tricuspid Valve Dysplasia*

Mitral valve dysplasia was diagnosed in 5 dogs at **VHP** and 1 dog at **VHZ**. There were 4 cases of tricuspid valve dysplasia at **VHP** and 2 at **VHZ**.

All dogs diagnosed had anomalies of mitral or tricuspid valves such as leaflet thickening or movement restriction; incorrect implantation of chordae tendinae was noted on bidimensional mode examination.

Conformational and function anomalies caused regurgitations from ventricle to atrium in all cases. At **VHP** 3 cases of right atrium dilatation were detected and 1 of left atrium dilatation with tricuspid and mitral valve dysplasia respectively.

**Figure 3** – Color Doppler image representing turbulence through a ventricular septal defect



*Ventricular Septal Defect (VSD)*

This CHD was found in 3 patients at **VHP** and 4 at **VHZ**. Localization of septal defects was possible with Color Doppler and they were all perimembranous or membranous (figure 3). One concomitant aortic regurgitation was found (**VHP**). Left-to-right pressure gradients were calculated measuring blood flow speed through the septal defect: in one dog (**VHZ**) an Eisenmenger syndrome was suspected. Finally, echographic contrast (microbubbles) was intravenously infused and right-to-left shunt was confirmed: well-agitated saline solution (containing microbubbles) was infused in cephalic vein and then microbubbles passing in descending aorta were detected (Ferasin et al., 2007).

### Fallot's Tetralogy

Fallot's Tetralogy was diagnosed in 3 dogs at **VHZ**.

One typical bidimensional echocardiographic finding was the presence of partial pulmonic leaflet fusion, causing pulmonic stenosis and concentric right ventricular hypertrophy as a consequence of pressure overload. Other concomitant CHDs such as ventricular septal defect and overriding aorta were also found.

Color Doppler allowed direct visualisation of flow turbulence within the right ventricle. Continuous Doppler was used to measure speed flow through the main pulmonary artery and through the ventricular septal defect. All 3 patients had low speeds at VSD shunt and Eisenmenger's syndrome was suspected.

All 3 dogs were positive to echocardiographic contrast probe (microbubbles), 2 during diastolic cardiac phase and one during both diastole and systole.

## **DISCUSSION**

In both retrospective studies, the most common CHDs were aortic stenosis (subvalvular or valvular), pulmonic stenosis and patent ductus arteriosus.

Aortic stenosis showed the highest prevalence, as reported by other European retrospective studies (Tidholm, 1997; Baumgartner et al., 2003) and in contrast to American studies that show PDA as the most common CHD (Eyster et al., 1976; Patterson, 1978; Ackerman et al., 1978). However, PDA had a higher prevalence than pulmonic stenosis (at **VHZ**) and VSD (in both groups), in contrast to Tidholm (1997). Subvalvular aortic stenosis was the most frequent form at both **VHP** and **VHZ**, and type A PS (commissural fusion) was overrepresented at **VHP**. Ventricular septal defects were all perimembranous or membranous. The association most frequently observed was between subaortic stenosis and PS in boxer dogs.

Yorkshire Terrier and Maltese were the most commonly affected breeds at **VHZ** while Boxer and German Shepherd were overrepresented at **VHP**. These difference could only reflect a different distribution of canine breed populations in different Countries. However, since many congenital heart diseases are genetic in origin, the prevalence could vary with geography and the different genetic pool of canine populations. Aortic stenosis (subvalvular and/or valvular) was the most common CHD in the Boxer breed, as reported by others (Fuentes, 1993; Bussadori et al., 2001, 2008; MacDonald, 2006; Ware, 2006). At the **VHZ**, a high prevalence of PDA was

noted in Yorkshire Terriers, a breed that is typically predisposed to this pathology (Buchanan, 1992).

In both groups, dogs were diagnosed with congenital cardiomyopathy at a median age of 12 months (range 2-144 months) and male dogs were more frequently affected than females.

The early median age of disease identification could explain the high percentage of asymptomatic dogs at the time of diagnosis, except for the presence of a heart murmur documented at cardiac auscultation in approximately the 97.8% and 89.5% of patients at *VHP* and *VHZ*, respectively. Symptoms were reported at anamnesis and clinical examination only in about one third of dogs in both studies: episodes of syncope, exercise intolerance, cough, dyspnea, abdominal distension and cachexia were the most common clinical complaints. Clinical signs were documented in dogs with advanced disease. The percentage of symptomatic cases and the type of clinical signs were similar to other retrospective studies (Fingland et al., 1986; Tidholm, 1997).

Echocardiographic exam was necessary to make a definitive diagnosis: standard recommended techniques were followed (Thomas et al., 1993).

The two retrospective studies showed similar echocardiographic features among the same CHDs. Signs of pressure overload, such as papillar muscle hypertrophy, ventricular hypertrophy, and paradoxical motion of the interventricular septum (only for pulmonic stenosis) were typically found in cases of pulmonic stenosis, Fal-lot's Tetralogy and aortic stenosis. Post-stenotic dilation of the aorta in aortic stenosis was infrequent at *VHP*, especially because a large percentage of Boxer affected did not show this finding, even in severe disease.

Echocardiographic findings of volume overload (atrium and/or ventricle eccentric hypertrophy) were evident on the left side of the heart in the case of PDA, ventricular septal defect and mitral valve dysplasia, and on the right side in the case of tricuspid valve dysplasia.

Color and Spectral Doppler were very useful firstly to localize ventricular septal defect and PDA, secondly to evaluate the severity of congenital heart pathologies. The severity of aortic and pulmonic stenosis was defined measuring speed flow within left and right ventricular outflow tract, respectively (Bussadori et al., 2000). Spectral Doppler was necessary to verify any modification of normal pressure gradients in heart chambers (Boon, 1998; Oyama et al., 2001). Doppler velocities consistent with developing pulmonary hypertension were documented in the 20% and 30% of PDA cases at *VHP* and *VHZ*, respectively and in the 25% of VSD cases at *VHZ*. Contrast echocardiography was necessary to confirm Eisenmenger's syndrome (right to left shunt) in 3 patients at *VHZ*.

## CONCLUSIONS

Congenital heart diseases are not rare pathologies in puppies, with increased risk in some breeds. Accurate cardiac auscultation in the first months of their life, is therefore a good clinical practice. Clinical signs in congenital heart disease are not common and should not be considered as early pathology indicators by the clinician.

Echocardiographic exam is a useful instrument for a reliable diagnosis and should be performed every time a congenital heart disease is suspected.

## REFERENCES

- 1) Ackerman N, Burk R, Hahna W, Hayesh M. Patent ductus arteriosus in the dog: a retrospective study of radiographic, epidemiologic and clinical findings. *American Journal of Veterinary Research*, 1978; 39: 1805-1810
- 2) Baumgartner C, Glaus TM Congenital cardiac diseases in dogs: a retrospective analysis. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2003;145(11):527-33, 535-6.
- 3) Boon J A . *Manual of Veterinary Echocardiography*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 1998.
- 4) Buchanan JW. Causes and Prevalence of Cardiovascular Disease. In: *Current Veterinary Therapy XI*.WB Saunders, Philadelphia, 1992.
- 5) Bussadori, C., Amberger, C., Le Bobiniec, G., Lombard, C.W.Guidelines for the echocardiographic studies of suspected subaortic and pulmonic stenosis. *Journal of Veterinary Cardiology*,2000;2:17–24
- 6) Bussadori C, DeMadron E, Santilli RA, et al: Balloon valvuloplasty in 30 dogs with pulmonic stenosis: Effect of valve morphology and annular size on initial and 1-year outcome. *J Vet Intern Med* 15:553-558, 2001
- 7) Bussadori C, Pradelli D, Borgarelli M, Chiavegato D, D’Agnolo G, Menegazzo L, Migliorini F, Santilli R, Zani A, Quintavalla C. Congenital heart disease in boxer dogs: Results of 6years of breed screening. *Vet. J*. 2008 7
- 8) Bussadori C, Quintavalla C, Capelli A. Prevalence of congenital heart disease in boxers in Italy. *J Vet Cardiol* 2001;3:7-11.
- 9) Eyster GE, Eyster JT, Cords G B. & Johnston J. Patent ductus arteriosus in the dog: characteristics of occurrence and results of surgery in one hundred consecutive cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1976; 168: 435-4436
- 10) Ferasin L, Rizzo F, Darke P. Original investigation of right-to-left shunting patent ductus arteriosus in an Irish setter puppy, 2007;173:443-448
- 11) Fingland RB, Bonagura JD, Myer CW. Pulmonic stenosis in the dog: 29 cases (1975-1984). *J Am Vet Med Assoc*. 1986 15;189(2):218-26
- 12) Fuentes VL. Aortic stenosis in boxers. In: Raw TPME, editor. *The veterinary annual*. 33rd ed. London: Blackwell Scientific;1993:220-229.
- 13) Kittleson MD, Kienle RD. *Small animal cardiovascular medicine*. 16. Mosby - St. Louis.1998
- 14) Koplitz SL, Meurs KM, Bonagura JD. Echocardiographic assessment of the left ventricular outflow tract in the boxer. *J Vet Intern Med*, 2006;20:904–911
- 15) Mac Donald KA. Congenital Heart Diseases of Puppies and Kittens. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 2006 ; 36 : 503-531
- 16) Oyama MA. Sisson DD. Evaluation of Canine Congenital Heart Disease Using an EchocardiographicIgorithm. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 2001; 37: 519-535
- 17) Patterson, DF. Canine congenital heart disease: epidemiology and aetiological



- hypotheses. *Journal of Small Animal Practice*, 1978; 12: 263-287
- 18) Taussig HB. World survey of the common cardiac malformations: developmental error or genetic variant? *Am J Cardiol.* 1982;50(3):544-59.
  - 19) Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, et al. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 1993;7:247-52.
  - 20) Tidholm A. Retrospective Study of Congenital Heart Defects in 151 Dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 1997;38:94-98



## PRELIMINARY EVALUATION OF THE ENTEROTOXIGENICITY OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* STRAINS ISOLATED FROM HEALTHY SWINE

### VALUTAZIONE PRELIMINARE DELL'ENTEROTOSSINOGENICITÀ DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ISOLATI DA SUINI SANI

Zerbini Laura, Ossiprandi Maria Cristina

#### PAROLE CHIAVE:

*Clostridium difficile*, suini, tossine, duplex PCR

#### KEY WORDS:

*Clostridium difficile*, swine, toxins, duplex PCR

#### RIASSUNTO

*Clostridium difficile* è un patogeno enterico che coinvolge un'ampia varietà di mammiferi. Recentemente è stato riconosciuto come determinante di enteriti neonatali nel suino.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare mediante saggio molecolare (duplex PCR) il profilo enterotossigenico di 38 ceppi di *C. difficile*, isolati da 67 campioni di feci di suini sani pervenuti alla Facoltà di Veterinaria di Parma. Tutti i campioni di feci sono stati, inoltre, sottoposti a saggio immunoenzimatico (EIA) per verificare la produzione delle tossine A/B di *C. difficile*.

Tutti i 38 ceppi sono risultati negativi al saggio di duplex PCR per la ricerca di sequenze geniche codificanti per le tossine A e B (*tcdA*-/*tcdB*-). In nessun campione di feci è stata riscontrata mediante saggio EIA la presenza di tossine.

Ulteriori indagini, quali la ricerca delle sequenze geniche codificanti la tossina binaria CDT (*cdtA* e *cdtB*) e la determinazione del ribotipo mediante reazioni di amplificazione genica, dovranno essere eseguite sui ceppi isolati di *C. difficile* per poter valutare correttamente le implicazioni e il significato epidemiologico di questi ritrovamenti nei campioni di feci di suini sani.

## ABSTRACT

*Clostridium difficile* is an enteric pathogen affecting a variety of mammals, but it has only recently been diagnosed as a cause of infections in neonatal swine.

This study evaluated the molecular characteristics of 38 strains of *C. difficile* isolated from 67 healthy swine faeces at the Veterinary Faculty of Parma by using toxin gene profiling. Additionally, all faecal samples were tested for the presence of *C. difficile* toxins A/B by enzyme immunoassay (EIA).

The toxin genes, *tcdA* and *tcdB*, were absent in all 38 isolates when evaluated by duplex PCR. A negative EIA result (toxins A/B-negative) was reported in all 67 swine faecal samples. Further investigations (concerning, for example, the detection of binary toxin genes, *cdtA/cdtB*, and the determination of ribotype profile by PCR assays) should be applied on *C. difficile* isolates to assess properly the full implications and the epidemiological impact of these findings in faeces of healthy swine.

## INTRODUCTION

*Clostridium difficile*-associated disease (CDAD) is a major health problem among human hospital patients and a growing concern for the husbandry of many other mammals [3]. The aetiology agent is an anaerobic Gram-positive bacterium forming environmentally hardy spores.

Recently, *C. difficile* has been reported as agent of neonatal swine enteritis and represents a significant concern to the pork industry [3, 4]. Lesions in non-human mammals are similar to those in humans, but vary widely in severity and distribution within the gastrointestinal tract. This variation is evident for different species and different age groups within a species [2].

Pathology in swine includes moderate to severe mesocolonic edema, sometimes accompanied by hydrothorax and/or ascites, with scattered foci of suppuration in the colonic lamina propria and accumulation of neutrophils in the mesocolon. Exudation of neutrophils and fibrin into the lumen gives rise to so-called “volcano ulcers” [6]. Diarrhoea is variably present and some pigs with mild disease are apparently obstipated. Other clinical signs of disease include dyspnea, mild abdominal distension, and scrotal edema [2].

The pathophysiology of CDAD involves colonization of the intestinal tract with *C. difficile* and a production of specific toxins [5].

At least, three cytotoxins are currently described for *C. difficile*: toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB) (glucosyltransferases), and a binary toxin (CDT, adenosine diphosphate-ribosyltransferase) [5]. TcdA and TcdB are encoded by two separate genes, *tcdA* and *tcdB*, located in a 19.6-kb pathogenicity locus (PaLoc). The expression of these two genes is regulated by a putative negative regulator within PaLoc, the *tcdC* gene. Deletions in *tcdC* are believed to result in a overexpression of *tcdA* and *tcdB*, which may account for the apparent higher pathogenicity in certain ribotypes (i.e., PCR type 027 and 078) [6]. Some strains also produce binary toxin, which is encoded by the genes *cdtA* and *cdtB*, located outside PaLoc. The real role of binary toxin in the disease is currently under investigation [5].

Laboratory procedures that have been employed for *C. difficile* disease porcine diagnosis include: bacteriologic culture, cell culture cytotoxicity assays, latex agglutination tests for a clostridial surface antigen (GDH, Glutamate dehydrogenase), and enzyme immunoassays (EIAs) for *C. difficile* toxins detection, TcdA and TcdB, in stools or intestinal contents. However, detection of toxins in the faeces through demonstration of neutralizable cytotoxic effects with cultured cells has been regarded as the “gold standard” method. Although sensitive and specific, these assays are too cumbersome for routine use in clinical settings and have a long turnaround time (2-3 days). Culture and latex agglutination methods do not distinguish between toxigenic and non-toxigenic isolates. EIAs, on the contrary, are rapid, sensitive, commercially available, and relatively easy to perform and have added advantage of toxin detection [5].

The polymerase chain reaction (PCR) with primers specific for *tcdA* and *tcdB* gene sequences can be used to identify isolates carrying copies of these genes but cannot be used to determine whether toxin expression has occurred.

The objective of the current study was to investigate the molecular characteristics of various strains of *C. difficile* isolated from healthy swine located in two breeding farms of Parma's and Reggio Emilia's province through the use of toxin gene profiling.

## MATERIALS AND METHODS

**Samples.** A total of 67 faecal samples was collected from healthy swine, over a 3 month period (21<sup>st</sup> February - 16<sup>th</sup> May 2008). The swine came from two different breeding farms: the first one was located in Parma province while the second was located in Reggio Emilia province. The most were LV (Large White) x L (Landrace) with a variable percentage of Duroc genes: 25% for the breeding in Parma's area and 50% for the breeding in the area of Reggio Emilia. The age of the pigs coming from the first fattening farm (n= 44) ranged between 15 days and 5 months (mean, 69 days; median, 60 days); the age from the second breeding (n= 23) ranged between 23 days and 40 days (mean, 33 days, median 35 days).

All faecal specimens were naturally voided. Assays were performed on faeces collected within 2 hours, after which they were immediately stored at -20°C.

**Isolation and identification of *Clostridium difficile*.** Isolation of *C. difficile* was attempted on pre-reduced media, both selective cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA) and non-selective cooked meat broth (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Following faecal inoculation, the plates and broth were incubated anaerobically at 37°C for 48-72 hours. Subsequently, the broth samples were subjected to heat shock for spore selection, followed by subculture onto Schaedler agar (Oxoid, England) and/or CCFA to enhance spore germination and increase culture yield.

Preliminary identification of *C. difficile* was based on colony morphology, odor (horse manure), lack of aerotolerance and cellular morphology following Gram staining. Species identities were confirmed through the rapid latex slide agglutination test (*C. difficile*, Oxoid, England) and Rapid ID32A (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). All *C. difficile* isolates were streaked onto Muller Hinton agar (M.I., Oxoid,

England) and subsequently stored on cryopreservation beads (MAST Diagnostics, D.I.D, Diagnostic International Distribution S.p.A., Italy) at -70°C.

**Rapid immunoassay.** For rapid *in vivo* detection of TcdA/B in faecal samples, a commercial EIA was performed in microplate format according to manufacturer instructions (ProSpecT *Clostridium difficile* Toxin A/B, Remel, USA).

**Isolation of *C. difficile* DNA.** For each *C. difficile* strain, a 100- $\mu$ l suspension of cells in sterile water was vortexed, incubated at 100°C for 10 min. and centrifuged at 12,000 g (Microliter Centrifuge, Hermle Z 233 M-2, Delchimica Scientific Glassware s.r.l.) for 2 min. Five  $\mu$ l of this preparation were used as the DNA template for the PCR assay.

**Duplex PCR for *tcdA* and *tcdB* genes.** All *C. difficile* isolates were PCR-screened for the presence of *tcdA* and *tcdB* genes as previously described by Spigaglia and Mastrantonio [8]. Two distinct primer sets were used to detect *tcdA* and *tcdB*: primers TA1/TA2, which amplify a 624-bp *tcdA* fragment; and primers TB1/TB2, which amplify a 412-bp *tcdB* fragment. Duplex PCR was performed with a Techne TC-32 thermal cycler (Barloworld Scientific Ltd, UK). Amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis (120 V, 1 h) and visualized by ethidium bromide staining and ultraviolet light exposure.

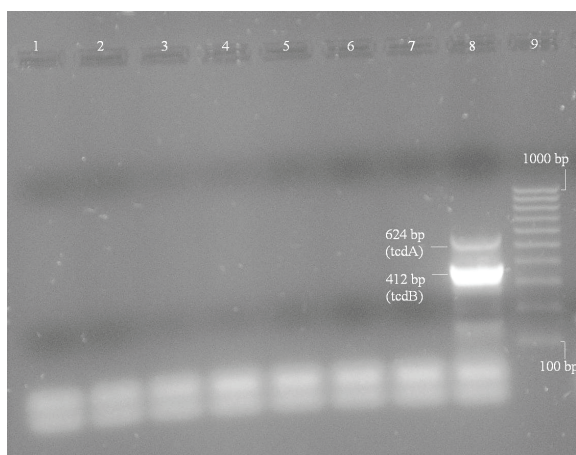
## RESULTS AND DISCUSSION

Thirty-eight faecal samples resulted positive for *C. difficile* presence (38/67 samples, 56.7%). In particular, 24 strains were isolated from the swine faeces coming from the first breeding (24/44, 54.5%) and 14 from the second breeding (14/23, 60.9%).

Four isolates of *C. difficile* were recovered from the faeces of swine 15 days old, 3 from the faeces of swine 23 days old, 6 from the faeces of swine 35 days old, 13 from the faeces of swine 40 days old, 6 from the faeces of swine 60 days old, and, at last, 6 from the faeces of swine 5 months old.

All 38 *C. difficile* strains were PCR-analyzed to determine whether they encoded genes for the TcdA and TcdB (*tcdA* and *tcdB*). Amplification products of the appropriate size for *tcdA* and/or *tcdB* were not observed for all isolates (Figure 1).

All 38 faecal samples, regardless of whether they provided a cultivable strain, were examined for the presence of TcdA/B by EIA. All samples resulted TcdA/TcdB-negative.



**Figure 1:** Lanes 1-6: *Clostridium difficile* isolates; lane 7: negative control (“0 DNA”); lane 8: *C. difficile* positive control, *tcdA*+/*tcdB*+; lane 9: molecular size markers (100 bp Molecular Ruler, Biorad, Italy).

In our study we found a higher isolation percentage of *C. difficile* non-toxicogenic strains than in other studies. In fact, Songer et al. (2007) reported that only about 6% of isolates from affected piglets were non-toxicogenic [7]. Certainly our results must be ascribed to the analysis of faecal samples of healthy swine, and not of symptomatic or submitted to antibiotic therapy swine.

Really, *C. difficile* readily colonizes the large intestines of neonates of most species mammals [3].

Therefore, we could conclude that, since this microorganism, in particular non-toxicogenic strains, can be found in healthy pigs, as commonly in the colon of clinically normal animals, its isolation may have little diagnostic relevance. However, we think that further investigations (concerning, for example, the detection of binary toxin genes, *cdtA/cdtB*, and the determination of ribotype profile by PCR assays) should be applied on *C. difficile* isolates to assess properly the full implications and the epidemiological meaning of these findings in faeces of healthy pigs. Moreover, it will be important analyze other breeding farms of swine, in particular symptomatic, to verify the eventual presence of toxicogenic strains, such as also the ribotype 078, toxinotype V, that has virulence characteristics similar to those of the type 027 [1], in consideration of the recent reports that suggest that *C. difficile* strains recognized as causes of human disease may contaminate retail meats [5].

## ACKNOWLEDGEMENTS

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

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la sig.ra Cinzia Reverberi ed il sig. Roberto Lurisi per l'assistenza tecnica prestata.

## REFERENCES

- 1) Goorhuis A., Bakker D., Corver J., et al. (2008) Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin. Infect. Dis., 47: 1162-1170.
- 2) Keel M.K., Songer J.G. (2006) The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. Vet. Pathol., 43: 225-240.
- 3) Keel M.K., Songer J.G. (2007) The distribution and density of *Clostridium difficile* toxin receptors on the intestinal mucosa of neonatal pigs. Vet. Pathol., 44: 814-822.
- 4) Post K.W., Jost B.H., Songer J.G. (2002) Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. J. Vet. Diagn. Invest., 14: 258-259.
- 5) Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., et al. (2006) *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. Emerg. Infect. Dis., 12: 1730-1736.
- 6) Songer J.G., Post K.W., Larson D.J., Jost B.H., Glock R.D. (2000) Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. Swine Health Prod., 8 (4): 185-189.
- 7) Songer J.G., Jones R., Anderson M.A., Barbara A.J., Post K.W., Trinh H.T. (2007) Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. Vet. Microbiol., 124: 358-361.
- 8) Spigaglia P., Mastrantonio P. (2002) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. J. Clin. Microbiol., 40: 3470-3475.



## SOURCES AND TRACKING OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN A COLD-SMOKED PROCESSING PLANT

Conter Mauro <sup>1</sup>, Di Ciccio Pierluigi <sup>2</sup>, Meloni Domenico <sup>3</sup>, Zanardi Emanuela <sup>1</sup>,  
Festino Anna Rita <sup>2</sup>, Ghidini Sergio <sup>1</sup>, Vergara Alberto <sup>2</sup>, Ianieri Adriana <sup>1</sup>

### KEY WORDS

*Listeria monocytogenes*; Smoked-salmon; PFGE;

### ABSTRACT

The compliance of RTE foods with the safety criteria for *L. monocytogenes* in a cold-smoked salmon processing facility, as laid down in the Commission Regulation 2073/2005, was evaluated. The origin of *L. monocytogenes* was evaluated in the plant by tracing the bacterium along the production line by using the PFGE. The pathogen was isolated from in the raw materials, but none of the batches of semi-processed product was found positive. On the contrary, the pathogen was isolated from all the tested batches in the final product. The number of fish samples positive for *L. monocytogenes* clearly increased at the end of the manufacturing stage. The results of the enumeration of *L. monocytogenes* in the final product (0 days of storage), at 30 days of storage and at the end of the shelf-life, show that, none of the finished products were contaminated by the bacterium. Moreover, samples obtained from the environment revealed that the processing line was contaminated with the bacterium. PFGE with *AscI* and *Apal* yielded respectively two and three restriction patterns. The same pulsotypes were isolated both from the fish and from the environment, suggesting that cross contamination occurred. An important factor in foodborne listeriosis is that the pathogen can grow to significant numbers at refrigeration temperatures when given sufficient time. The presence of *L. monocytogenes* in RTE foods is now regulated within the EU, which provides that *L. monocytogenes* should be legally below 100 cfu g<sup>-1</sup> during the shelf life of such products (Regulation 2073/2005). The findings from this study indicate that there is need of a good control in the manufacture and retail of pre-packaged cold-smoked salmon as not all the samples examined complied with the legal food safety criteria for *L. monocytogenes*. Moreover, strict attention must be paid to cleaning and disinfection to control the level of *L. monocytogenes* and to avoid in-plant colonization by this pathogen.

---

1 Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi di Parma  
2 Dipartimento di Scienze degli Alimenti. Università degli Studi di Teramo  
3 Dipartimento di Biologia animale. Università degli Studi di Sassari

## INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is of major concern for public health authorities and the food industry, as the cold-tolerant organism is known to cause human infections and has been associated with a large number of foodborne outbreaks of disease (Farber and Peterkin, 1991, Jacquet et al., 1995, Dalton et al., 1997 and Miettinen et al., 1999). Implicated foods include milk products, vegetables, salads and meat products. Even though their implication in human listeriosis is often only suspected, a variety of seafoods have also been found contaminated with *L. monocytogenes*, particularly cold-smoked salmon and ready-to-eat seafoods (Ben Embarek et al., 1994).

Distribution, colonization and adaptation to various environments by *L. monocytogenes* is promoted not only by its tolerance of a wide range of temperatures (including refrigeration) and pH but also by its ability to form biofilms (Di Bonaventura et al., 2008; Lunden et al., 2000; Blackman and Frank, 1996). Moreover, the microorganism can survive the cold-smoking process and the smoked products are often consumed without further heating. Furthermore these products are mainly vacuum-packed, which ensures a long shelf life and potentially enables *L. monocytogenes* to grow during storage (Guyer and Jemmi, 1991).

All these properties together with the severity of human listeriosis make *L. monocytogenes* of particular concern for manufacturers of ready-to-eat (RTE) food products. The European Commission (EC) Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH) concluded that the risk of listeriosis from foods containing less than 100 cfu g<sup>-1</sup> is low (European Commission (EC), 1999). As a result, the EC Regulation on microbiological criteria for foodstuffs (Regulation (EC) 2073/2005), in force from January 2006, provides that *L. monocytogenes* should be below 100 cfu g<sup>-1</sup> during the shelf life of RTE foods, and that processing areas and equipment used in the manufacture of RTE foods must also be monitored for *L. monocytogenes* (EC, 2005). However, for RTE foods intended for infants or special medical purposes, *L. monocytogenes* should not be present (absent in 25 g) throughout their shelf life (EC, 2005). Pre-packaged smoked-salmon have a high potential for contamination from *L. monocytogenes* especially due to cross contamination from the environment. The contamination of raw or processed food products by *L. monocytogenes* can have serious economic consequences for the food industry. In both in the EU and the USA, a rapid alert or refusal system is operating and *L. monocytogenes* has been the primary reason for rejection of chilled and frozen fish products. Contamination with the organism is of particular concern in cold-smoked fish because the heat applied during processing is not sufficient to inactivate the organism and the product is usually consumed without further cooking (Eklund et al., 1995).

For these reasons, prevention implies that the potential sources of contamination of smoked fish and the dissemination of *L. monocytogenes* in processing plants should be identified and traced. It may be impossible to control completely the presence of *L. monocytogenes* on the final product (Ben Embarek, 1994; Huss et al., 1995; Autio et al., 1999). However, as the contamination seems to take place during processing of salmon, it should be possible to reduce this contamination to a low

level by adherence to good manufacturing practices (Huss et al., 1995; Medrala et al., 2003).

To trace the transmission of *L. monocytogenes* in fish-processing environments, reliable typing systems should be employed. Classical typing based on phenotypic traits provides little information required for epidemiological and contamination studies and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) remains the current gold standard method for molecular subtyping of most foodborne bacteria, including *L. monocytogenes*.

The aims of this study were (i) to assess the compliance of RTE foods with the safety criteria for *L. monocytogenes* as laid down in the Commission Regulation 2073/2005 and (ii) to extend the knowledge about the origin of *Listeria monocytogenes* in a cold-smoked salmon processing facility by tracing the bacterium along the production line (PFGE).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Product manufacture and the processing plant**

The processing plant used ready-filleted salmon as raw material for production of cold-smoked salmon. Whole salmon were filleted, and all fillets were salted with dry salt, smoked (maximum temperature 25°C), skinned, sliced and vacuum-packed. All plants produced smoked herring as well. After each day's production, a cleanup crew carried out complete cleaning and sanitation procedures.

### **Sampling and microbiological analysis**

During this study, in a plant that processes smoked salmon located in Central Italy, 3 visits were undertaken in 2008.

In 2008 one batch of product was sampled during each visit to the plant. For each batch, samples from raw material, semiprocessed product (after salting and smoking) and final product (sliced and vacuum packed) were collected. Moreover, the finished products of the same batch was also analysed at 30 days after packing and at the end of the shelf-life (60 days). The sampling procedure applied in this study was as described in the Regulation EC 2073/2005 (EC, 2005). In the same period, during the visits, environmental samples from the processing line and surroundings were collected.

For fish products, samples were analysed according to the method by UNI EN ISO 11290-1. In particular, 25 g of the sample were used as pre-enrichment in Half-Fraser broth (Oxoid, Milan, Italy) and incubated at 30°C for 24-48 hours. A loopful from black Fraser broth was streaked onto ALOA medium (Biolife, Mila, Italy) and incubated at 37°C for 24-48 hours. Suspected colonies, surrounded by the typical halo, were seeded onto TSA (Tryptone Soya Agar) (Oxoid) and incubated at 37°C for 24 hours. Finally *Listeria* isolates were identified to the species level using the API-*Listeria* system (BioMérieux, Mercy-l'Etoile, France). Isolates of *Listeria innocua* and *L. monocytogenes* were used as controls. Environmental samples were collected by using the "sponge-bag" system, after re-hydrating the sponges with 10 ml of Buffered Peptone Water (BPW) (Oxoid). To these samples, 90 ml of BPW

were added and the samples were treated accordingly to the UNI EN ISO 11290-1, as described before.

### **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

A subset of 12 *Listeria monocytogenes* strains were characterized by DNA macrorestriction with *Apa* I and *Asc* I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). The separation of the restriction fragments was carried out by PFGE in a CHEF Mapper XA system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), using the Pulse-Net protocol (Graves and Swaminathan, 2001). A reference strain of *Listeria monocytogenes* (NCTC 10525) was used as positive control, while Lambda ladder PFG marker (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used for fragment size determination. Gel images were visualized and acquired using the Gel-Doc UV trans-illuminator (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The banding patterns for each enzyme were assigned by visual analysis of the restriction endonuclease digestion profiles.

### **RESULTS AND DISCUSSION**

*L. monocytogenes* was isolated from one batch in the raw materials. None of the batches of semi-processed product was positive for *L. monocytogenes*. On the contrary, the pathogen was isolated from all the tested batches in the final product. The number of fish samples positive for *L. monocytogenes* clearly increased at the end of the manufacturing stage. The results of the enumeration of *L. monocytogenes* in the final product (0 days of storage), at 30 days of storage and at the end of the shelf-life, were reported in table 1. It can be noted that, by using the enumeration protocol, *L. monocytogenes* was not found in any of the finished products, but by using the enrichment protocol, the bacterium was isolated in all the finished products.

Samples obtained from the production plant revealed that the processing line was contaminated with *L. monocytogenes*. Of the environmental samples it was isolated in 4 sampling points out of 24 points sampled (16.6%). The most contaminated sites were the table (stainless steel and polytetrafluorethylene) and the slicing machine.

PFGE with *Asc*I yielded two restriction patterns, and PFGE with *Apal* yielded three restriction patterns, for the isolated *L. monocytogenes* strains. By using *Asc*I, the pulsotype VIII and IX were isolated both from the fish and from the environment, whereas using *Apal* restriction enzyme, pulsotype VII and IX were associated with both the product and the environment, but in the last the pulsotype VIII was also isolated. Pulsotype VIII appeared sporadically in the environment and were not detected later in the finished product. These strains may be well adapted to the processing environment but may be bad competitors and not able to persist on the product (Dauphin et al., 2001). Despite the presence of *L. monocytogenes* in the processing environment of the smokehouses, this bacterium was never isolated from intermediate products. This indicates the probable antibacterial effect of the cold-smoking process (Gudmundsdóttir et al., 2005), but the presence of the pathogen in the final product and on the environment suggests that cross contamination occurred.

Conventional cleaning procedures did not eliminate *Listeria monocytogenes*

completely. Moreover, the incoming raw material were contaminated by the pathogen. Hence cross-contamination could easily occur throughout the plant and the pathogen can and persist in the environment following cleaning. This was demonstrated, as the same pulsotype was isolated from raw material, found on the table and on the slicing machine after cleaning, as well as on the final products. This highlights the need to readdress the design and cleaning of processing plants as well as staff behaviour and equipment in transit between production areas. Strict rules are needed to control *L. monocytogenes* contamination through the entire plant.

In their studies, Vogel et al. (2001) and Autio et al. (1999) indicate that the slicing and brining processes in cold-smoked salmon processing may provide reservoirs for some *L. monocytogenes*. According to Johansson et al. (1999) the most critical steps of the production line were salting and slicing, mainly because of difficulties with cleaning the equipment thoroughly. Several other studies have concluded that the plant equipment and the processing environment (in-house flora) rather than the raw material is the source of *L. monocytogenes* in product (Ojeniyi et al., 1996, Autio et al., 1999). However this does not exclude the possibility that the raw material may be an important, initial source for contaminating the processing equipment and environment (Vogel et al., 2001).

Although listeriosis is a relatively rare disease, the severity of the disease and the frequent involvement of manufactured foods, especially during outbreaks, means that the social and economic impact of listeriosis is among the highest of the foodborne diseases (Adak et al., 2002). An important factor in foodborne listeriosis is that the pathogen can grow to significant numbers at refrigeration temperatures when given sufficient time. The presence of *L. monocytogenes* in RTE foods is now regulated within the EU, which provides that *L. monocytogenes* should be legally below 100 cfu g<sup>-1</sup> during the shelf life of such products (Regulation (EC) No. 2073/2005). The aim therefore is to keep *L. monocytogenes* levels to a minimum and eliminate the organism wherever possible.

In conclusion, the findings from this study indicate that there is need of a good control in the manufacture and retail of pre-packaged cold-smoked salmon as not all the samples examined complied with the legal food safety criteria for *L. monocytogenes*. Moreover, strict attention must be paid to cleaning and disinfection to control the level of *L. monocytogenes* and to avoid in-plant colonization by this pathogen.

	Days of storage		
	0	30	60
Batch A	Neg	Neg	3.7 x 10 <sup>2</sup>
Batch B	Neg	1 x 10 <sup>2</sup>	8 x 10
Batch C	Neg	1 x 10 <sup>2</sup>	Neg

**Table 1:** Enumeration of *L. monocytogenes* in the final product, at 30 days of storage and at the end of the shelf-life.

## REFERENCES

- 1) Adak G.K., Long S.M. and O'Brien S.J. (2002). Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992–2000. *Gut* 51, 832–841.
- 2) Autio T., Hielm S., Miettinen M., Sjöberg A.M., Aarnisalo K., Björkroth J., Mattlila-Sandholm T. and Korkeala H. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 150–155.
- 3) Ben Embarek, P.K. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 23, 17–34.
- 4) Blackman, I.C. and Frank, J.F. (1996) Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection* 59, 827–831.
- 5) Dalton C.B., Austin C.C., Sobel J., Hayes P.S., Bibb W.F., Graves L.M., Swaminathan B., Proctor M.E. and Griffin P.M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine* 336, 100–105.
- 6) Dauphin G., Ragimbeau C. and Malle P. (2001). Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *International Journal of Food Microbiology* 64, 51–61.
- 7) 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.
- 8) Dillon R.M., Patel T.R. and Ratman S. (1994). Occurrence of *Listeria* in hot and cold-smoked seafood products. *International Journal of Food Microbiology* 22, 73–77.
- 9) Eklund M.W., Poysky F.T., Paranjpye R.N., Lashbrook L.C., Peterson M.E. and Pelroy G.A. (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *Journal of Food Protection* 58, 502–508.
- 10) Eklund M.W., Poysky F.T., Paranjpye R.N., Lashbrook L.C., Peterson M.E. and Pelroy G.A. (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *Journal of Food Protection* 58, 502–508.
- 11) European Commission (EC). (1999). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*, 23 September 1999. Available at: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out25\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf). Accessed on 27 November 2008.
- 12) European Commission (EC). (2005) Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of European Union* L 338, 1–26.

- 13) Farber J.M. and Peterkin P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55, 476–511.
- 14) Graves L.M. and Swaminathan B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*. 65, 55–62.
- 15) Gudmundsdóttir S., Gudbjörnsdóttir B., Lauzon H.L., Einarsson H., Kristinsson K.G. and Kristjánsson M. (2005). Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 101, 41–51.
- 16) Guyer S. and Jemmi T. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1523–1527.
- 17) Huss H.H., Ben Embarek P.K. and Jeppesen V.F. (1995). Control of biological hazards in cold smoked salmon production. *Food Control* 6, 335–340.
- 18) Jacquet C., Catimel B., Brosch R., Buchrieser C., Dehaumont P., Goulet V., Lepoutre A., Veit P. and Rocourt J. (1995). Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2242–2246.
- 19) Johansson T., Rantala L., Palmu L. and Honkanen-Buzalski T. (1999). Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant, *International Journal of Food Microbiology* 47, 111–119.
- 20) Lunden, J.M., Miettinen, M.K., Autio, T.J. and Korkeala, H.J. (2000) Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhance adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection* 63, 1204–1207.
- 21) Mesrala D., Dabrowski W., Czekajodzieja U., Dackowska-Kozon E., Koronkiewicza A., Augustynowicz E. and Manzano M. (2003). Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. *Food Microbiology* 20, 715–724.
- 22) Miettinen M., Björkroth J. and Korkeala H.. (1999). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 46, 187–192.
- 23) Ojeniyi B., Wegener H.C., Jensen N.E. and Bisgaard M. (1996). *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. *Journal of Applied Microbiology* 50, 395–401.
- 24) Vogel B.F., Jorgensen L.V., Ojeniyi B., Huss H.H. and Gram L. (2001). Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. *International Journal of Food Microbiology* 65, 83–92.





## **DETERMINAZIONE DELLA CURCUMINA NEL PLASMA DI SUINO MEDIANTE METODICA HPLC**

### **DETERMINATION OF CURCUMIN IN THE PLASMA OF SWINE BY HPLC METHOD**

Serventi P.<sup>1</sup>, Zullian C.<sup>1</sup>, Menozzi A.<sup>1</sup>, Amicabile A.<sup>1</sup>, Botti P.<sup>2</sup>, Martelli M.<sup>3</sup>, Bertini S.<sup>1</sup>

#### **PAROLE CHIAVE:**

Curcumina, suino, HPLC

#### **KEY WORDS:**

Curcumin, swine, HPLC

#### **ABSTRACT**

In literature there are few methods for determining curcumin in plasma. The purpose of this study was to determine the plasma concentration of curcumin in pig after intravenous infusion by HPLC method. The method we used differs from that described in the reference for the technology of extraction of curcumin from plasma and composition of the mixture of solvents used as mobile phase. In all samples collected at times up to 72 hours after the infusion, levels of curcumin were constantly low. Data obtained in this study seem to confirm, also in swine, a rapid fall of plasma concentration of curcumin due to its high distribution, biotransformation and/or excretion.

#### **RIASSUNTO**

La bibliografia che descrive la determinazione analitica nella curcumina nel plasma è, al momento attuale, limitata. Scopo del seguente studio è stato quello di determinare la concentrazione della curcumina nel plasma di suino, dopo somministrazione intravenosa, mediante metodica HPLC. I risultati sono stati ottenuti modificando sia la tecnica di estrazione della curcumina sia la composizione della miscela di solventi utilizzata come fase mobile. In tutti i campioni, prelevati in tempi successivi fino a 72 ore dopo l'infusione, i livelli di curcumina sono risultati costantemente bassi. I dati ottenuti nel presente studio sembrano quindi confermare, anche nella specie suina, una rapida caduta della concentrazione plasmatica della curcumina a causa di un'elevata distribuzione, biotrasformazione e/o escrezione.

---

1 Sezione di Endocrinologia e Farmacologia Veterinaria, Dip. Salute Animale, Università di Parma

2 Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria, Dip. Salute Animale, Università di Parma

3 Dip. Scienze Chimiche, Università di Padova.

Univ. degli Studi di Parma, Dip. di Salute Animale Sezione Endocrinologia e Farmacologia Veterinaria  
(Dott. Paolo Serventi e-mail: paolo.serventi@unipr.it tel.: ++39 0521-032800)

## INTRODUZIONE

La curcumina, composto polifenolico contenuto nel rizoma della pianta *Curcuma longa*, è ampiamente usata nell'industria alimentare come colorante naturale ed è il maggior componente del curry (1). Il consumo di curcumina sembra essere associato ad effetti benefici sulla salute umana (2), in quanto tale sostanza ha mostrato di possedere diverse attività farmacologiche tra le quali proprietà antiossidanti ed anti-infiammatorie (3). La curcumina è un 1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-ept-1,6-dien-3,5-dione (4). A temperatura ambiente si presenta come una polvere cristallina di colore giallo-arancione intenso, poco solubile in acqua, solubile in etanolo ed acido acetico con temperatura di fusione di 183°C (3). La curcumina esiste in equilibrio con il suo tautomero enolico. La formula dichetonica predomina nelle soluzioni acquose acide e neutre e nelle membrane cellulari (5). Nell'intervallo di pH compreso tra 3 e 7 la curcumina risulta un potente donatore di atomi di idrogeno (6), in quanto la forma chetonica contiene nel legame tra i due anelli di metossifenolo un atomo di carbonio altamente reattivo che permette la delocalizzazione degli elettroni spaiati sugli ossigeni adiacenti (3). A pH superiori a 8 predomina il tautomero enolico (6). Nell'analisi spettrofotometrica UV-visibile il massimo assorbimento si ottiene ad una lunghezza d'onda pari a 420 nm (3). In letteratura sono pochi i metodi disponibili per la determinazione della curcumina nel plasma. Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare la concentrazione plasmatica della curcumina nel suino dopo infusione endovenosa mediante metodica HPLC.

## MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 3 suinetti di sesso femminile, dell'età di due mesi, del peso di 23 kg circa. La curcumina è stata disciolta in un veicolo oleoso (Lypofundin S® 10%), ed iniettata alla dose di 25 mg/kg in un volume totale di 250 ml. L'infusione è stata effettuata attraverso la vena cefalica (tempo di infusione di 3 ore e 35 minuti) poichè in esperimenti preliminari la somministrazione nella vena giugulare, pur permettendo un tempo di infusione minore (30 minuti), causava una elevata mortalità degli animali nelle prime ore successive all'iniezione. I campioni di plasma sono stati prelevati prima dell'infusione (tempo 0), 3 minuti dopo la somministrazione e in tempi successivi fino a 72 ore, come indicato nella tabella 2. I campioni sono stati conservati in freezer alla temperatura di -18°C fino al momento della determinazione analitica. La tecnica utilizzata per la determinazione della concentrazione plasmatica della curcumina in HPLC è stata precedentemente descritta nel ratto da Health et al. (1). Il metodo da noi utilizzato differisce da quello descritto nella tecnica di estrazione della curcumina dal plasma e nella composizione della miscela di solventi utilizzata come fase mobile: si è intervenuti omettendo il riscaldamento del campione e riducendo la polarità della soluzione eluente.

### Reagenti e farmaci

Étile acetato (VWR), alcool metilico (Carlo Erba), acetonitrile (J. T. Baker), acido acetico (VWR), curcumina (Sigma), Lipofundin S® 10% (B. Braun).

### Preparazione campioni e standard

#### Tecnica di estrazione

In una eppendorf (2 ml) contenente 80 µl di acqua distillata sono stati aggiunti 200 µl di campione. Il campione è stato agitato mediante vortex per 20 secondi. Successivamente sono stati aggiunti 500 µl di soluzione estraente (95% di etil acetato e 5% di metanolo) e il campione è stato nuovamente agitato con vortex per 20 secondi e quindi centrifugato per 6 minuti a 10.000 rpm. È stata in seguito prelevata una prima aliquota di surnatante. L'estrazione è stata ripetuta mediante l'aggiunta di altri 500 µl di soluzione estraente ed una seconda aliquota è stata prelevata dopo agitazione e centrifugazione come descritto in precedenza. Le due aliquote sono state unite in una provetta e la soluzione ottenuta è stata portata a secco mediante flusso d'azoto. Il campione è stato quindi ripreso con 400 µl di fase mobile e centrifugato per 6 minuti a 10.000 rpm.

#### Standard

La soluzione madre (200 mg/kg) è stata ottenuta sciogliendo 20 mg di curcumina in 100 ml di metanolo. Le soluzioni utili per ottenere la retta di taratura (0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2 mg/kg) sono state ottenute diluendo progressivamente la soluzione madre in metanolo.

### Strumentazione HPLC e condizioni d'analisi

HPLC Varian ProStar

Rivelatori UV-visibile Varian 50 bio

Colonna Microsorb C 18 25 cm

Temperatura colonna: ambiente

Fase mobile: acetonitrile 47% , acqua 29%, alcool metilico 23%, acido acetico 1%

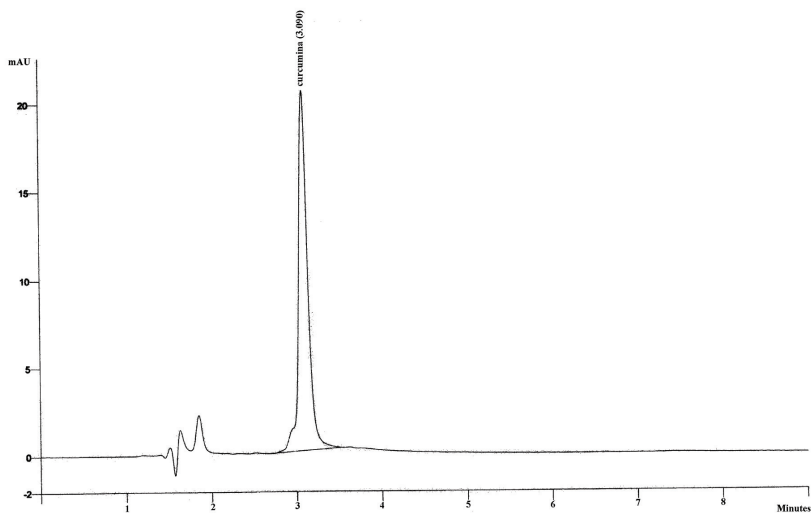
Flusso: 1 ml/min

Quantità iniettata: 20 µl

## **RISULTATI**

### Tempo di ritenzione curcumina

Osservando le condizioni d'analisi e la fase eluente sopra indicati, è stato determinato il tempo di ritenzione che risulta pari a 3,090 minuti, come si può evincere anche dalla figura 1.



**Figura 1** - Cromatogramma della curcumina standard 5 mg/kg

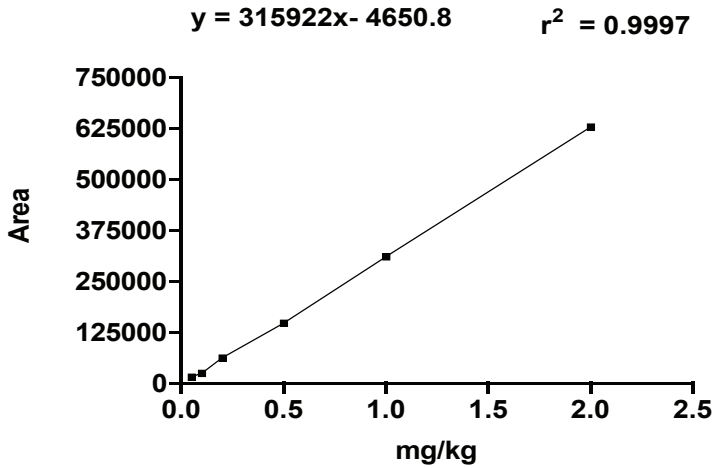
#### Retta di taratura

La retta di taratura è stata ottenuta utilizzando i dati riportati nella tabella 1, ottenuti con soluzioni standard di curcumina sino ad un valore di 2 mg/kg, ed è rappresentata in figura 2.

<b>MG/KG</b>	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2
<b>MEDIA AREA</b>	15201	24411	62157	147355	310581	628690
<b>S.D.</b>	739,50	833,55	790,73	2132,33	8098,48	19141,00
<b>CV %</b>	4,9	3,4	1,3	1,4	2,6	3,0

**Tabella 1** - Retta di taratura

L'espressione della retta ( $y = 315922x - 4650,8$ ) e il suo valore di  $r^2$  (0,9997), evidenziano la buona linearità espressa dal metodo analitico in esame.



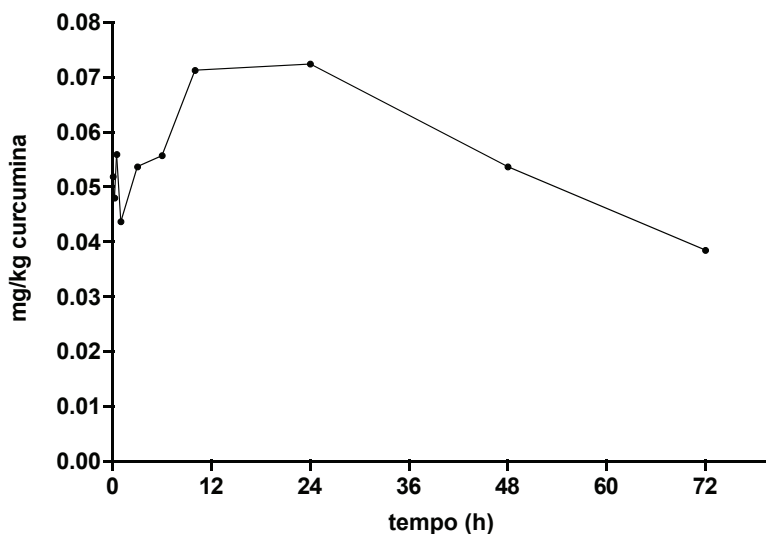
**Figura 2** - Retta di taratura

Determinazione della concentrazione plasmatica di curcumina

**Tabella 2** - Concentrazione plasmatica della curcumina in funzione del tempo

TEMPO	MG/KG
0.05 H	0,0518
0.25 H	0,0480
0.5 H	0,0559
1 H	0,0437
3 H	0,0537
6 H	0,0557
10 H	0,0713
24 H	0,0724
48 H	0,0537
72 H	0,0385

Le concentrazioni plasmatiche di curcumina rilevate sono risultate molto basse in rapporto alla dose somministrata e relativamente costanti nel tempo, con un picco raggiunto 24 ore dopo la somministrazione (tabella 2 e figura 3).



**Figura 3** - Grafico della concentrazione della curcumina in funzione del tempo

## DISCUSSIONE

Lavori precedenti nell'uomo e nel ratto hanno evidenziato che la curcumina somministrata per via orale presenta una biodisponibilità molto scarsa, dovuta a limitato assorbimento, elevato metabolismo e rapida escrezione renale e biliare (7,8). Studi precedenti hanno in effetti evidenziato che la somministrazione di una dose intravenosa di curcumina nel ratto è seguita dall'escrezione di più del 50% del farmaco con la bile entro 5 ore (9). Il presente studio è al momento il primo riguardante la farmacocinetica della curcumina nella specie suina; nello specifico è consistito nella messa a punto di un metodo di misurazione della concentrazione plasmatica della curcumina mediante HPLC, dopo iniezione endovenosa. Il metodo di estrazione, modificato rispetto a quello di riferimento (1), ha permesso di ottenere il 100% di recupero del farmaco (dati non mostrati), valore migliore rispetto a quello da noi ottenuto in esperimenti preliminari, seguendo la tecnica riportata da Health et al. Le concentrazioni plasmatiche rilevate sono risultate omogeneamente molto basse in tutti i campioni prelevati e con un andamento non tempo-dipendente. I motivi che possono giustificare tale andamento cinetico sono al momento solo ipotizzabili; è probabile che avvenga una rapida distribuzione della curcumina nei tessuti e/o una veloce metabolizzazione ed escrezione del farmaco. Sarà sicuramente importante, nei prossimi studi, quantificare la concentrazione di curcumina nell'urina e nella bile per stabilire l'entità e la velocità dell'escrezione e procedere alla misurazione delle concentrazioni plasmatiche dei principali metaboliti noti della sostanza. Un problema è sicuramente

rappresentato dalla scarsa idrosolubilità della curcumina che ha reso necessario usare un veicolo lipidico (Lipofundin S® 10%) ed un volume totale di infusione elevato (250 ml). Gli esperimenti preliminari effettuati utilizzando la vena giugulare hanno permesso di completare la somministrazione in 30 minuti ma il soggetto è deceduto dopo poco più di un'ora dalla fine dell'infusione. Poiché la causa della morte è stata ipotizzata essere la troppo rapida iniezione in una vena centrale di un grande volume di veicolo lipidico, siamo stati costretti a proseguire gli esperimenti utilizzando una vena periferica (la cefalica) ed un tempo di infusione più elevato (3 ore e 35 minuti). Data l'alta velocità di metabolizzazione nota per la curcumina in altre specie (4), non si può escludere che le basse concentrazioni rilevate in questo studio siano almeno in parte dovute al lungo periodo necessario per completare la somministrazione. Nonostante ciò, le concentrazioni di curcumina rilevate nei campioni prelevati dopo iniezione nella vena giugulare nel corso della prima ora (risultati non mostrati), si sono rivelati significativamente diverse da quelle ottenute utilizzando la vena cefalica solo a 3 minuti dalla fine dell'infusione (0,105 vs 0,052 mg/kg). Risulta comunque cruciale la disponibilità di un veicolo di tipo differente che possa garantire una iniezione più rapida; tale aspetto sarà oggetto di successivi esperimenti.

## CONCLUSIONI

Il metodo sviluppato in questo studio ha permesso di determinare la concentrazione della curcumina nel plasma di suino dopo iniezione intravenosa, dopo perfezionamento del metodo analitico in HPLC. I dati ottenuti sembrano confermare una rapida caduta della concentrazione plasmatica della curcumina dovuta a veloce distribuzione, biotrasformazione o escrezione anche nella specie suina e la difficoltà della valutazione farmacocinetica di tale sostanza per le sue peculiari caratteristiche farmacologiche e fisico-chimiche.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Heath D.D, Pruitt M.A., Brenner D.E., Rock C.L. (2003) Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 783: 287-295
- 2) Ireson C., Orr S., Jones D.J.L., Verschoyle R., Lim C., Luo J., Howells L., Plummer S., Jukes R., Williams M., Steward W.P., Gescher A. (2001) Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Research*, 61: 1058-1064
- 3) Sharma R.A., Gescher A.J., Steward W.P. (2005) Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, 41: 1955-1968
- 4) Sharma R.A., Steward W.P., and Gescher A.J (2007) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology*, 595: 453-470
- 5) Wang Y.J., Pan M.H., Cheng A.L., Lin L.I., Ho Y.S., Hsieh C.Y, Lin J.K (1997)

- Stability of curcumin in buffer solution and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15: 1867-1876
- 6) Jovanovic S.V., Steenken S., Boone C.W., Simic M.G. (1999) H-atom transfer is preferred antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of the American Chemical Society*, 121: 9677-9681
  - 7) Anand P., Kunnumakkara A.B., Newnan R.A. and Aggarwal B.B. (2007) Bio-availability of curcumin: problems and promises, *Molecular Pharmaceutics*, 4: 807-818
  - 8) Ravindranath V. and Chandrasekhara N. (1981) Metabolism of curcumin: Studies with (3H) curcumin. *Toxicology*, 22: 337-344
  - 9) Pan M. H., Huang T. M., and Lin J. K. (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucoronidation in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 27: 486-494



## ITALIAN HONEY AUTHENTICATION

Ghidini S.<sup>1</sup>, Mercanti C.<sup>3</sup>, Dalcanale E.<sup>2</sup>, Pinalli R.<sup>2</sup>, Bracchi P. G.<sup>1</sup>

### KEY WORDS

Honey, authentication, origin.

### ABSTRACT

15 samples of honey have been examined (Table 2): 14 from two Lombard provinces (4 from Brescia and 10 from Sondrio) and a sample purchased in China. Sensory, chemical and melissopalynological analysis were performed in order to characterize the samples. For the same purpose the samples were also analysed by means of an electronic nose. pH, humidity, potassium, calcium, manganese and selenium were the most effective parameters for honey characterisation.

The electronic nose proved to be a promising technique in this field of research since it allowed to discriminate the Chinese sample from the Italian ones and the chestnut honey from the others.

### INTRODUCTION

Honey production is quite low in Italy and the national production does not satisfy the honey requirements of the confectionery industry, therefore our country has to import large amounts of the product from third countries. As a matter of fact the annual honey production in Italy was estimated 11100 t in 2007 and it is constantly decreasing (Osservatorio Miele, 2008) while the global Italian need of honey is of about 26000 t (MIPAAF, 2007). Imported honey comes both from EU and non EU countries. Though still not mandatory EU Directive 110 of 2001 stresses the importance of indicating the geographical origin and the floral type of honey on labels. There is therefore a strong need of methods able to discriminate the origin and nature of honey both to protect and to increase in value the national product.

In literature many methods useful for honey authentication are described (Anklam, 1998; Serrano et al., 2004). One traditional but slow method for floral honeys is melissopalynological analysis, which involves identifying and counting the pollen grains. There are also a host of physicochemical methods such as pH, electrical conductivity and sugar analysis, as well as characterisation of the volatile organic compounds. Another technique used both to detect origin and possible adulterations of honey is stable isotopes determination (Anklam, 1998; Padovan et al., 2003).

---

1 Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi di Parma.

2 Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Parma.

3 Veterinary surgeon.

Likewise all food matrixes also for honey the most useful tool for authentication and characterisation is the combination of different analytical techniques (Martinez et al., Kelly et al., 2005).

## MATERIAL AND METHODS

Fifteen samples of honey have been collected: 14 were from two provinces placed in Lombardia (4 from Brescia and 10 from Sondrio) and a sample purchased in China. Chemical and melissopalynological analysis were performed adopting the official methods listed in Decree of the Agriculture Ministry of July 25th 2003. Aliquots (0.5g) of the samples were mineralised by means of acid digestion assisted by microwave oven and then analysed for elements concentration by means of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (Jobin Yvon Ultima 2)

The samples were also analyzed using an artificial olfactory system equipped with 12 MOS sensors (MOS-AOS system), to obtain an aroma characteristic fingerprint of the substance. An ISE Nose 2000 electronic nose equipped with a 16 position semiautomatic sampling unit, was used for the analyses.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of the analytical determinations are reported in table 1.

Sample	Origin	Essence	Water %	Aw	pH	Free Acidity	Lactones	Total acidity
1	Sondrio	Locust	17,0	0,542	3,99	11,4	3,0	14,4
2	Sondrio	Locust	16,9	0,544	4,01	10,7	1,5	12,2
3	Sondrio	Locust	15,8	0,517	3,82	17,0	2,0	19,0
4	Sondrio	Rhododendron	16,5	0,556	3,83	10,5	2,0	12,5
5	Sondrio	Rhododendron	16,0	0,530	3,97	16,0	3,0	19,0
6	Sondrio	Rhododendron	17,5	0,544	3,89	13,5	3,0	16,5
7	Sondrio	Multifloral	16,5	0,533	4,86	15,5	2,5	18,0
8	Sondrio	Multifloral	16,0	0,536	5,52	9,0	2,5	11,5
9	Sondrio	Rhododendron	17,0	0,568	4,10	13,5	2,0	15,5
10	Sondrio	Chestnut	18,0	0,582	5,56	11,0	2,0	13,0
11	Brescia	Locust	15,8	0,527	3,94	10,0	1,5	11,5
12	Brescia	Locust	18,1	0,553	3,99	8,5	2,5	11,0
13	Brescia	Locust	16,2	0,516	4,05	12,4	2,0	14,4
14	Brescia	Locust	17,2	0,547	4,25	9,5	2,0	11,5
15	Cina	Rape	>26,0	0,687	3,80	11,5	2,5	14,0
<b>Mean Italian samples</b>			16,8	0,543	4,27	12,0	2,3	14,3
<b>Mean Sondrio province</b>			16,7	0,545	4,36	12,8	2,4	15,2

<b>Mean Brescia province</b>	16,8	0,536	4,06	10,1	2,0	12,1
<b>Maximum</b>	15,8	0,516	3,82	8,5	1,5	11,0
<b>Minimum</b>	18,1	0,582	5,56	17,0	3,0	19,0

**Table 1:** results of the analytical determinations.

As can be seen from table 1 the values of moisture percentage of Italian honey are between 15,8 and 18,1%, with a national average of 16.8% which has to be considered very good. On the contrary, the Chinese honey has a moisture content exceeding 26% (over the scale of the measuring instrument).

The Aw values observed for the Italian honey are among 0,516 and 0,582 with a national average of 0,543. The value of Chinese honey is 0,687, very high in accordance with the percentage of moisture. These values of water content and activity suggest a high probability of fermentation for the Chinese honey.

Chestnut honey had the highest pH which is characteristic of this unifloral honey; two samples showed fairly high values (4.86 and 5.52) justified by the presence of chestnut nectar confirmed by melissopalynological analysis. The Chinese sample has a very low pH of 3.80 probably due to fermentation. Honey samples are good with respect to the free acidity, with a national average of 12.0 mEq/kg. The maximum value of 17.0 mEq / kg is well below the legal limit of 50 mEq/kg.

The results of the elemental determinations are reported in table 2.

Potassium is the most abundant element present in honey. It is in greater concentration in chestnut honey (3422 mg/kg compared to the national average of 818 mg/kg) and two multifloral, which had a supply of nectar chestnut. Chestnut honey along with that of honeydew is among the richest in minerals, it also stands out for concentrations of calcium, magnesium, sulphur and manganese. The iron concentration of Chinese honey was about 20 times the average concentration of Italian honeys. This is not a natural phenomenon and is most likely due to contact with non-eligible containers during processing in the country of origin.

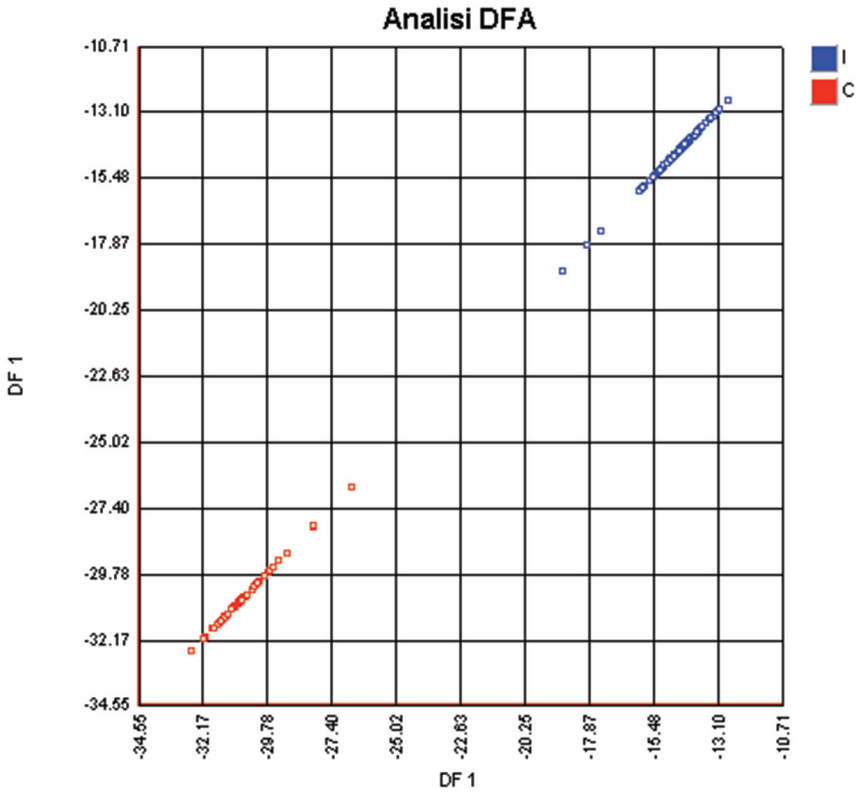
## ARTIFICIAL OLFACTORY SYSTEM ANALYSIS

As shown by figure 1 and figure 1a the artificial olfactory system was able to 100% differentiate the only Chinese sample from Italian ones.

With regard to the differentiation of the geographical origin of honey samples analyzed, it therefore appears that the odoriferous component of honey coming from Italy is completely different from that of honey from China. Within Italy, honey from Brescia is not satisfactorily distinguishable from the honey from Sondrio. With regard to botanic essence, only chestnut honey showed an odoriferous profile different from rhododendron honey while locust and multifloral honey are very similar to one another. From the analysis carried out sample 14 from Brescia (locust), appears very different from all other samples.

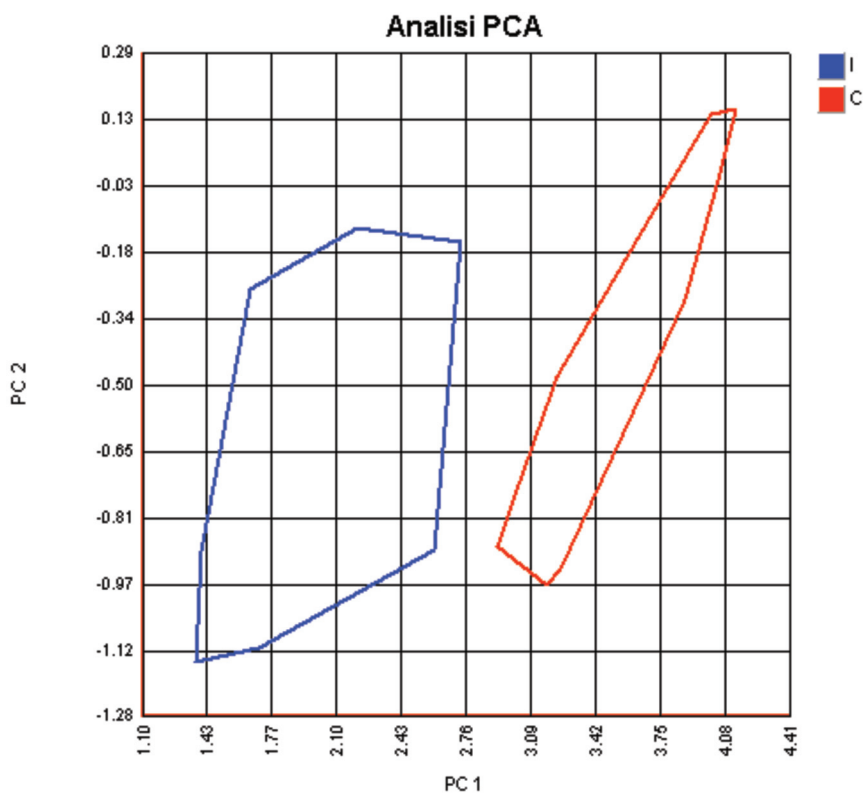
Sample	K	Na	Ca	Mg	S	Al	Sr	Zn	V	Li	Mn	Ba	Fe	Tl	Sb	Cu	Se
1	258	86,9	27,1	3,64	11,7	3,33	1,71	2,64	0,23	0,99	0,22	0,39	0,56	0,85	0,76	0,42	0,62
2	160	52,0	16,7	3,01	7,44	1,67	1,81	1,12	0,29	1,07	0,18	0,37	0,34	0,70	0,69	0,38	0,80
3	234	148	15,1	3,60	7,57	2,20	1,77	0,74	1,51	1,02	0,06	0,49	0,51	0,62	0,74	0,40	0,69
4	212	16,1	10,7	3,03	8,08	0,03	1,78	0,57	0,00	1,01	0,08	0,22	0,00	0,53	0,49	0,33	0,01
5	433	64,4	22,4	8,72	10,2	2,57	1,93	1,02	1,60	1,09	0,40	0,00	0,08	0,00	0,13	0,35	0,27
6	300	11,9	12,4	3,58	6,92	4,86	1,89	0,76	1,37	1,04	0,20	2,16	0,50	0,37	0,12	0,35	0,12
7	2140	81,7	94,5	31,1	25,6	2,78	2,15	1,45	0,50	1,04	3,31	0,28	0,99	0,27	0,16	0,58	0,15
8	2890	24,5	89,7	31,9	20,8	3,65	2,07	1,09	1,13	1,07	3,03	0,36	1,60	0,42	0,20	0,49	0,21
9	500	20,7	26,6	9,47	8,93	1,30	1,87	1,18	1,03	1,07	0,35	0,04	0,52	0,12	0,36	0,37	0,42
10	3420	28,2	95,0	58,7	29,2	4,48	2,08	0,90	1,41	1,02	3,23	1,93	1,15	0,42	0,49	0,49	0,00
11	192	62,8	9,43	2,62	2,75	1,95	1,77	0,83	1,72	1,02	0,39	0,05	0,10	0,33	0,30	0,30	0,38
12	138	6,37	17,7	4,67	0,00	2,89	1,82	0,81	1,89	1,02	0,43	1,62	0,33	0,33	0,48	0,37	0,15
13	300	77,1	20,9	7,87	3,44	3,85	1,78	0,70	1,28	1,04	0,15	0,16	0,48	0,70	0,58	0,31	0,32
14	286	14,7	14,1	7,05	2,47	0,00	1,83	1,02	0,88	1,06	0,00	0,11	0,54	0,33	0,37	0,30	0,02
15	43,2	144	58,4	35,2	63,8	3,13	1,97	1,46	1,47	1,06	0,11	0,20	11,8	0,26	0,00	0,29	0,04
Mean Italy	818	49,7	33,7	12,7	10,3	2,54	1,87	1,06	1,06	1,04	0,86	0,58	0,55	0,43	0,42	0,39	0,30
Mean Sondrio	1054	53,5	41,0	15,6	13,6	2,69	1,91	1,15	0,91	1,04	1,11	0,62	0,63	0,43	0,41	0,42	0,33
Mean Brescia	229	40,2	15,5	5,55	2,17	2,17	1,80	0,84	1,44	1,03	0,24	0,49	0,36	0,42	0,43	0,32	0,22
Max.	3420	148	95,0	58,7	63,8	4,86	2,15	2,64	1,89	1,09	3,31	2,16	11,8	0,85	0,76	0,58	0,80
Min.	43,2	6,37	9,43	2,62	0,00	0,00	1,71	0,57	0,00	0,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00

Table 2: results of the elemental determinations expressed as mg/kg.



Tasso di riconoscimento complessivo: 100.0%

**Figure 1:** DFA discrimination between 2 classes. Date set (samples): 149 analysis. Variables: 12 sensors, 2 features (Min, FFTmod; way percent), 2 classes from discrimination. Ratio samples / variables = 3.10



Tasso di riconoscimento complessivo: 100.0%

**Figure 1a:** PCA: discrimination between 2 classes. Date set (samples): 149 analysis.

## CONCLUSIONS

The results show that it is very difficult to differentiate and fully authenticate honey samples only by using conventional chemical analysis. The use of new, cheap, fast and non destructive techniques just like the artificial olfactory system is promising but it has to be validated on data sets larger than the one of this study.

## LITERATURE

- 1) Anklam E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chemistry. 63, No. 4, 549-562.
- 2) Anonymous (2007) Documento programmatico per il settore apistico del MI-PAAF con l'Intesa Stato Regioni del 11 gennaio 2007. Available at [http://www.mieliditalia.it/download/20070110\\_dm\\_sag.pdf](http://www.mieliditalia.it/download/20070110_dm_sag.pdf).
- 3) Anonymous (2008) Annual report of the "Osservatorio Nazionale della Produzi-

- one e del Mercato del Miele” available at <http://www.osservatoriomiele.org>.
- 4) Eu Directive 110/2001 Official Journal of the European Community, L 10/52 of 12/01/2002.
  - 5) Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J. (2005) Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology*. 16, 555–567.
  - 6) Gazzetta Ufficiale n. 185 del 11-8-2003.
  - 7) Martinez I., Aursand M., Erikson A., Singstad T.E., Veliyulin E., van der Zwaag C. (2003) Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*. 14, 489–498.
  - 8) Padovan G.J., De Jong D., Rodrigues L.P., Marchini J.S. (2003) Detection of adulteration of commercial honey samples by the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratio. *Food Chemistry*. 82, 633–636.
  - 9) Serrano S, Villarejo M., Espejo R., Jodral M. (2004) Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. *Food Chemistry*. 87, 619–625.





## **FISH ODOUR TRIMETHYLAMINE MIGHT BE A GOOD CANDIDATE FOR TESTING GENDER DEPENDENCE IN HUMAN OLFACTION**

### **L'ODORE DI PESCE TRIMETILAMMINA POTREBBE ESSERE UN BUON CANDIDATO PER DIMOSTRARE LA DIPENDENZA DAL SESSO DELLA CAPACITA' OLFATTIVA NELL'UOMO**

BIGNETTI<sup>1</sup> Enrico, AIELLO<sup>2</sup> Gaetano L., SINESIO<sup>3</sup> Fiorella and CANNELLA<sup>4</sup> Carlo

#### **KEYWORDS.**

Olfaction, gender, trimethylamine, trimethylaminuria, fish consumption.

#### **PAROLE CHIAVE.**

Olfatto, sesso, trimetilammina, trimetilamminuria, consumi di pesce.

#### **ABSTRACT.**

One major question was whether odors are perceived by women and men in the same way or not. A strong evidence in the literature described a wide variation of olfactory sensitivity in women during menses. Several explanations were given to account for the variation, none of them convincing. Within the cycle, the greatest attention was posed only on the olfactory sensitivity increase during the follicular phase as an efficient odor-based mating strategy. Up to us, the attention should be posed also towards the mechanism of worsening of the sensitivity during bleeding days. In this cycle phase, malodorous discharges through body fluids, e.g. trimethylaminuria, are maximal. Thus, olfactory threshold regulation across the cycle might represent either a physiological mechanism to search sexual partner and a defensive mechanism to avoid a possible self-refusal. Testosterone and estradiol might be primarily responsible for this complex regulation. The fluctuation of olfactory thresholds might influence also alimentary habits especially towards Fish consumption.

---

1 Prof. of Clinical Biochemistry and Molecular Biology at the Faculty of Vet. Med. of Parma. Address: Lab. "Food Neurochemistry", Dept. of Physics, University of Parma, Via G.P. Usberti 7a, 43100 Parma, Italy (email: [enrico.bignetti@unipr.it](mailto:enrico.bignetti@unipr.it))

This work was done in conjunction with INRAN to start up a preliminary study on fish consumption in Italy.

2 Dept. of Physics & Related Technologies (DIFTER), University of Palermo, Viale delle Scienze, Ed. #18, 90128 Palermo, Italy

3 "National Research Institute for Food and Nutrition" (INRAN), Viale Ardeatina 546, 00178 Roma, Italy.

4 Prof. at Sapienza University and President of "National Research Institute for Food and Nutrition" (INRAN), Viale Ardeatina 546, 00178 Roma, Italy.

Our hypothesis might be tested by carrying out psychophysical tests that use the fish odour trimethylamine as odor model.

## RIASSUNTO

Un lavoro recente sembra indicare che la capacità olfattiva delle donne durante il ciclo vari sorprendentemente di alcuni ordini di grandezza, dalla fase follicolare (massima) alla mestruale (minima). Durante la fase mestruale, pare anche che le donne vadano soggette alla perdita di trimetilamina (l'odore sgradevole di pesce), attraverso i liquidi corporei ed in particolare attraverso le urine. Dunque, questo lavoro propone l'ipotesi che la fluttuazione dell'olfatto nel ciclo sia un meccanismo fisiologico per una migliore strategia di ricerca sessuale, da un lato, e di auto-difesa dal disgusto su base olfattiva del proprio corpo, dall'altro. Testosterone ed estradiolo potrebbero essere coinvolti in questo complesso meccanismo fisiologico. Un test che utilizzi la Trimetilammina come odore modello, potrebbe dare una risposta definitiva all'ipotesi di meccanismo proposta. Con questo si potrebbero aprire nuove linee di ricerca sia sulle strategie di accoppiamento nell'uomo e sul confronto delle attitudini alimentari tra uomo e donna.

## INTRODUCTION

Volatile chemical signals play a crucial role in human behaviour associated with social interaction, communication and feeding. As a matter of fact, humans can discriminate a thousand of odorants within an extraordinary vast landscape of synthetic and natural odorants [1].

One major question was whether odors are perceived by women and men in the same way or not [2-6]. The question as it might provide an answer, once for all, to the question whether women and men do have equal chances to achieve social and professional goals. Knowing whether men and women exhibit the same aversion against, or preference for seafood based on their olfactory discriminants might provide precious hints about the alimentary habits of a family, and/or push a subject towards a professional career as a chef.

The sensory modalities by which fish is perceived by people, beside producing a specific attitude towards a diet, might reveal several psychological constructs, such as beliefs, interest, motivation, even social norms, knowledge and other behaviours. All this might have a relevance to social sciences and food marketing.

As an example, Olsen [7] shows there is a positive relationship between age and frequency of seafood consumption. This, and other examples, pointed our attention to the need to explore how fish smell is perceived by humans of both sexes, at any stage of their life. Below, we will critically review the state of the art of gender-dependence in human olfaction, on one side, and some TMA features, on the other. Then, a series of tests will be proposed which might reveal hidden aspects of this particular sensory modality.

## **Gender-dependence in olfaction**

The question whether human olfactory threshold could depend on sex and age was addressed by several authors. Two volatile C-19-steroids, which are considered putative pheromones in humans, were found [8-9] to contribute to mood, memory and autonomic system responses in a gender-specific manner. A sex-specific difference in olfactory sensitivity for these two molecules was demonstrated also in primates. A clear-cut example of sex-specific bimodal olfactory sensitivity was demonstrated in spider monkeys, with male responding to one molecule only and female to the other [6]. However, these molecules carry a well-defined physiological information targeted mainly to sex behaviour, with scarce relevance to the mechanism of odorant perception and recognition.

By studying specific anosmia to “primary odorants”, Amoore came to the conclusion that there was a logarithmic deterioration in olfactory perception with age, which was unaffected by sex [2]. The results of the experiments on olfaction, however, are always open to debate. One reason is the intrinsic complexity of the olfactory system, and the lack of standardization of the methods. An emblematic case is reported by Öberg et al. [10]. By using a large sample of women and men, these authors investigated gender-related differences in several tasks aimed to study: absolute sensitivity, intensity discrimination, quality discrimination, episodic recognition memory, and identification. Although a better performance was registered by female subjects on episodic odor memory capability towards familiar odors, no sex related differences in sensory acuity were observed.

Collectively, by looking at these experiments, one can always find significant drawbacks in the methodologies and protocols used, like large hormonal dishomogeneity within subjects in the same sample, which might cause large intraspecific error. If the sample is made of women, one should consider also the menstrual cycle as a crucial physiological parameter. Circadian hormonal oscillations (corresponding to: menstrual, follicular, ovulatory and luteal or progestagenic phases) are known to profoundly alter her normal lifestyle. In other words, a different way of perceiving odors during the cycle may affect some abitudinal choices.

Up to us, the examples reported in the literature until now exhibited a large uncertainty in data collection and interpretation. This might stand on two main reasons: either the data collection was rather scarce from a statistical point of view or a bias prompted by an erroneous model prevision was causing a vitious data interpretation.

In a recent paper, some authors [5] faced olfaction gender-dependence at least in a statistically-convincing manner. They monitored olfactory thresholds towards the banana-like odor (amyl-acetate) in different groups of subjects. It was evident that the threshold varied significantly across the menstrual cycle. In particular, women exhibited the lowest olfactory thresholds during the ovulatory phase, and the highest during the bleeding days.

Several explanations were tentatively given by the authors to account for a variation of the threshold with the phase of the menstrual cycle. None of them, however, was convincing. As a conclusion, the effect of the cycle on the olfactory threshold is either a by-product of other parallel physiological events, or it hides an

important biological event whose teleological meaning is still unclear.

This second hypothesis seems us much more appealing. Thus, we argue the finalities why olfactory sensitivity for the banana-like odor is low during the menstrual phase, with median threshold running about 30 times higher than in the ovulatory phase, and about 10-time lower than in control men. The reason might lie deep inside those very mechanisms that specifically differentiate women from men.

### **Trimethylamine: an odor that might unveil the question of olfactory sensitivity changes in cycling women**

Methylamine, Dimethylamine and Trimethylamine are derivatives of ammonia with a typical rotten fish odor at lower concentration and of ammonia-like odor at higher concentrations. Human studies conducted to assess odor perception of these compounds demonstrated that all three are considered maleodorant, and can be perceived dissolved in water at rather high dilutions, TMA being the one with a threshold 3-4 orders of magnitude lower than the others [11]. A significant amount of human subjects exhibited a pronounced anosmia to the low-molecular-weight tertiary amines (a specific TMA anosmia was monitored in about 7% of them) and in a lesser degree to primary and secondary amines [12].

The above substances are present in the decomposition of plants and animals as microbial degradation of animal byproducts. As far as fish is concerned, TMA derives from enzymatic reduction of the non-volatile precursor Trimethylamine Oxide (TMAO), carried out by bacteria on the skin [13]. Among the cultures isolated from spoiling fish, *Shewanella putrefaciens* were identified as the major agent responsible of TMA and off-odour production [14]. Bacterial spoilage and associated malodor production in fish can cause a natural avoidance behaviour of the consumers. Thus, controlling these processes was of primarily importance for industrial fish meal plants. On one end, new packaging methods and new additives were proposed in mitigation strategies, successful even at long distances from the industrial plants (Chaen et al., "<http://www.freepatentsonline.com/6576281.html>"). On the other end, the research tried to further improve the ways of detecting fish odors instrumentally, with detection thresholds down to human nose. To this aim, a TMA gas sensor was developed and utilized to detect fish freshness [15]. More recently, specific chemical analyses of malodorous compounds downwind of a fish meal were carried out by means of gas chromatography in tandem with mass spectrometry, and the results compared with human panelist data [16].

TMA can be found not only on spoiling fish but also in gastric juices, in the saliva and in blood of humans and other mammals. It can be considered as a normal constituent of mammalian wastes like feces, urines and exhaled air. The amount normally excreted can be partially influenced by the diet, especially when it contains fish [17].

More rarely, the excretion may become abnormal depending on specific pathological conditions. Striking examples are the cases of "Bacterial Vaginosis" (BV) (see for a review: [18]) and of "Primary Trimethylaminuria" (also known as "Fish-odor-syndrome") [19].

Actually, menstruations in women can be an additional factor causing tran-

sient trimethylaminuria in self-reported subjects suffering from malodor, and even in healthy women harboring functionally active monooxygenase. Infact, beside the autosomal recessive defect producing a totally inactive FMO3, there is also a polymorphic landscape of mild mutations of FMO3 gene causing variable degrees of trimethylaminuria during menses. The evidence of trimethylaminuria during bleeding days in women was discovered since long ago [20], but the enzymatic mechanism that regulate odor discharge was explained only recently by Shimitzu et al. [21].

### **The conclusive model and the experimental proposal**

In conclusion, more or less all cycling women can undergo a peak of malodorous trimethylaminuria coinciding with bleeding days, due to a specific FMO3 deficiency in those days. By observing the dynamics of olfaction and FMO3 in cycling women, it looked as if these systems were undergoing a common regulatory fate, i.e. as though both systems were under control of the same hormones regulating menses. Thus, lowering the olfaction during bleeding days might reflect a self-defensive mechanism. Conversely, the extraordinary olfaction switched on at the ovulatory phase, might be used as a contrivance to refine one of the most sophisticated tool for mating search. By this, we do not exclusively or necessarily refer to a “simple” interplay of pheromones but also to other refined strategies based on smell, e.g. the use of an agreeable perfume, the choice of the partner with the best smell or the avoidance of other competing women in the proximity etc..

Moreover, the positive FMO3 induction observed in pregnant women might be easily explained as an adapting reponse of mother’s liver against the need of a surplus of detoxifying work required by the son.

In conclusion, there might be a hidden functional cross-correlation between cycling phases, liver detoxification and olfactory threshold variation. These physiological processes, although apparently far from each other since pertaining to very different anatomical districts, might actually work under the control of a same hormonal system.

Now, the question relevant to us is whether we can support these assertions with experimental evidences. On the basis of the above evidences, it should be feasible to use TMA odor as a probe to reveal whether our model is correct. Up to now, to challenge the effect of menses on female olfaction it was used amyl-acetate, a strongly attractive odor. In our opinion, if these results were confirmed also with TMA, one of the most aversive odor excreted with body fluids during menstruations, then a further step could be done towards the understanding of cyclic behaviour of olfaction in women.

The protocol used by Navarrete-Palacios et al. [5] looks the most appropriate, mainly because of the large groups engaged in the tests, the odor used, the sniff-bottle technique, and the procedure of ascending concentrations. Thus, we could adopt the above protocol almost entirely, except for the replacement of the pleasant amyl-acetate with the unpleasant TMA.

As mentioned above the mean values of amylacetate olfactory thresholds in cycling women fluctuate by several orders of magnitude accross the steady value which was instead observed in men. Therefore, the experiments with TMA as a mo-

del odour instead of amylacetate, should again be carried out with men as reference subjects. These results should possibly lead to extrapolate interesting correlations with fish consumption and in particular with the frequency of it, either in women and in men. We are aware that such a project will necessary need a multidisciplinary approach

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Prof P. Pelosi of the University of Pisa, Italy, for helpful discussion.

## BIBLIOGRAPHY

- 1) Bignetti E., Cavaggioni A. and Tirindelli R. (1990) The chemistry of chemoreception in vertebrate sensory system. In: "sensory transduction" Borsellino et al. Eds, Plenum Press. N.Y., pp 67-97.
- 2) Venstrom D. & Amoore J. E. (1968) Olfactory threshold in relation to age, sex or smoking. *J. Food Sci.*, 33, 264-265.
- 3) Koelega H. & Koster E. P. (1976) Some experiments on sex difference in odor perception. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 237, 234-246.
- 4) Doty R. L., Shaman P., Michael D. (1984) Development of the university of Pennsylvania smell identification test: a standardized microencapsulated test of olfactory function. *Physiology & Behavior*, 32, 489-502.
- 5) Navarrete-Palacios N., Hudson R., Reyes-Guerrero G. & Guevara-Guzman R. (2003a) Lower olfactory threshold during the ovulatory phase of the menstrual cycle. *Biological Psychology*, 63, 269-279.
- 6) Laska M., Wieser A. Salazar L. T. H. (2006) Sex-specific differences in olfactory sensitivity for putative human pheromones in nonhuman primates. *J. Comp. Physiol.*, 120, 106-112.
- 7) Olsen S. O. (2003) Understanding the relationship between age and seafood consumption: the mediating role of attitude, health involvement and convenience. *Food Quality and Preferences*, 14, 199-209.
- 8) Bensafi M., Brown W. M., Tsutsui T., Mainland J. D., Johnson B. N., Bremner E. A., Young N., Mauss I., Ray B., Gross J., Richards J., Stappen I., Levenson B. & Sobel N. (2003) Sex-steroid derived compounds induce sex-specific effects on autonomic nervous system function in humans. *Behavioural Neuroscience*, 117, 1125-1134.
- 9) Bensafi M., Brown W. M., Khan R., Levenson B. & Sobel N. (2004) Sniffing human sex-steroid compounds modulates mood, memory and autonomic nervous system function in specific behavioral contexts. *Behavioral Brain Research*, 152, 11-22.
- 10) Öberg C., Larsson M. and Bäckman L. (2002) Differential sex effects in olfactory functioning: the role of verbal processing. *JINS*, 8, 691-698.
- 11) Hampton J. M. (2007) C1-C4 Mono, Di-, and Trialkylamines. *Spacecraft Water Exposure Guidelines for Selected Contaminants*. Board on Environmental

- Studies and Toxicology (BEST). Vol. 2, 96-153.
- 12) Amore J. E. and Forrester L. J. (1975) Specific anosmia to trimethylamine: the fishy primary odor. *J. Chem. Ecology*, 2, 49-56.
  - 13) Shewan J. M., Hobbs G. and Hodgkiss W. (1960) The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish, *J. Appl. Microbiol.*, 23, 463-468.
  - 14) Jorgensen B. R. & Huss H. H. (1989) Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 9, 51-62.
  - 15) Ohashi E., Takao Y., Fujita T., Shimizu Y. & Egashi M. (1991) Semiconductive Trimethylamine Gas Sensor for Detecting Fish Freshness. *J. Food Sci.*, 56, 1275-1278.
  - 16) Caraway E. A., Parker D., Ruby M., Green G., Spears J., Olsen M., Rhoades M. & Buser Z. (2007) Identification of malodorous compounds from a fish meal plants. Intl. Symposium on air quality and waste management for agriculture. 16-19 September 2007. Bromfield, Colorado 701P0907cd. American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE).
  - 17) Tver D. F. and Russell P., *Nutrition and Health Encyclopedia*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1981:100.
  - 18) Spiegel C. A. (1991) Bacterial Vaginosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 485-502.
  - 19) Humbert J. R., Hammond K. B., Hathaway W. E., Marcoux J. G. & O'Brien D. (1970) Trimethylaminuria: the fish-odor syndrome. *Lancet*, ii:770-771.
  - 20) Klaus K. (1927) Beitrag Zur Biochemie der Menstruation, *Biochem. Z.*, 185, 3-10.
  - 21) Shimizu M., Cashman J. R. & Yamazaki H. (2007) Transient trimethylaminuria related to menstruation. *BMC Medical Genetics*, 8, 2-4.





## IDENTIFICATION OF FOOD PATHOGENS WITH INTEGRATED USE OF TRADITIONAL AND BIOMOLECULAR METHODS

### IDENTIFICAZIONE DI PATOGENI ALIMENTARI MEDIANTE L'IMPIEGO INTEGRATO DI METODICHE TRADIZIONALI E BIOMOLECOLARI: PRIMI RISULTATI

Paris Arianna <sup>\*1</sup>, Bacci Cristina <sup>1</sup>, Salmi Federica <sup>1</sup>, Riboldi Elisa <sup>1</sup>, Bonardi Silvia <sup>1</sup>, Brindani Franco <sup>1</sup>

#### PAROLE CHIAVE:

Reazione a catena della polimerase, limite di rilevabilità, metodo integrato, patogeni alimentari.

#### KEY WORDS:

Polymerase Chain Reaction (PCR), detection limit, integrated method, foodborne pathogens.

#### RIASSUNTO

Con la presente indagine è stata confrontata la sensibilità della Polymerase Chain Reaction (PCR) con quella della metodica tradizionale (conteggio su piastra) per la determinazione di *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Campylobacter jejuni*. Al fine di ottenere dati attendibili le prove sono state ripetute tre volte per ogni stipite. Partendo da una brodocoltura di concentrazione  $10^6$  ufc/ml, il conteggio su piastra ha mostrato, per tutti i patogeni considerati, una sensibilità di  $1 \times 10^0$  ufc/ml; la tecnica PCR ha invece rilevato la presenza delle specie considerate fino alla diluizione  $10^{-2}$  della stessa brodocoltura. Successivamente è stato determinato il tempo di incubazione necessario per ottenere un esito positivo con PCR, anche per la prima diluizione risultata negativa nella fase di sensibilità, rilevando una positività già con tempi di contatto di 3 ore.

#### SUMMARY

This study compared the sensitivity of Polymerase Chain Reaction (PCR) with the traditional method (plate count) to determine *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* and *Campylobacter jejuni*. In order to obtain reliable results, tests were repeated three times for each strain. Starting from a broth culture with  $10^6$  cfu/ml

---

1 Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

\* Corresponding author, Dott. Arianna Paris, Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma, Via del Taglio, n. 10, 43100 Parma, Tel.:0039-0521-032740. E-mail address: arianna.paris@unipr.it

concentration, the plate count showed, a  $1 \times 10^0$  cfu/ml sensitivity of for all the considered pathogens; instead, the PCR technique detected the presence of the considered species up to a dilution of  $10^{-2}$  of the same broth culture.

Subsequently, the incubation time was calculated necessary for obtaining a positive result with PCR, even for the first dilution which was negative in the sensitivity phase, detecting a positive result already with contact times of 3 hours.

## INTRODUCTION

The diffusion of food pathogens, such as *Salmonella enterica* and thermophilic campylobacter, represent a real worldwide health emergency.

Setting up techniques used to identify these microorganisms in foodstuffs, with a high sensitivity and maximum speed, is therefore indispensable, including for the purposes of fast reconstruction of the epidemiological chain (9).

The traditional methods, as is known, require a pre-enrichment phase, and varying length of time based on the etiological agent, for identification and serotyping. In addition, phenotype techniques are often difficult and studios, above all if there is a high number of samples and the pathogen is difficult to cultivate (2, 3).

Thus, the search for a fast identification method requires studying the potential of alternative methods, such as genomic methods. For this purpose molecular biology has been used with increasing interest and consensus for foodstuff microbic assay. In particular, the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique has received much focus, due to its specificity, sensitivity and fast response characteristics, even if method standardisation problems still exist at present. In fact, the presence of false negatives and/or positives, and possible inhibition of amplification reaction, in the presence of residue from food matrices or competitive microflora, do not always make it possible to use on a routine basis (1, 7).

In light of the above, this work proposes to compare, in an initial research phase, the sensitivity of the PCR technique with that of the traditional method (counting plate colonies) related to the determination of *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *C. jejuni*.

Subsequently, the time necessary for obtaining positives results of the resulting broth culture was determined in the sensitivity phase, negative to the biomolecular technique.

The data supplied by the plate count were compared with those obtained by integrating the two methods, thus making it possible to assess the advantages offering by the combination of phenotype and genotype techniques.

## MATERIALS AND METHODS

Integrated protocol for the identification of *C. jejuni*

From a broth culture of the pathogen, composed of Bolton Broth (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) with the addition of Laked Horse Blood (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) decimal dilutions ( $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ) were set up and then subject to spectrophotometric (UV/VIS Spectro-photometer Lambda 3B, Norwalk, Connecticut, USA) and densi-

tometric (Densimat, bioMérieux, Italy) readings.

Initially a sensitivity test was conducted, with both PCR technique and the traditional method (plate count).

Total DNA from the strains was extracted from 180 µl samples of fresh overnight broth cultures with 6% InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy) chelating resin. The quantity and purity of DNA were assessed by determining the optical density at 260 and 280 nm, as described by Sambrook et al. (6).

The species-specific gene amplification (gene *mapA*) was done using the MdmapA1 5'-CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG-3', MdmapA2 5'-GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A-3' primer couple (8).

The plating of each dilution was performed on Campylobacter Agar Base (Karmali) medium (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). The plates were incubated at 42 °C for 4 days in microaerobic atmosphere (12% CO<sub>2</sub>). During the second research phase a broth culture was reconstituted, with a concentration equal to the first dilution which was negative for the biomolecular sensitivity test. Then amplifications were conducted at time zero and after 3, 18 and 24 hours of incubation, complying with the parameters indicated above.

Amplification reactions were carried out in a total volume of 25 µl containing 0,2 mM each of dNTP (Applied Biosystems, Monza, Italy), 1 X PCR Taq reaction Buffer, 0,42 mM of the two primers, 1,5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U/50µl of AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Monza, Italy), and between 2 and 10 µl of template DNA, according to the manufacturer's instructions. DNA amplifications were performed in a Mastercycler 5333 (Eppendorf, Hamburger, Germany). The cycling programme consisted of a initial denaturation step at 95°C for 10 min and then 35 cycles of 95°C for 30 sec, 59°C for 90 sec and 72°C for 1 min. The final elongation was performed at 72°C for 10 min.

The presence of specific PCR products was controlled after electrophoresis by 1,5% wt/vol agarose gel (Molecular Screen, Eppendorf, Milan, Italy), stained with ethidium bromide, at 100 V for 2 h in 1X Tris-acetate EDTA (TAE) buffer (1 X TAE: 40 mmol l<sup>-1</sup> Tris acetate, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0) and compared with Step Ladder, 50 bp (Sigma Aldrich, Milan, Italy) DNA molecular weight marker.

Integrated protocol for the identification of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*

The strains were taken in Triptone Soya Broth (TSB) (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) and incubated at 37 °C for 24 hours. From the broth culture obtained in this manner a growth curve was set up, using spectrophotometric reading; in a period totalling 5-6 hours the maximum microbe charge value of the pathogen was reached (10<sup>6</sup> cfu/ml).

From a broth culture, with equal concentration, decimal dilutions in TSB were set up (10<sup>-1</sup>-10<sup>-10</sup>). Extract of the genome material occurred using the same system used for *C. jejuni*, while for amplification the A058 5'-GAT ACT GCT GAA CGT AGA AGG- 3', A01 5'-GCG TAA ATC AGC ATC TGC AGT AGC-3' primer couple was used for the serovar *S. Enteritidis* (*selfA* gene) and Flic-s 5'-ATA GCC ATC TTT ACC AGT TCC CCC-3', Flic-as 5'-GCT GCA ACT GTT ACA GGA TAT GCC-3' for the serotype *S. Typhimurium* (*fliC* gene) (4, 5).

At the same time each dilution was plated on Triptone Soya Agar medium (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK), then incubated at 37 °C for 24 hours.

For each serovar, the first dilution was negative for the sensitivity test, it was subject to additional amplifications, conducted at time zero and after 3, 18 and 21 hours of incubation at 37 °C.

Reagents and conditions for PCR and electrophoresis were similar to above except for the primer and agarose gel concentration which were, respectively, 0,8 µM (for *selfA* gene), 1 µM (for *fliC* gene) and 1,2 % (for *selfA* gene), 2% (for *fliC* gene).

For amplification of *selfA* gene initial denaturation was at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 sec, annealing at 55°C for 1 sec and extension at 72 °C for 21 sec, with a final extension at 72°C for 7 min. PCR amplification of *fliC* gene was performed as follow: the first denaturation at cycle at 95°C for 3 min, followed by 30 cycles, each consisting of 1 min of denaturation at 95°C, 1 min of annealing at 65°C and 30 sec. of extension at 72°C, and the final extension cycle of 72°C for 1 min.

Three references strain, *C. jejuni* ATCC 33560, *S. Typhimurium* ATCC 13311 and *S. Enteritidis* ATCC 13076, were used for PCR optimization ad as PCR-positive control for the analysis of isolates.

## RESULTS AND CONCLUSIONS

### Tests conducted on *C. jejuni*

The culture broth of *C. jejuni*, obtained after 48 hours of incubation at 42 °C in microaerobic atmosphere, had an optical density greater than 7.5 units on the MacFarland scale and an absorbance equal to 1.357 nm (wave length 560 nm). The plating made it possible to detect a microbe charge of the initial broth culture (TQ) of  $1 \times 10^6$  cfu/ml; the detection limit of this method was equal to  $1 \times 10^0$  cfu/ml.

In relation to the genome tests, the dilutions were considered positive which had amplification fragments from a weight of 589 bp, characteristic of the species, whose detection was performed up to the second dilution ( $10^{-2}$ ) in the broth culture.

In the subsequent study phase, the first dilution was negative for PCR, corresponding to a microbe charge of  $10^3$  cfu/ml, it had positive results already after 3 hours of incubation; clear signals were recorded also after 18 and 24 hours. However, it is important to report that in 30% of the conducted tests (no.30) the biomolecular technique had a detection limit equal to  $10^5$  cfu/ml, and in the subsequent phase there were actually no positive results.

### Tests conducted on *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*

The absorbance of the initial broth culture, kept at 37 °C and shaken, totalled 1.390 nm, after 5 hours for *S. Typhimurium*, while for *S. Enteritidis* a value of 1.402 nm was recorded.

The plate count was possible for both serovar, up to a dilution of  $10^{-6}$ , thus demonstrating a very high sensitivity.

Instead, the genome technique detected the presence of two serotypes only up to a concentration of  $10^4$ cfu/ml, through the finding of amplification fragments, of character-

istic dimensions of 183 bp for *S. Typhimurium* and 488 bp for *S. Enteritidis* (Figure 1).

In the second phase, since the serovar broth cultures had a microbe charge totalling  $10^3$  cfu/ml, they had positive results at 3, 18 and 21 hours, making it possible to also reveal a growing trend in amplification band luminosity, proportional to the incubation time. In addition, it was observed that the dilution  $10^{-4}$  had a positive outcome after 18 hours of incubation (Figure 2).

Also for *Salmonella enterica*, just like for *C. jejuni* false negatives were obtained; in fact 12 tests out of 60 had amplification signals at the first dilution, in sensitivity phase, however, without detecting a positive result at contact times.

The application of the bio molecular technique furnished similar results for both of the pathogens in the assay; the remarks on the plate count are similar. Instead the differences between the two methods in terms of sensitivity seemed to be substantial; the traditional method, even if less quick and not very specific, has a high sensitivity compared to PCR, thus, making it possible to read dilutions which are negative to genome amplification. More precisely, a difference was observed, totalling four logarithmic units, between the sensitivity threshold of the two used techniques. Even the detection limit of the densitometer and spectrophotometer measurements recorded values corresponding to a microbe charge of  $10^4$  cfu/ml, as well as in the genotype assay.

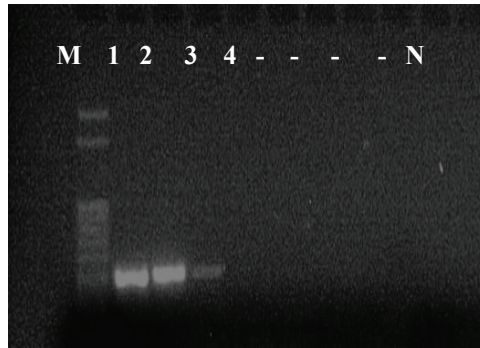
However, it needs to be underlined that, to the detriment of lower sensitivity, the PCR technique offers a significant specificity for the identification of strains of *C. jejuni*, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, in just 24 hours.

The data related to broth culture positive result seem to be interesting in the integration phase; in fact a brief incubation period, just 3 hours, was sufficient for the microbe charge to increase by a logarithm and 18 hours to obtain an increase of two orders of magnitude.

An actual advantage, resulting from the application of the combined method, compared to just the plate count, is represented by the reduction in response times. On the other hand, the high number of false negatives (23.3%), highlights the objective problems resulting from the use of the integrated method on a routine basis. Moreover, this preliminary study, in addition to needing additional tests, should be conducted starting directly from foodstuffs, this would make it possible to assess the amount of interference, due to the matrix, in determining the detection limit, and to quantify the actual time advantage resulting from integration of the methods.

Recently significant and clear results have been obtained, thanks to a combined protocol of traditional and innovative methods, in the virology field; this goal represents, at least in light of our experience, an important target to reach, also in the bacteriological sphere (10).

Figure 1 - Sensitivity test: electrophoretic readout, related to 488 bp amplicon, of *S. Enteritidis*



Legend to Figure 1

M = Step Ladder, 50 bp  
N = negative control

Positive samples

1 = initial broth culture (T.Q.) [ $10^6$  cfu/ml]

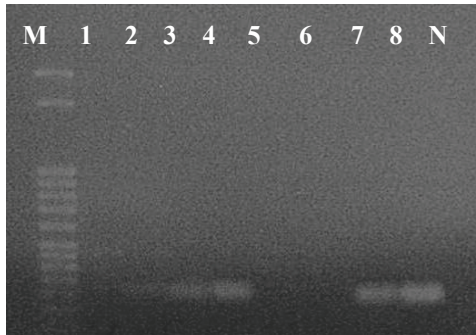
2 = dilutions  $10^{-1}$

3 = dilutions  $10^{-2}$

Negative samples

4 = dilutions  $10^{-3}$

Figure 2 - Second phase: electrophoretic readout, related to 488 bp amplicon, of *S. Enteritidis*



Legend to Figure 2

M = Step Ladder, 50 bp

N = negative control

Positive samples

2 = dilutions  $10^{-3}$  (3 hours of incubation)

3 = dilutions  $10^{-3}$  (18 hours of incubation)

4 = dilutions  $10^{-3}$  (21 hours of incubation)

7 = dilutions  $10^{-4}$  (18 hours of incubation)

8 = dilutions  $10^{-4}$  (21 hours of incubation)

Negative samples

1 = dilutions  $10^{-3}$  (time zero)

5 = dilutions  $10^{-4}$  (time zero)

6 = dilutions  $10^{-4}$  (3 hours of incubation)

## REFERENCES

- 1) Al-Soud W. A., Radstom P. (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4463-4470.
- 2) International Standard ISO 10272:1995 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*.
- 3) International Standard ISO 6579:2002 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- 4) Lim Y. H., Izumija H., Arakawa E., Takahashi H., Terajima J., Itoh K., Tamura K., Kim S., Watanabe H. (2003). Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 56, 151-155.
- 5) Oliveira S. D., Rodenbusch C. R., Cé M. C., Rocja S. L. S., Canal C. W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Sal-*

- monella detection. Lett. Appl. Microbiol., 36, 217-221.
- 6) Sambrook, J., Russel D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Vol. 3. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
  - 7) Soumet C., Ermel G., Rose N., Rose V., Drouin P., Salvat G., Colin P. (1999). Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. Lett. Appl. Microbiol., 28, (2), 113.
  - 8) Stucki U.R.S., Joachim F., Nicolet J., Burnens A.P. (1995). Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species gene that encodes a membrane protein. J. Clin. Microbiol., 33, 855-859.
  - 9) Wallace D. J., Van Gilder T., Shallow S., Fiorentino T., Segler S. D., Smith K. E., Shiferaw B., Etzel R., Garthright W. E., Angulo F. J. (2000). Incidence of food borne illnesses reported by the food borne diseases active surveillance network (Food-Net)-1997. J. Food Prot., 63, 807-809.
  - 10) Zoni R., Bigliardi L., Bacci C., Paris A., Bonardi S., Sansebastiano G. (2005). Studio sperimentale sull'integrazione colture cellulari-PCR (ICC-PCR) per valutare la sensibilità del metodo nell'isolamento del virus A dell'epatite. Atti XV Convegno AIVI, pag. 417-418. Tirrenia (PI), 17-19 giugno.



# **I FATTORI DI VIRULENZA DI SALMONELLA ENTERICA: MECCANISMI DI INTERAZIONE CON L'ORGANISMO OSPITE**

## **SALMONELLA ENTERICA VIRULENCE FACTORS: MECHANISMS OF INTERACTION WITH THE HOST ORGANISM**

Bassi Luca <sup>1</sup>, Bonardi Silvia <sup>1</sup>

### **PAROLE CHIAVE:**

*Salmonella enterica*, fattori di virulenza, invasività, isole di patogenicità, inibitori di virulenza.

### **KEY WORDS:**

*Salmonella enterica*, virulence factors, invasiveness, pathogenicity islands, virulence blockers.

### **ABSTRACT**

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* includes many pathogenic serovars for humans and animals. Of course, all the serovars are not dangerous in the same way, but relevant variations of virulence are observed according to pathogenicity factors shared by the different serovars. The most important virulence factors are: lipopolysaccharide, fimbriae, toxins, siderophorous, Type III Secretion Systems (TTSSs), resistance to phagocytosis, Nramp1 protein, plasmids, antibiotic resistance and “anti-virulence” factors. Undoubtedly, TTSS is one of the most interesting mechanism of invasiveness, a complex multiproteic apparatus that is shared by a lot of Gram-negative bacteria. It allows to export effector proteins in the host cell, so that *Salmonella* can manage to get over intestinal barrier and to overcome macrophage lysis. Studies on these structures are the basis for the development of innovative drugs for the treatment of bacterial diseases, that may replace classical therapy.

### **RIASSUNTO**

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* raggruppa al suo interno numerosi sierotipi patogeni per l'uomo e gli animali. Naturalmente non sono dotati tutti dello

---

<sup>1</sup> Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale.

Correspondence: Prof. Silvia Bonardi – Via del Taglio, 10 - 43100 Parma  
Tel. 0521-032744 – E-mail address: silvia.bonardi@unipr.it

stesso grado di pericolosità, ma al contrario si notano grandi variazioni di virulenza in base ai fattori di patogenicità di cui ogni stipite dispone. I vari fattori che vengono trattati di seguito sono: il lipopolisaccaride, le fimbrie, le tossine, i siderofori, il sistema di secrezione di tipo III (TTSS), la resistenza alla fagocitosi, la proteina Nramp1, i plasmidi, l'antibiotico-resistenza e alcuni fattori denominati di "anti-virulenza". Tra i meccanismi più interessanti di invasività si colloca sicuramente il TTSS, un complesso apparato multiproteico comune a molti batteri Gram-negativi, che consente di esportare nella cellula ospite proteine effettrici, che facilitano il superamento da parte di *Salmonella* della barriera intestinale e proteggono il batterio dall'azione dei macrofagi. In base agli studi effettuati su queste strutture sono in via di sviluppo farmaci innovativi per la cura delle patologie legate a questi microrganismi, che potrebbero un giorno sostituire i classici antibiotici.

## INTRODUZIONE

La specie *Salmonella enterica*, appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae, è rappresentata da microrganismi che hanno come habitat naturale comune l'intestino di molte specie animali, sia a sangue caldo che freddo.

*Salmonella* dispone di una serie innumerevole di fattori di patogenicità, codificati sia a livello cromosomiale che plasmidico, la cui presenza può determinare un incremento della virulenza, una maggior tendenza all'invasività e la resistenza verso una o più classi di antibiotici. Studi recenti hanno permesso di capire meglio il meccanismo d'azione di questi fattori e quindi di chiarire i punti chiave dell'instaurarsi dell'infezione. Generalmente i fattori di virulenza dei microrganismi sono considerati elementi essenziali per provocare la malattia nell'ospite; in accordo con la letteratura attuale possono essere suddivisi in diverse categorie sulla base della funzione che esplicano.

I fattori di colonizzazione permettono al microrganismo di aderire alla superficie cellulare e quindi di moltiplicarsi, evitandone l'allontanamento (ad esempio ad opera della peristalsi intestinale): a questo gruppo appartengono le fimbrie.

I fattori di invasività, in genere, consentono di eludere e superare le prime linee di difesa dell'ospite, come ad esempio l'epitelio intestinale, e fare in modo che l'infezione da localizzata diventi sistemica. In questa categoria rientrano solitamente molti enzimi e tossine, ma per quanto riguarda *Salmonella* sono coinvolte soprattutto proteine effettrici, che sono iniettate direttamente nel citoplasma della cellula ospite e inducono modificazioni strutturali che consentono l'internalizzazione del batterio.

I fattori antifagocitari sono strutture o proteine che impediscono la digestione enzimatica della cellula batterica, l'opsonizzazione e l'attivazione della reazione a cascata del complemento; sono dunque importanti per la sopravvivenza all'interno di un organismo ospite.

I fattori tossici sono rappresentati dalle esotossine e dall'endotossina. Le prime sono sintetizzate dai microrganismi, mentre la seconda è parte integrante della parete dei batteri Gram-negativi. Quest'ultima è rappresentata dal lipopolisaccaride, costituito da tre parti: il lipide A, che ha azione tossica essendo un potente induttore d'infiammazione; un core polisaccaridico che è genere-specifico; una catena laterale O oligosaccaridica indicativa della specie o del sierotipo.

Per quanto riguarda la resistenza verso gli antibiotici, gli elementi genetici che la inducono vengono veicolati da plasmidi o da altre strutture mobili, quali integroni e trasposoni.

## **I FATTORI DI VIRULENZA DI *SALMONELLA ENTERICA***

### **1-II Lipopolisaccaride**

Diversi studi effettuati sul LPS (lipopolisaccaride) hanno dimostrato come la lunghezza della catena laterale O e il grado di glicosilazione incidano sulla virulenza. Infatti una catena lunga crea un ingombro sterico che ostacola il legame con i componenti del sistema a cascata del complemento e impedisce la lisi batterica.

La catena laterale condiziona anche la sopravvivenza del microrganismo, poiché si è osservato che i vari sierogruppi di *Salmonella* interagiscono diversamente con i componenti C5 e C9 del complemento. L'aumento della lunghezza della catena laterale e il suo grado di glicosilazione accresce la virulenza, inibendo stericamente il legame tra i componenti del sistema a cascata del complemento e la superficie cellulare del batterio. Pertanto si è notato come la suscettibilità alla lisi sia maggiore nei sierogruppi B, D, C di *Salmonella* mentre è minore per A ed E, che infatti sono coinvolti nella maggior parte delle infezioni umane sistemiche (1).

### **2- Le Fimbrie**

Le fimbrie sono composte da subunità proteiche di 14 kDa. Sono state studiate soprattutto le fimbrie di *S. Enteritidis* e di altre sierovarianti appartenenti al gruppo D, che sono quindi prese come modello di studio.

La fimbria SEF 14 (*Salmonella* Enteritidis Fimbriae) pare sia coinvolta nella virulenza presentando omologie con l'adesina dei ceppi di *E. coli* enterotossigeni. La SEF 17 è comune a molti serovars di *Salmonella* e a stipti di *E. coli* che provocano diarrea; risulta essere idrofobica e lega molto strettamente la fibronectina, esplicitando un ruolo importante nell'aderenza cellulare. La SEF 18 ha una struttura fibrillare in *S. Enteritidis*, mentre negli altri serovars in cui è stata riscontrata appare come una matrice amorfa sulla superficie della cellula (1).

In particolare pare che la presenza delle fimbrie rappresenti un elemento determinante per la colonizzazione del microrganismo nel tratto distale dell'intestino tenue e del colon. Entrambi i tratti rappresentano le sedi preferenziali di adesione agli enterociti: si è osservato che *Salmonella* si ritrova generalmente nell'intestino tenue in corso di infezioni acute, mentre il rinvenimento nel colon è frequente nell'animale portatore asintomatico (2).

Gli studi sulle fimbrie al momento attuale sono in evoluzione; in particolare potrebbe variare la loro distribuzione nei diversi serovars, oppure alcune potrebbero essere presenti solo in poche sierovarianti.

### **3- Le Tossine**

Il fattore di virulenza responsabile dei sintomi diarroici è un'enterotossina prodotta da *Salmonella*, definita Stn (*Salmonella* toxin). I primi studi indicavano una relazione su base sierologica con la tossina del colera (CT: Cholera toxin) e con la

tossina termolabile (LT: heat-labile toxin) degli *E. coli* enterotossigeni, ma ricerche più recenti sugli acidi nucleici hanno dimostrato che sono entità distinte. Il meccanismo con cui agisce l'enterotossina di *Salmonella* è tuttavia simile a quello della CT, con cui condivide anche un'analogia strutturale, essendo costituita dalle subunità A (active) e B (binding), in rapporto di 1:5. L'aumentato livello di AMPc intracellulare, conseguente all'azione della tossina, porta ad un aumento di concentrazione di ioni sodio e cloro nel lume intestinale, con conseguente richiamo di fluidi (diarrea di tipo osmotico) (1).

Un altro fattore tossico è rappresentato da una citotossina. Questa viene precipitata dal cloruro di sodio e non è dializzabile; è inattivata alla temperatura di 121 °C per 15 minuti, da valori di pH inferiori a 6 e superiori a 9 e dal trattamento con tripsina (3).

La citotossina, rilasciata all'interno della cellula invasa da *Salmonella*, inibisce la sintesi proteica, portando a lisi la cellula ospite e favorendo la disseminazione del batterio. La lisi potrebbe anche essere legata all'azione chelante, sempre dovuta alla tossina, che altera la membrana cellulare. La sua azione è stata osservata su linee cellulari, quali Caco-2 e HEp-2. Le prime derivano da cellule umane di adenocarcinoma del colon, mentre le seconde da cellule di carcinoma laringeo umano. Esse mimano meglio di altre le caratteristiche delle cellule intestinali, avendo ben sviluppati sia "l'orletto a spazzola" che "le tight junctions". Lo studio ha evidenziato il rilascio di un fattore solubile (la tossina) che inibisce la sintesi proteica; tuttavia non è ancora chiarito il suo ruolo preciso nel meccanismo della diarrea, se non quello legato ad una più facile invasione della mucosa intestinale, grazie alla lisi delle cellule epiteliali (4).

Tuttavia, il danneggiamento delle cellule intestinali non deriva solamente dall'azione delle tossine. Infatti, è stato riscontrato che *Salmonella* secreta un fattore solubile ad azione paracrina, che porta alla liberazione da parte degli enterociti di IL-8, un'interleuchina tra le più efficaci ad azione chemotattica, e del Fattore di Necrosi Tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ). Il primo è particolarmente attivo nel richiamare i polimorfonucleati, soprattutto neutrofili, che migrano nella lamina propria della mucosa intestinale dopo l'uscita dai vasi sanguigni. Il secondo invece rappresenta uno stimolo più specifico per i macrofagi. Le cellule immunitarie richiamate stimolano la risposta infiammatoria, provocando in alcuni casi la perdita della funzionalità della barriera intestinale. Per questo motivo i sintomi classici dell'infezione da *Salmonella*, quali forte dolore addominale e diarrea, non sono indotti solo ed unicamente dall'azione delle tossine, ma anche da fattori chemotattici (5).

In particolare, si è osservato che *S. Typhimurium* induce la secrezione di IL-8 mediante l'attivazione del fattore nucleare di trascrizione NF-kB (Nuclear Factor-kB). È interessante che alla base dell'espressione di NF-kB ci sia un fattore pro-infiammatorio non di origine epiteliale, bensì batterica. Attraverso processi di purificazione e microfiltrazione si è scoperto che questo fattore non è altro che la proteina flagellina, il componente primario dei flagelli. Queste strutture della cellula batterica, oltre ad avere un ruolo nella colonizzazione dell'organismo ospite, consentendo a *Salmonella* di spostarsi nell'intestino e trovare la propria sede preferenziale, sono anche coinvolte nella patogenesi della diarrea. Appare però improbabile che la flagel-

lina derivi direttamente dalla depolimerizzazione dei flagelli, dato che anche batteri inattivati dalla gentamicina non rilasciano quantità significative del fattore solubile. Per secernere la flagellina nel citoplasma della cellula ospite, *Salmonella* utilizza un apparato con un alto grado di omologia con il Sistema di Secrezione di Tipo III. La flagellina, dunque, è attualmente riconosciuta in grado di mimare perfettamente l'azione del fattore di necrosi tumorale TNF- $\alpha$ , anche se non è ancora stato precisato il suo esatto ruolo nel meccanismo patogenetico della diarrea (5).

#### 4- I Siderofori

Un fattore critico per lo sviluppo batterico è l'assunzione di ferro. Il reperimento non è sempre semplice, dato che si trova complessato a diverse proteine e la frazione libera è molto ridotta.

Per questo motivo, al pari di molte altre Enterobacteriaceae, *Salmonella* elabora due molecole per il sequestro del ferro, dette siderofori: la prima, denominata enterochelina o enterobactina, ha un'affinità molto elevata con il ferro ed è un fenato composto da un trimero ciclico dell'acido diidrobenczoico e L-serina; la seconda, chiamata aerobactina, è un idrossamato sintetizzato a partire da una molecola di citrato e due derivati della lisina (1).

Entrambi i siderofori sequestrano gli ioni ferro dall'ambiente intestinale e dal siero. Dopo il legame con una proteina della membrana esterna, lo ione ferroso ( $Fe^{++}$ ) è trasferito nel citoplasma dove viene ridotto a ione ferrico ( $Fe^{+++}$ ). Generalmente gli stipiti che producono enterobactina sono più virulenti di quelli che sintetizzano aerobactina (1).

#### 5- Sistema di Secrezione di Tipo III

Una serie di geni, i cui prodotti non sono ancora ben conosciuti, si trovano in particolari aree del cromosoma note come "isole di patogenicità", costituite da molti loci. In una di queste isole si trova una serie di quindici geni, denominata regione *inv* (invasività), che codifica per vari fattori coinvolti nel processo invasivo a carico delle cellule epiteliali intestinali, che non sono normalmente fagocitiche (6). In particolare risultano coinvolti i geni *invA-H*. Questi sono legati ai fenomeni iniziali di entrata nella cellula ospite, cioè nei processi di increspatura della membrana, assemblaggio e adesione alle strutture superficiali del batterio. Questi geni vengono espressi durante la tarda fase logaritmica e la prima fase stazionaria di crescita in condizioni di alta osmolarità e bassa tensione di ossigeno, tipiche dell'ambiente intestinale (7).

L'interazione di *Salmonella* con cellule in coltura produce un'alterazione caratteristica della membrana cellulare (il cosiddetto "ruffling" o increspatura) accompagnata da estesi riarrangiamenti dei filamenti di actina nelle zone immediatamente adiacenti al sito di adesione del batterio. Una volta avvenuta la fagocitosi, la membrana e l'organizzazione dell'actina tornano normali (8).

Oggi è noto che i geni *inv* fanno parte del complesso macromolecolare denominato "Sistema di secrezione di tipo III" (TTSS - Type Three Secretion System): con questo apparato multiproteico i batteri Gram-negativi trasportano proteine effettive dal citosol batterico direttamente nel citoplasma della cellula.

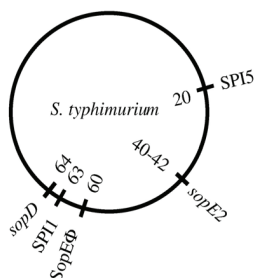
Le proteine traslocatrici del sistema TTSS attraversano dunque sia la pare-

te batterica che la membrana della cellula intestinale, venendo a formare un canale continuo. Un complesso TTSS è formato da più di venti proteine che formano una struttura simile ad un ago, il cosiddetto “needle complex” (9). La conformazione assomiglia molto a quella dei flagelli, suggerendo un’origine comune ed una relazione durante l’evoluzione batterica (10).

*Salmonella* possiede due sistemi TTSS (1 e 2), codificati nelle “isole di patogenicità” che vengono indicate come SPI1 e SPI2 (*Salmonella* Pathogenicity Island 1 e 2). I due sistemi di secrezione hanno ruoli diversi nel meccanismo patogenetico. SPI1, regione di 40-kb nel centrosoma 63 del cromosoma (11), determina l’invasività intestinale, mentre SPI2 influenza la virulenza sistemica, la crescita intracellulare e la sopravvivenza nei macrofagi, evitando la soppressione del batterio da parte della NADPH ossidasi. L’importanza di questi cluster di geni è dimostrata dal fatto che ceppi varianti con mutazione a carico della SPI1 sono ancora capaci di aderire alla cellula epiteliale, ma non hanno più le stesse caratteristiche di invasività e non inducono l’increspatura a carico della membrana (12).

L’espressione dei geni SPI1 è regolata a vari livelli da *invF* e *hilA*, un fattore di trascrizione che si trova all’interno della stessa SPI1. Il gene *hilA* (Hyperinvasion Locus) lega e attiva il promoter dell’operone di SPI1 (13), in condizioni di bassa osmolarità, bassa tensione d’ossigeno e pH leggermente alcalino. In queste identiche condizioni *hilD* attiva il promoter di *hilA*, e la proteina HilA a sua volta avvia l’espressione dei geni *prgs* (Protein Regulating Structural Genes, cioè geni strutturali che codificano per proteine regolatorie) e di un altro gene regolatore, *invF* (12). Questo dà il via alla sintesi di effettori quali SipB, SopE, SopE2, SopD e SopB (*Salmonella* Outer Proteins), che sono traslocati nel citoplasma degli enterociti tramite il TTSS-1 (14).

Le proteine effettrici traslocate dal TTSS-1 non sono tutte codificate all’interno di SPI1, ma possono essere sintetizzate grazie ad altri *loci* del cromosoma batterico. Questo è il caso di SopB, SopE, SopE2, SopD, i cui geni sono localizzati rispettivamente nel centrosoma 20 (all’interno di SPI5), 60, 40-42 e 64, come illustrato nella Figura 1 (15).



**Figura 1:** loci nel cromosoma batterico di *Salmonella* che codificano proteine effettrici (collocate all’esterno di SPI1) trasferite attraverso il Sistema di Secrezione di Tipo III. La figura rappresenta una mappa cromosomica di *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium che mostra le diverse posizioni occupate da SPI1 e da altri geni (15).

SopB è codificata da SPI5 ed è una proteina di 62 kDa. È dotata di attività fosfatidilinositol-fosfatasi, è implicata nell'invasione della cellula ospite e induce la secrezione di ioni cloro, con conseguente diarrea.

SopD è una proteina di 40 kDa che pare agire in sinergia con la SopB nel provocare la diarrea. È collocata nel centrosoma a 64 a circa 40 kb di distanza dal margine destro di SPI1.

SopE ed SopE2 sono poste rispettivamente nel centrosoma 60 e 40-42, ma mostrano una certa variabilità (15).

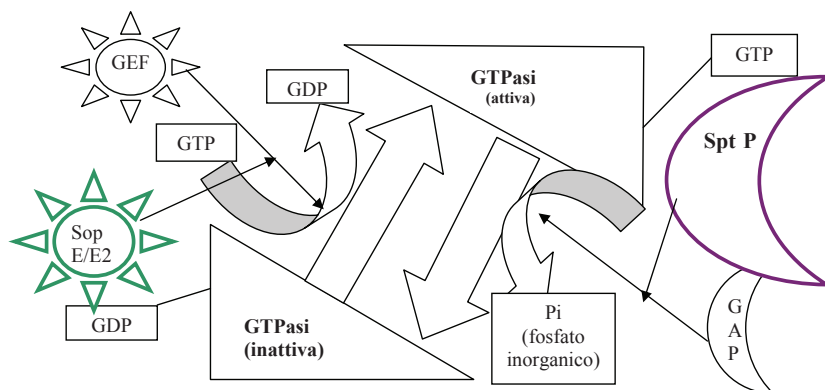
Queste quattro proteine si sono dimostrate fattori chiave nel determinare la virulenza di *Salmonella*. Si è osservato che è presente un certo grado di “ridondanza” tra gli elementi posti all'esterno di SPI1, ma di fatto si è di fronte ad una situazione strategica, in quanto l'inattivazione di uno solo di essi non provoca una consistente riduzione della virulenza. Infatti se la delezione riguarda un solo gene codificante una di queste proteine, gli effetti sulla virulenza sono molto scarsi, mentre se interessa più geni l'invasività si riduce anche di cento volte. Un'ipotesi plausibile, dato che queste proteine hanno essenzialmente le stesse funzioni, può risiedere nel fatto che durante l'evoluzione di *Salmonella* i rispettivi geni siano stati acquisiti attraverso un meccanismo di trasmissione orizzontale e che poi si siano co-evoluti con SPI1 (15).

SopB, SopD e SopE (anche SopE2) alterano la fisiologia della cellula ospite. Esse stimolano la secrezione di fluidi nel lume intestinale, probabilmente in conseguenza della risposta infiammatoria. È dimostrata, infatti, la loro capacità di stimolare la produzione di sostanze chemotattiche, che promuovono la migrazione transepiteliale dei polimorfonucleati (PMN). Queste cellule infiammatorie causano l'essudazione di fluidi, aumentando la permeabilità vascolare e danneggiando la barriera costituita dall'epitelio intestinale (16).

SopB, SopE e SopE2 promuovono anche il riarrangiamento del citoscheletro della cellula ospite; pertanto si riassemblano i microfilamenti di actina e i microtubuli, ma solo nella zona di aderenza, mentre il resto della cellula resta intatto (16).

Il citoscheletro cellulare ha una struttura definita dalla guanosina trifosfatasi monomeric (GTPasi), facente parte delle proteine Rho appartenenti al gruppo delle proteine Ras, a loro volta parte di una superfamiglia di proteine note come “G-proteine a basso peso molecolare”. Le “G-proteine” si legano a nucleotidi della guanina, come GDP o GTP (Figura 2) e si definiscono “a basso peso molecolare” per distinguerle da altre G-proteine eterotrimeriche di peso molecolare superiore.

Il controllo cellulare su questo sistema si esplica tramite l'attivazione/inattivazione della GTPasi. La proteina Ras, infatti, si sposta dalla conformazione attiva, legata a GTP, a quella inattiva, legata a GDP, agendo come un interruttore “on-off” a seconda che sia legata a GTP (posizione “on”) o ad una molecola di GDP (posizione “off”). La proteina Ras torna in posizione “on” se si scinde il legame con la GDP, a vantaggio di una nuova molecola di GTP. Questa reazione di scambio di nucleotidi è sotto il controllo di proteine definite “fattori di scambio” (GEF = guanine exchange factors) (12).



**Figura 2:** rappresentazione del ciclo di attivazione della GTPasi, con i suoi regolatori intracellulari. Il fattore di scambio della guanina (GEF) catalizza il rilascio di GDP e il legame con GTP, attivando pertanto la GTPasi. Al contrario le proteine attivanti la GTPasi (GAPs) stimolano l'idrolisi di GTP, inattivandola. Da notare l'azione mimetica delle proteine batteriche SopE/E2 e SptP.

Negli ultimi anni sono state identificate almeno quindici proteine effettrici, che partecipano all'ingresso nella cellula epiteliale dell'intestino. Queste si dividono in due categorie (12):

- 1- quelle che interferiscono con l'attività della Rho - GTPasi;
- 2- quelle che agiscono direttamente sull'actina.

Di seguito viene illustrato il meccanismo di azione di alcune proteine effettrici sintetizzate da *Salmonella*: SopB, SopE, SptP, SipC, SipA.

- La SopB (*Salmonella* outer protein B) è un'enterotossina codificata dalla SPI5. La SopB è una inositolo-fosfato fosfatasi che provoca infiammazione intestinale e secrezione di fluidi: è noto infatti che l'infezione da *Salmonella* innalza i livelli cellulari di inositolo 1,4,5,6-tetrafosfato con conseguente perdita di ioni cloro e secrezione di fluidi nel lume intestinale (17). La delezione del gene porta ancora a diarrea anche se a dosi infettanti più elevate, suggerendo che vi siano anche altri fattori scatenanti, ad esempio l'enterotossina Stn omologa a quella del colera, già citata in precedenza.

L'attività fosfataseica di SopB consente di riarrangiare il citoscheletro agendo sulla GTPasi. Appartiene quindi al gruppo 1.

- La SopE (*Salmonella* outer protein E) fu identificata per la prima volta in *S. Dublin* e successivamente anche in *S. Typhimurium*, la quale elabora anche una proteina omologa chiamata SopE2 (18). Si è osservato che le SopE hanno la capacità di scambiare GDP con GTP al pari di un GEF (19), rientrando quindi nel gruppo 1.

- La SptP (*Salmonella* Tyrosine Phosphatase) è una tirosina fosfatasi che ha la regione amminoterminale omologa alla GAP (20). Come conseguenza, le cellule infettate riacquistano rapidamente la loro architettura normale, venendo meno le modificazioni al citoscheletro. La sua attività, opposta a quella delle precedenti proteine, è determinata e regolata dal suo chaperone SicP (*Salmonella* Invasion Chaperone).



Risulta così chiarito il meccanismo di controllo del ciclo cellulare di GDP-GTP, in particolare la funzione opposta che svolgono SopE, SopE2, SopB rispetto a SptP. Quello che non è ancora definito con precisione è come le loro attività antitetiche non si annullino a vicenda, facendo supporre l'esistenza di un sistema di regolazione (12).

- La SipC (*Salmonella* Invasivity Protein) addensa e raggruppa in fasci l'actina, ma anziché incresparsi la membrana, facilita l'avvicinamento dei filamenti e porta alla formazione di grossi aggregati, la cui funzione resta però ignota (21).
- La SipA dà avvio alla polimerizzazione dell'actina nel punto di entrata del microrganismo, promuovendo la formazione di fasci legandosi direttamente all'actina; sembra inoltre favorire l'azione di SipC (22).

Una volta penetrata nella cellula, *Salmonella* continua l'esportazione di proteine effettrici tramite il sistema TTSS-2, che è importante nelle infezioni di tipo invasivo, come si è osservato nel topo. Contribuisce infatti alla sopravvivenza e alla proliferazione di *Salmonella* nei macrofagi, in particolar modo in quelli dei tessuti linfatici associati al tubo digerente (23).

## 6- Resistenza alla Fagocitosi

Nel genoma di *Salmonella* sono presenti regioni cromosomiche che codificano per fattori legati alla sopravvivenza intracellulare: il locus *oxyR* (da "oxydase") contiene le informazioni per sintetizzare proteine che proteggono dai radicali dell'ossigeno generati all'interno dei macrofagi (24); il sistema regolatore *phoP/phoQ* (da "phagocytosis") consente la sopravvivenza all'interno dei fagociti. Pertanto la risposta immunitaria viene evasa grazie alla resistenza di *Salmonella* all'interno del fagosoma, grazie al regolatore trascrizionale *phoP* e il sensore *phoQ* (25).

*PhoP* controlla la trascrizione di più di 40 geni, che vengono attivati (geni *pag*, *phoP*-activated gene) o repressi (geni *prg*, *phoP*-repressed gene). Molti dei geni repressi da *phoP* sono espressi nell'ambiente extracellulare, durante le fasi d'invasione dell'epitelio intestinale (26). Tra i geni soggetti alla regolazione *phoPQ* ci sono quelli indispensabili per la modificazione del lipopolisaccaride, quelli che mediano il trasporto del magnesio, la resistenza all'azione della bile, la secrezione delle proteine effettrici del sistema TTSS-1.

La *PhoQ* è una chinasi transmembranaria con un dominio periplasmatico che lega ioni  $Mg^{++}$ , capta i segnali esterni e fosforila la proteina *PhoP*, attivandone la capacità di legarsi al DNA. La *PhoP* fosforilata è un fattore trascrizionale in grado di legare i promotori dei geni *pho*-regolati (25).

Tra i prodotti dei geni regolati, c'è il fattore  $\sigma$ -RpoH, che influenza le heat shock proteins (HSPs). Questo aumenta la patogenicità perché, durante la fase di crescita intracellulare, modula i sistemi citotossici, in modo da ridurre la mortalità batterica (1).

Il sistema *phoPQ* controlla anche il locus *hil* (hyperinvasion locus). I geni contenuti in questa parte del genoma codificano per le proteine regolatrici HilA, HilC, HilD, che modulano la cascata dei fattori di trascrizione, deputati a loro volta al controllo dell'espressione dei geni delle SPI1 e SPI5: ad esempio il gene *hilA* controlla direttamente e indirettamente la trascrizione dei fattori contenuti nella SPI1 (27).

Un controllo così complesso della regolazione dei geni di invasione garantisce al batterio grande flessibilità nell'espressione genica, permettendogli di esprimere i geni di virulenza in condizioni diverse a seconda del sito d'infezione e della risposta dell'ospite.

Le cellule dendritiche (DC, dendritic cells), che generalmente sono le prime a fronteggiare *Salmonella* dopo l'infezione orale, essendo localizzate nella parete intestinale, sulla membrana cellulare esprimono la proteina Nramp1 (Natural resistance-associated macrophage protein 1), che ha un ruolo centrale nei meccanismi che regolano la resistenza dell'ospite verso l'invasione batterica. In uno studio sperimentale eseguito su topi infettati con *S. Typhimurium*, si è dimostrato infatti come la mancanza della proteina Nramp1 comporti un fallimento nel controllo della moltiplicazione batterica e un abbassamento consistente della carica minima infettante (28).

L'espressione della proteina Nramp1 è molto maggiore in alcune sottopopolazioni di cellule dendritiche, quali CD11c+ e CD103- (CD, cluster of differentiation). Queste producono molte più citochine pro-infiammatorie (es. interleuchina IL-6, IL-7; fattore di necrosi tumorale TNF- $\alpha$ ) in risposta ad aggressioni batteriche, rispetto ad altre cellule facenti parte del sistema immunitario (29). Si è quindi ipotizzato che la proteina Nramp1 stimoli una risposta infiammatoria più rapida ed intensa (28). Questo fatto è di importanza cruciale se si considera che la funzione immunoregolatoria delle cellule dendritiche è la più importante a livello intestinale. Infatti, oltre a rientrare nei fattori che contribuiscono allo sviluppo di un'immunità innata verso i batteri patogeni, le cellule dendritiche sono i più potenti "presentatori di antigeni": fagocitano i microrganismi nelle placche del Peyer e presentano i loro epitopi processati ai linfociti T (30).

La proteina Nramp1 a livello molecolare rappresenta una proteina transmembranaria, che funge da trasportatore di cationi (31). La sua capacità di trasportare ioni metallici risulta essenziale nell'inattivazione di una proteina, presente nel citosol, dotata di attività tirosina-fosfatase (PTP). Questo enzima normalmente impedisce l'attivazione cellulare e la produzione delle citochine, e pertanto la proteina Nramp1 è associata ad una risposta infiammatoria efficiente (28).

## 7- I Plasmidi

*Salmonella* ospita un gran numero di plasmidi serovar-specifici (SSPs-*Salmonella* serovar-specific plasmids), di grandezza compresa tra 30 e 60 Mda, che contengono un frammento di DNA provvisto della regione *spv*, ("fattore di virulenza plasmidico di *Salmonella*"). Questa regione contiene come minimo cinque geni, *spv*RABCD, dei quali *spv*R regola la sua trascrizione sulla base delle condizioni ambientali (pH, carenza di ferro e di nutrienti). I quattro geni strutturali *spv*ABCD agiscono aumentando la moltiplicazione e la disseminazione sistemica. In particolare sembrano promuovere la fase macrofagica della malattia, evitando così la distruzione del batterio da parte dei neutrofili. Possono esistere differenze minori nel gene *spv*R che, agendo da regolatore sugli altri, influenza l'invasività dei vari sierotipi (1).

La virulenza derivante dai plasmidi sembra essere legata alla specie di appartenenza della cellula ospite. Tuttavia alcuni serovar ospite-specifici non albergano

alcun plasmide di virulenza, come nel caso di *S. Typhi* e *S. Virchow*, che sono serovars intestinali con la predisposizione per la diffusione sistemica e l'infezione extraintestinale. In alcuni casi infatti il gene omologo di virulenza è integrato direttamente nel cromosoma batterico (1).

### 8- L'Antibiotico-resistenza

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza è molto diffuso, in ceppi sia di isolamento umano sia animale, per il trasferimento orizzontale di materiale genetico tra batteri dello stesso genere o di generi differenti. Questo avviene attraverso plasmidi, trasposoni e integroni che contengono i geni di resistenza, le cosiddette "cassette geniche" (32).

I trasposoni sono segmenti di DNA con la capacità di muoversi e inserirsi in punti diversi del genoma. Sono costituiti da un numero di nucleotidi che varia da 500 a 10.000, non possono duplicare autonomamente e quindi esistono solo inseriti all'interno del genoma, sia cromosomico che plasmidico. Essi possono "saltare" (il termine anglosassone è infatti "jumping genes") da un fattore plasmidico al cromosoma e viceversa, oppure dal DNA di un fago che si sta replicando nel microrganismo al cromosoma del batterio o a un suo plasmide (33). La scoperta di questi elementi trasponibili ha chiarito il meccanismo di rapida diffusione orizzontale dell'antibiotico-resistenza nelle popolazioni microbiche.

Gli integroni sono elementi genetici caratterizzati da due regioni conservate poste alle due estremità, che delimitano una zona centrale costituita dalle cosiddette "cassette geniche". Queste sono aree di ricombinazione, dove possono essere integrati geni di resistenza agli antibiotici trasferiti per via orizzontale. Gli integroni assumono importanza rilevante quando sono presenti a livello plasmidico e all'interno dei trasposoni, dato che fungono da veicolo per la diffusione orizzontale dell'antibiotico-resistenza. Delle cinque classi di integroni conosciute, la classe 1 sembra essere quella più diffusa nei batteri Gram-negativi ed è caratterizzata dalla presenza di due segmenti conservati (CS) alle estremità 5' e 3'. Il 5'CS contiene il gene *intI* codificante l'integrasi, il sito d'inserzione *attI* ed uno o più promotori. L'integrasi fa parte delle tirosin-ricombinasi sito-specifiche. Il suo ruolo è quello di catalizzare la rottura e la successiva integrazione delle eliche di DNA, promuovendo così l'inserzione di nuovi geni. Il sito *attI* è posto a valle dell'integrasi e al suo interno vengono incorporate le "cassette geniche", che sono poi convertite in geni funzionali. Sempre all'estremità 5' è incorporato il promotore (*Pant*) che promuove la trascrizione dei geni inseriti a valle. Esiste anche un promotore alternativo, definito *P2ant*. L'estremità 3'CS contiene invece i geni *sulI* e *qacEA1*, codificanti rispettivamente la resistenza alla sulfonamide ed ai composti dell'ammonio quaternario. Nel sito *attI* possono essere inserite una o più "cassette geniche", con determinanti per la resistenza a vari antibiotici (34).

L'associazione tra integroni assume importanza in relazione al fenomeno della multiresistenza, la quale comporta la resistenza contemporanea a più classi di antibiotici. Questo è sempre più frequente in *Salmonella*, come ad esempio si è verificato in *S. Typhimurium* fagotipo DT104 (35). Il suo profilo caratteristico è contraddistinto dalla resistenza nei confronti di ampicillina, cloramfenicolo, streptomicina, sulfonamidi e tetraciclina (R-type ACSSuT) e i geni responsabili sono contenuti in

cassette veicolate dagli integroni (36).

In *S. Typhimurium* DT104 recentemente sono state segnalate anche resistenze a fluorochinoloni e trimethoprim. Per quanto riguarda i primi, in particolare, è responsabile una mutazione puntiforme del gene *gyrA*, che codifica per la DNA-girasi, enzima fondamentale per la sintesi del DNA batterico. Questo tipo di resistenza non può essere trasferita orizzontalmente, ma può essere selezionata dall'uso di chinoloni, anche in ambito diverso da quello terapeutico umano. Di conseguenza sono aumentati gli isolati che presentano resistenza alla ciprofloxacina, antibiotico del gruppo dei fluorochinoloni, ed il numero di fallimenti terapeutici in corso d'infezione umana (37).

La multiresistenza si osserva comunque anche in altri sierotipi, come *S. Hadar*, *S. Blockey* e *S. Bredeney*, e si estende a quattro o più antibiotici compresi i fluorochinoloni (38). *S. Enteritidis* è meno coinvolta dal fenomeno, presentando spesso solo resistenza ad ampicillina e acido nalixidico (39).

La resistenza ai presidi antimicrobici in *Salmonella* può essersi creata per l'uso indiscriminato di antibiotici non solo in medicina umana, ma anche in medicina veterinaria e in zootecnia. Le problematiche sono inerenti al trattamento di massa negli allevamenti intensivi per la terapia e la profilassi delle infezioni batteriche, in situazioni in cui non ci può essere un controllo accurato della posologia. L'aggiunta ai mangimi di antibiotici a concentrazioni subterapeutiche, come promotori di crescita (auxinici), favorisce la selezione di ceppi resistenti sia verso le molecole impiegate, sia verso quelle strutturalmente e farmacologicamente correlate, determinando resistenza crociata. Una volta che i ceppi selezionati colonizzano il tratto intestinale degli animali, vengono escreti attraverso le feci e diffondono nell'ambiente, portando alla contaminazione degli alimenti derivati. Per limitare l'insorgere di resistenze crociate, nel 1999 nell'Unione Europea è stato vietato l'uso, a scopo auxinico, di alcuni antibiotici (virginiamicina, avoparcina, tilosina, spiramicina e zincobacitracina) appartenenti a famiglie utilizzate in terapia umana (6).

Se finora è stato detto che i batteri che possiedono integroni trovano un vantaggio selettivo in ambienti in cui si fa largo uso di antibiotici, è altrettanto vero che i geni hanno la capacità di mantenersi in ambienti dove la presenza di antibiotici è scarsa o nulla, come testimoniato dalla persistenza di resistenze verso farmaci ormai in disuso, come la streptomina (40). La flora batterica intestinale rappresenta una riserva di geni resistenti, potenzialmente trasmissibili a ceppi patogeni. Il suo livello di resistenza può essere considerato, pertanto, un buon indicatore della pressione selettiva esercitata dall'uso di antibiotici sulla popolazione stessa (41).

Uno studio in particolare ha messo a confronto la frequenza dell'antibiotico-resistenza con la presenza di integroni in enterobatteri isolati sia da polli (allevati in zone non antropomorfizzate, quindi non soggetti a trattamenti sanitari) che da casi d'infezione umana di origine ospedaliera. Nel corso dell'indagine sono stati testati ceppi appartenenti alle specie *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, e ai generi *Klebsiella* e *Salmonella*. In primo luogo è emersa una percentuale allarmante di ceppi resistenti anche tra i volatili, a testimonianza della diffusione di antibiotici attraverso elementi nutritivi e uccelli selvatici, o dovuta ad una condizione biologica endemica. Inoltre gli integroni degli enterobatteri di derivazione umana e aviaria hanno pre-

sentato tra loro elevati gradi di omologia di inserti, a sostegno di una trasferibilità orizzontale di questi elementi genici (42).

A scopo di sorveglianza epidemiologica, pare che l'utilizzo della reazione a catena della polimerasi applicata allo studio degli integroni (Int-PCR) possa dare buoni risultati. Tale metodica, infatti, ridurrebbe considerevolmente i costi economici e i tempi necessari per effettuare i tradizionali antibiogrammi. La metodica è stata messa a punto per individuare i ceppi resistenti di *Salmonella* attraverso l'identificazione di integroni di classe 1 di 1000, 1200 e 1600 bp, la cui presenza è collegata con la resistenza verso quattro antibiotici: streptomina (St), sulfisoxazolo (Su), tetraciclina (T) e spectinomicina (Sp). I ceppi dotati di integroni di 1200 bp non risentono nemmeno di ampicillina (A) e cloramfenicolo (C). Quelli dotati di integroni di 1600 bp invece sono resistenti verso gentamicina (Gen) e kanamicina (Kan). L'accuratezza di questo metodo di analisi è piuttosto elevata: si aggira tra lo 0.95-0.98 per quanto riguarda la sensibilità e lo 0.92-0.99 per la specificità. Tuttavia, bisogna tenere presente che l'accuratezza è notevolmente ridotta quando si devono valutare le resistenze individuali dei singoli antibiotici. Per questo motivo la metodica può essere un valido aiuto solo se utilizzata come strumento di screening per ceppi multi-resistenti, ad esempio *S. Typhimurium* DT104 (43).

### 9- I Fattori di "Antivirulenza"

Negli allevamenti intensivi è molto importante il ruolo svolto dai portatori sani, i quali, pur non presentando i sintomi della malattia, contaminano l'ambiente e contribuiscono a diffondere l'infezione all'interno della popolazione animale. Tali soggetti sono quindi i responsabili del mantenimento dell'infezione in azienda, creando talvolta situazioni endemiche. Sono state proposte diverse ipotesi per spiegare il meccanismo che consente a *Salmonella* di "nascondersi" all'interno della popolazione animale ed eludere così le difese immunitarie dell'ospite.

Secondo una prima teoria, gli effettori codificati da SPI1 potrebbero avere un ruolo importante. Infatti, almeno tre proteine esercitano una "down-regulation" sul fattore di trascrizione nucleare kappaB (NF-kB), che regola la risposta infiammatoria dell'ospite: AvrA, SspH1 e la già nota SptP, che come si è visto ripristina l'architettura degli enterociti alterati dall'invasione di *Salmonella*. Questi tre elementi, sebbene inizialmente siano stati considerati fattori di "anti-virulenza", permettono al microorganismo di serpeggiare in maniera silente nella popolazione, in assenza di risposta immunitaria. Si è osservato infatti come l'espressione dei geni legati al fattore NF-kB, in suini infettati con *S. Typhimurium*, sia alterata nei linfonodi mesenterici, che dovrebbero normalmente fungere da valida barriera contro i batteri patogeni. Più precisamente, studi molecolari rivelano un aumento dell'espressione dei geni controllati da NF-kB nelle 24 ore successive all'infezione, ma la via di questo fattore di trascrizione nucleare viene poi soppressa nelle 24 ore successive (dalla ventiquattresima fino alla quarantottesima ora post-inoculazione), aumentando notevolmente le possibilità di sopravvivenza di *Salmonella* (44).

Come descritto a proposito della patogenesi, i macrofagi possono svolgere un ruolo importante nella persistenza a lungo termine del microorganismo nell'ospite. Questa, dunque, rappresenta una seconda spiegazione dell'instaurarsi dello stato di

portatore, favorito in questo caso dai fattori codificati da SPI2, che contiene le informazioni necessarie per la sopravvivenza all'interno delle cellule fagocitiche (45).

Infine, il *locus* costituito dall'isola CS54 è cruciale ai fini della colonizzazione intestinale e della conseguente escrezione prolungata del microrganismo. La componente più importante espressa da questa isola di patogenicità è la proteina ShdA, localizzata sulla membrana cellulare esterna, che viene espressa solo e unicamente in ambiente intestinale. Grazie alla proteina ShdA, *Salmonella* può ridurre il suo tasso di crescita all'interno degli enterociti e comportarsi come se fosse un microrganismo commensale (45). Nei fibroblasti inoltre non si moltiplica e non esercita attività citotossica, ma rimane al loro interno in maniera persistente (46).

## CONCLUSIONI

In conclusione sembra opportuno precisare che le conoscenze acquisite nell'ambito dei fattori di virulenza di *Salmonella* assumono grande importanza alla luce delle applicazioni pratiche per il controllo e il trattamento delle patologie. Sebbene antibiotici e chemioterapici siano tuttora i farmaci più efficaci, si stanno sempre più diffondendo fenomeni di resistenza, comprese le resistenze multiple.

A questo riguardo è necessario menzionare la possibilità d'impiego di farmaci innovativi, che potrebbero in futuro sostituire i classici antibiotici per il trattamento delle infezioni batteriche. Le recenti acquisizioni in materia di tossine e fattori di virulenza hanno permesso di comprendere meglio i meccanismi patogenetici di cui si servono i batteri per "manipolare" i processi interni della cellula ospite, compreso il sistema di secrezione di tipo III (TTSS), che funge da importante meccanismo di trasporto di molecole effettrici condizionanti la virulenza. Al momento attuale si stanno sviluppando e testando una serie di farmaci antibatterici, che agiscono impedendo l'attivazione dei fattori di virulenza del patogeno, rendendolo inoffensivo. Se il TTSS-1 potesse essere neutralizzato attraverso la somministrazione di piccole molecole organiche, i cosiddetti "virulence blockers", l'infezione probabilmente sarebbe ostacolata e il sistema immunitario potrebbe contrastarla più facilmente. Tuttavia, non essendo attualmente disponibili medicinali che inibiscano specificatamente il TTSS-1, o altri meccanismi legati alla virulenza, non vi sono ancora indicazioni cliniche specifiche per l'impiego dei "virulence blockers". Negli ultimi anni sono in fase di sviluppo tre differenti inibitori: le salicilindene-acilidrazidi, le salicilanilidi e le sulfonilaminobenzanilidi. Il vantaggio nel loro utilizzo risiederebbe nell'inattivazione del TTSS-1 in tutti i batteri patogeni che lo possiedono (*Salmonella* e altri batteri Gram-negativi), senza interessare le omologhe proteine umane, riducendo al minimo gli effetti collaterali (47).

Uno studio incentrato esclusivamente sulle salicilindene-acilidrazidi ha evidenziato che queste molecole, oltre a bloccare il trasferimento delle proteine effettrici nella cellula ospite, sono in grado anche di inibire il TTSS-2 e quindi di prevenire il trasporto dei fattori codificati in SPI2. Questo riduce la capacità di *Salmonella* di sopravvivere all'interno dei macrofagi. Uno dei meccanismi che viene inibito è l'espressione del fattore  $\sigma$ -RpoH, che, come si è detto a proposito della resistenza alla fagocitosi, sopprime l'espressione delle heat shock proteins durante la fase di crescita

nei macrofagi, modulando i sistemi citotossici che determinano la mortalità batterica. Infatti, tra gli effetti delle salicilidene-acilidrazidi, si rileva anche una maggiore suscettibilità di *Salmonella* allo stress ossidativo provocato dall'ossido nitrico (NO), lo strumento di inattivazione più efficace a disposizione dei macrofagi. Secondariamente, ma non meno rilevante, è stata dimostrata un'importante riduzione della produzione di flagellina, con conseguente perdita di motilità di *Salmonella* (48).

Queste conoscenze aprono importanti orizzonti per lo sviluppo di nuovi farmaci antibatterici, provvisti di un meccanismo d'azione alternativo rispetto ai classici antibiotici, destinati a perdere progressivamente di efficacia.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Cox J. (1999). *Salmonella*. In: Enciclopedia of Food Microbiology, vol. III. Robinson R. K. (Ed), 1928-1937, Academic Press, London.
- 2) Baum L., Tsolis R. M., Heffron F. (1997). Fimbrial adhesins of *Salmonella* Typhimurium. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 412: 149-158.
- 3) Malik P., Sharma V. D., Thapliyal D. C. (1996). Partial purification and characterization of *Salmonella* cytotoxin. *Vet. Microbiol.*, 49: 11-19.
- 4) Solano C., Sesma B., Alvarez M., Urbaneda E., Garcia-Ros D., Calvo A., Gamazo C. (2001). Virulent strains of *Salmonella* Enteritidis disrupt the epithelial barrier of Caco-2 and HEP-2 cells. *Arch. Microbiol.*, 175: 46-51.
- 5) Gewirtz A. T., Simon O. P. Jr., Schmitt C. K., Taylor L. J., Hagedorn C. H., O'Brien A. D., Neish A. S., Madara J. L. (2001). *Salmonella* Typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J. Clin. Invest.*, 107: 99-109.
- 6) Graziani C., Galetta P., Busani L., Dionisi A. M., Filetici E., Ricci A., Caprioli A., Luzzi I. (2005). Infezioni da *Salmonella*: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza. *Rapporti ISTISAN*, 05/27, 35.
- 7) Lee C. A., Falkov S. (1990). The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*, 87: 4304-4308.
- 8) Saylers A., Whitt D. D. (1991). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Saylers A., Whitt D. D. (Eds). American Society for Microbiology, Washington DC.
- 9) Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galán J. E., Aizawa S. I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system. *Science*, 280 (5363): 602-605.
- 10) Hueck C. J. (1998). Type III protein secretion system in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 379-433.
- 11) Mills D. M., Bajas V., Lee C. A. (1995). A 40 Kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol. Microbiol.*, 15: 749-759.
- 12) McCormick B. A. (2004). Invasion mechanisms of *Salmonella*. In: Bacterial Invasion of Host Cells. Lamont R. J. (Ed), 1-25, Cambridge University Press, Cambridge.

- 13) Lostroh C. P., Bajaj V., Lee C. A. (2000). The cis requirements for transcriptional activation by *HilA*, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol. Microbiol.*, 37: 300-315.
- 14) Zhou D., Galán S. (2001). *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.*, 3: 1293-1298.
- 15) Miroid S., Ehrbar K., Weissmüller A., Prager R., Tschape H., Rüssmann H., Hardt W-D (2001). *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI1), SPI5, and *sopE2*. *J. Bacteriol.*, 183: 2348-2358.
- 16) Zhang S., Santos R. L., Tsois R. M., Stender S., Hardt W.-D., Bäumlér A. J., Adams L. G. (2002). The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopB, SopA, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect. Immun.*, 70: 3843-3855.
- 17) Galyov E. E., Wood M. W., Rosqvist R., Mullan P. B., Watson P. R., Hedges S., Wallis T. S. (1997). A secreted effector protein of *Salmonella* Dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol. Microbiol.*, 25: 903-912.
- 18) Stender S., Friebel A., Linder S., Rohde M., Miroid S., Hardt W. D. (2000). Identification of SopE2 from *Salmonella* Typhimurium, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc 42 of the host cells. *Mol. Microbiol.*, 36: 1206-1221.
- 19) Rudolph M. G., Weise C., Miroid S., Hillenbrand B., Bader B., Wittinghofer A., Hardt W. D. (1999). Biochemical analysis of SopE from *Salmonella* Typhimurium, a highly efficient guanosine nucleotide exchange factor for Rho GTPase. *J. Biol. Chem.*, 274: 30501-30509.
- 20) Fu Y., Galán J. E. (1999). A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc 42 to mediate host cells recovery after bacterial invasion. *Nature*, 401 (6780): 293-297.
- 21) Hayward R. D., Koronakis V. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J.*, 18: 4926-34.
- 22) Zhou D., Moroseker M. S., Galán J. E. (1999). Role of the *S. Typhimurium* actin-binding protein SipA. *Science*, 283 (5410): 2092-2095.
- 23) Cirillo D. M., Valdivia R. M., Monack D. M., Falkow S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol. Microbiol.*, 30: 175-188.
- 24) Wallis T. S., Galyov E. E. (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.*, 36: 997-1005.
- 25) Gunn J. S., Ernst R. K., McCoy A. J., Miller S. I. (2000). Constitutive mutation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transcriptional virulence regulator *phoP*. *Infect. Immun.*, 68: 3758-3762.
- 26) Oyston P. C. F., Dorrell N., Williams K. (2000). The response regulator *PhoP* is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.*, 68: 3419-3425.
- 27) Lucas R. L., Lostroh C. P., Di Russo C. C., Spector M. P., Wanner B. L., Lee C. A. (2000). Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene ex-



- pression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol., 182: 1872-1882.
- 28) Valdez Y., Diehl G. E., Vallance B. A., Grassl G. A., Guttman J. A., Brown N. F., Rosenberg C. M., Littman D. R., Gros P., Finlay B. B. (2008). Nramp1 expression by dendritic cells modulates inflammatory responses during *Salmonella* Typhimurium infection. Cell. Microbiol., 10: 1646-1661.
  - 29) Coombes J. L., Siddiqui K. R., Arancibia-Carcamo C. V., Hall J., Sun C. M., Belkaid Y., Powrie F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. J. Exp. Med., 204: 1757-1764.
  - 30) Salazar-Gonzales R. M., Niess J. H., Zammit D. J., Ravindran R., Srinivasan A., Maxwell J. R. (2006). CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. Immunity, 24: 623-632.
  - 31) Vidal S. M., Pinner E., Lepage P., Gauthier S., Gros P. (1996). Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophage from susceptible (Nramp1 D169) mouse strain. J. Immunol., 157: 3559-3568.
  - 32) Carattoli A. (2003). Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. Mol. Biol., 5: 113-122.
  - 33) Poli G., Berkovitz R., Russo S. (1996). Genetica dei microrganismi. In: Microbiologia e Immunologia Veterinaria. Poli G., Cocilovo A. (Eds), 136-137. Utet, Torino.
  - 34) Carattoli A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet. Res., 32: 243-259.
  - 35) Threlfall E. J. (2002). Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infection. FEMS Microbiol. Rev., 26: 141-148.
  - 36) Threlfall E. J. (2000). Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT 104: a truly international multiresistant clone. J. Antimicrob. Chemother., 46: 7-10.
  - 37) Allen K. J., Poppe C. (2002). Phenotypic and genotypic characterization of food animal isolates of *Salmonella* with reduced sensitivity to ciprofloxacin. Microb. Drug Resist., 8: 375-383.
  - 38) Threlfall E. J., Fischer I. S. T., Berghold C., Gerner-Smidt P., Tschape H., Cormican M., Luzzi I., Schnieder F., Wannet W., Machado J., Edwards G. (2003). Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multicentre surveillance. Eurosurveill., 8: 41-45.
  - 39) Nastasi A., Mammina C., Cannova L. (2000). Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Enteritidis, Southern Italy, 1990-1998. Emerg. Infect. Dis., 6: 401-403.
  - 40) Maguire A. J., Brown D. F. J., Gray J. J., Desselberger U. (2001). Rapid screening technique for class I integrons in *Enterobacteriaceae* and non fermenting Gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. Antimicrob. Agents Chemother., 45: 1022-1029.
  - 41) Van den Bogaard A. E., Stobberingh E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and human. Int. J. Antimicrob. Agents, 14:

- 327-335.
- 42) Gionechetti F., Dolzani L., Gombac F., Lavenia A., Tonin E. A., Lagatolla C., Banfi E., Zucca P., Monti-Bragadin C. (2002). Integroni di classe 1 ed antibiotico-resistenze in batteri Gram-negativi isolati da *Larus cachinnans michahellis*. Giornale italiano di microbiologia medica odontoiatrica e clinica, VI : 57-59.
  - 43) Rao S., Maddox C. W., Hoiem-Dalen P., Lanka S., Weigel R. M. (2008). Diagnostic accuracy of class 1 integron PCR method in detection of antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from swine production systems. J. Clin. Microbiol., 46: 916-920.
  - 44) Wang Y., Qu L., Uthe J. J., Bearson S. M., Kuhar D., Lunney J. K., Couture O. P., Nettleton D., Dekkers J. C., Tuggle C. K. (2007). Global transcriptional response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Genomics, 90: 72-80.
  - 45) Boyen F., Haesebrouck F., Maes D., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans F. (2008). Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. Vet. Microbiol., 130: 1-19.
  - 46) Martinez-Moya M., de Pedro M. A., Schwarz H., Garcia-del Portillo F. (1998). Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. Res. Microbiol., 149: 309-318.
  - 47) Keyser P., Elofsson M., Rosell S., Wolf-Watz H. (2008). Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. J. Internal Med., 264: 17-29.
  - 48) Negrea A., Bjur E., Eriksson Ygberg S., Elofsson M., Wolf-Watz H. e Rhen M. (2007). Salicylidene Acylhydrazides That Affect Type III Protein Secretion in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Antimicrob. Agents Chemother., 51: 2867-2876.

## **SALAME DI VARZI DOP PRODUZIONE E ATTIVITA' DI CONTROLLO**

### **SALAME DI VARZI PRODUCTION AND CONTROL ACTIVITY**

Bonazzi Giuseppe <sup>1</sup>

#### **PAROLE CHIAVE:**

Salame di Varzi, Controlli DOP, Istituto Parma Qualità.

#### **KEY WORDS:**

Salame di Varzi, PDO controls, Istituto Parma Qualità.

#### **SOMMARIO**

Il salame di Varzi, con il Reg. (CE) n. 1107/96, ha ottenuto la Denominazione di Origine Protetta. Il salame di Varzi è prodotto, secondo quanto stabilito dal disciplinare di produzione, in Lombardia, in provincia di Pavia, nella valle Staffora, valle lombarda che si incunea tra l'Appennino ligure e quello emiliano, sull'applicazione delle norme vigila l'Istituto Parma Qualità, l'organismo di tutela è il Consorzio Tutela Salame di Varzi. La consistenza presenta impasto tenero e compatto; l'aspetto al taglio presenta colore rosso vivo con presenza della parte grassa perfettamente bianca; il sapore risulta fragrante e caratteristico strettamente legato al periodo di stagionatura.

L'attività di IPQ prevede un insieme di controlli e verifiche di conformità dell'allevamento, della macellazione e della produzione salumiera per garantire la tracciabilità in ogni fase del processo produttivo e l'osservanza del disciplinare di produzione.

La produzione del Salame di Varzi DOP è stata effettuata, nel corso del 2008, da 13 imprese che hanno lavorato 480.079,40 kg di impasto, con una produzione di 481.350 salami freschi omologati, sono risultati conformi e quindi in possesso dei requisiti previsti dal disciplinare 472.309 salami stagionati sui quali è stato apposto il contrassegno della DOP.

Relativamente alla dimensione delle imprese, la lavorazione media per impresa, in termini di impasto lavorato, nel 2008 è stata di 36.929,18 kg, rilevandosi tuttavia un'elevata dispersione dei valori intorno alla media. Due imprese da sole rappresentano il 51,68% dell'impasto lavorato ed unitamente ad altre 3 imprese, oltre i 25.001 kg di impasto lavorato rappresentano l'84,47% della quantità lavorata mentre

---

<sup>1</sup> Sezione Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

le restanti 8 rappresentano solo il 15,53%.

Mediamente il peso dei salami omologati freschi è stato di 0,997 Kg.

## **ABSTRACT**

Salame di Varzi has obtained the Protected Designation of Origin by Regulation (EC) No 1.107/96. Salame di Varzi, according to the rules of production, is produced in Lombardy, in the province of Pavia, in the valley Staffora, a valley that is introduced between the Ligurian Apennines and the Emilia Romagna; the application of these rules is monitored by the Istituto Parma Quality; the agency is the Consorzio Tutela Salame di Varzi. Mixture has soft and compact texture, looks intense red at cut with the presence of the fatty part perfectly white, flavor fragrant and characteristic that appears closely related to the period of seasoning.

The activity of IPQ provides a set of controls and compliance testing of the production, slaughter and sausages production to ensure traceability at all stages of the production process to ensure the compliance with specifications. The production of DOP Salame di Varzi was conducted during 2008, by 13 firms that have worked 480.079,40 kg of meat, with a production of 481,350 fresh salami, 472,309 seasoned piece were in conformity with requirements set by the disciplinary and were affixed by the PDO mark.

Concerning the average size of the firms per company, in terms of dough worked in 2008, this was 36.929,18 kg, however, with a high dispersion of values around the average value. Two companies account for 51,68% of dough worked and, together with 3 other companies, over 25,001 kg., represent for 84,47% of the total amount of dough processed, while the remaining 8 represent only 15,53%.

The average weight of fresh salami certified was 0.997 Kg.

## **1. PREMESSA**

Nel 2007 la produzione italiana di salumi è stata di 1,176 milioni di tonnellate per un valore complessivo di 7.504 milioni di euro. Prosciutto cotto e prosciutto crudo rappresentano insieme la metà della produzione nazionale di salumi, 48,2% in quantità e 51% in valore. Il prosciutto cotto rappresenta il 24,1% della quantità prodotta e il 24,4% del valore, il prosciutto crudo rappresenta il 24,1% della quantità prodotta e il 26,6% del valore. Per quantità prodotta seguono la mortadella e il salame con rispettivamente una quota di produzione del 14,6% e del 9,4%, per valore il salame rappresenta invece il terzo prodotto della salumeria nazionale con un valore di oltre 906 milioni di euro.

All'interno della produzione nazionale di salumi rivestono una grande importanza per valore e per quantità prodotta le produzioni iscritte nel Registro delle Denominazioni di Origine Protette e delle Indicazioni Geografiche Protette di cui al Regolamento (CE) n. 510/2006 del Consiglio del 20 marzo 2006.

**Tabella 1:** Produzione italiana di salumi in quantità e in valore – Anno 2007

<b>Prodotti</b>	<b>Quantità</b>	<b>Quantità</b>	<b>Valore</b>	<b>Valore</b>
	<b>000t</b>	<b>%</b>	<b>000.000 €</b>	<b>%</b>
Prosciutto cotto	283,7	24,1	1830	24,4
Prosciutto crudo	283,1	24,1	1997	26,6
Mortadella	172,0	14,6	653	8,7
Salame	110,1	9,4	906	12,1
Pancetta	59,9	5,1	213	2,8
Wurstel	52,9	4,5	238	3,2
Coppa	43,7	3,7	303	4,0
Speck	28	2,4	271	3,6
Bresaola	17,1	1,5	232	3,1
Altri prodotti	126,3	10,7	861	11,5
<b>Totale</b>	<b>1176,8</b>	<b>100,0</b>	<b>7504</b>	<b>100,0</b>

Fonte: ASS.I.CA.

## **2. LA PROTEZIONE DELLE INDICAZIONI GEOGRAFICHE E DELLE DENOMINAZIONI D'ORIGINE**

La Comunità Europea poiché produzione, trasformazione e distribuzione dei prodotti agricoli e alimentari hanno un ruolo rilevante nell'economia della Comunità, al fine di ottenere un migliore equilibrio fra l'offerta e la domanda sui mercati, ha inteso attuare e favorire strategie di diversificazione della produzione agricola. La promozione di prodotti di qualità aventi determinate caratteristiche fornisce un vantaggio all'economia rurale, in particolare nelle zone svantaggiate o periferiche, sia per l'accrescimento del reddito degli agricoltori, sia per l'effetto del mantenimento della popolazione rurale in tali zone. Inoltre è crescente nell'alimentazione la richiesta di qualità da parte dei consumatori rispetto alla quantità. La ricerca di prodotti specifici genera, pertanto, una domanda di prodotti agricoli e alimentari aventi un'origine geografica identificabile e vi è la richiesta, da parte dei consumatori, di fronte alla grande varietà di prodotti commercializzati e alla moltitudine di informazioni al loro riguardo, di un'informazione chiara e succinta sull'origine del prodotto in modo da potersi meglio orientare nella scelta.

Il Reg. (CE) n. 510/2006 del Consiglio del 20 marzo 2006 relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli e alimentari GUCE L 93 del 31.3.2006 (art. 2) definisce che per "denominazione d'origine" si intende "il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese che serve a designare un prodotto agricolo o alimentare originario di tale regione, di tale luogo determinato o di tale paese, la cui qualità o le cui caratteristiche sono dovute essenzialmente o esclusivamente ad un particolare ambiente geografico, inclusi fattori naturali e umani, e la cui produzione, trasformazione e elaborazione avvengono nella zona geografica delimitata".

Per “indicazione geografica” si intende “il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese che serve a designare un prodotto agricolo o alimentare come originario di tale regione, di tale luogo determinato o di tale paese e del quale una determinata qualità, la reputazione o altre caratteristiche possono essere attribuite a tale origine geografica e la cui produzione e/o trasformazione e/o elaborazione avvengono nella zona geografica delimitata”.

Sono inoltre equiparate a denominazioni d’origine, se riconosciute anteriormente al 1 maggio 2004, talune designazioni geografiche qualora le materie prime dei prodotti da esse designati provengano da una zona geografica più ampia della zona di trasformazione, o diversa da essa, purché la zona di produzione delle materie prime sia delimitata, sussistano condizioni particolari per la produzione delle materie prime, esista un regime di controllo atto a garantire l’osservanza delle condizioni.

Per beneficiare di una denominazione d’origine protetta (DOP) o di una indicazione geografica protetta (IGP), un prodotto agricolo o alimentare deve essere conforme ad un disciplinare (art. 4). Il disciplinare deve comprendere almeno il nome del prodotto agricolo o alimentare che comprende la denominazione d’origine o indicazione geografica; la descrizione del prodotto agricolo o alimentare mediante indicazione delle materie prime, se del caso, e delle principali caratteristiche fisiche, chimiche, microbiologiche o organolettiche del prodotto agricolo o alimentare; la delimitazione della zona geografica; gli elementi che comprovano che il prodotto agricolo o alimentare è originario della zona geografica delimitata; la descrizione del metodo di ottenimento del prodotto agricolo o alimentare e, se del caso, i metodi locali, leali e costanti, nonché gli elementi relativi al condizionamento quando l’associazione richiedente stabilisce e motiva che il condizionamento deve aver luogo nella zona geografica delimitata per salvaguardare la qualità o garantire l’origine o assicurare il controllo; gli elementi che giustificano il legame fra la qualità e le caratteristiche del prodotto agricolo o alimentare e l’ambiente geografico; il legame fra una determinata qualità, la reputazione o un’altra caratteristica del prodotto agricolo o alimentare e l’origine geografica; il nome e l’indirizzo delle autorità o degli organismi che verificano il rispetto delle disposizioni del disciplinare e i relativi compiti specifici; qualsiasi regola specifica per l’etichettatura del prodotto agricolo o alimentare in questione; gli eventuali requisiti da rispettare in virtù di disposizioni comunitarie o nazionali.

Gli Stati membri designano l’autorità o le autorità competenti incaricate dei controlli (art. 10) in relazione agli obblighi stabiliti dal Reg. (CE) n. 510/2006 a norma del Reg. (CE) n. 882/2004; gli Stati membri provvedono affinché gli operatori che ottemperano alle disposizioni del Reg. (CE) n. 510/2006 siano coperti da un sistema di controlli ufficiali.

Per quanto riguarda le indicazioni geografiche e le denominazioni d’origine relative a zone geografiche all’interno della Comunità, la verifica del rispetto del disciplinare (art. 11) è effettuata anteriormente all’immissione del prodotto sul mercato da una o più autorità competenti e/o uno o più organismi di controllo ai sensi dell’art. 2 del Reg. (CE) n. 882/2004 che opera come organismo di certificazione dei prodotti. I costi di tale verifica del rispetto del disciplinare sono a carico degli operatori soggetti a tale controllo. Gli organismi di certificazione dei prodotti sono conformi alla

norma europea EN 45011 o alla guida ISO/CEI 65 (Requisiti generali relativi agli organismi che gestiscono sistemi di certificazione dei prodotti) e a decorrere dal 1 maggio 2010, sono accreditati in conformità delle stesse. Qualora le autorità abbiano deciso di verificare il rispetto del disciplinare, esse devono offrire adeguate garanzie di obiettività ed imparzialità e disporre di personale qualificato e delle risorse necessarie allo svolgimento delle loro funzioni.

In base a quanto stabilito dal Reg. (CE) n. 510/2006 l'Italia per la tipologia Carni Trasformate presenta iscritte nel Registro delle denominazioni di origine protette e delle indicazioni geografiche protette 20 DOP e 10 IGP e per la tipologia Carni 2 IGP.

Tra i salami sono registrate 4 DOP: Salame Brianza, Salame di Varzi, Salame Piacentino e Salamini italiani alla cacciatora e 3 IGP: Salame Cremona, Salame d'oca di Mortara e Salame S. Angelo.

**Figura 1:** Marchi DOP, IGP



Fonte: Comunità Europea

**Tabella 2:** Elenco delle denominazioni “Carni trasformate” iscritte nel Registro italiano DOP

<b>Prodotto</b>	<b>Numero regolamento CE</b>	<b>Data pubblicazione sulla GUCE</b>	<b>Regione</b>	<b>Provincia</b>
Capocollo di Calabria	Reg. CE n. 134 del 20.01.98	GUCE L. 163 del 02.07.96	Calabria	Catanzaro, Cosenza, Crotone, Reggio Calabria, Vibo Valentia
Coppa Piacentina	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Emilia Romagna	Piacenza
Culatello di Zibello	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Emilia Romagna	Parma
Pancetta di Calabria	Reg. CE n. 134 del 20.01.98	GUCE L. 15 del 21.01.98	Calabria	Catanzaro, Cosenza, Crotone, Reggio Calabria, Vibo Valentia
Pancetta Piacentina	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Emilia Romagna	Piacenza
Prosciutto di Carpegna	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Marche	Pesaro
Prosciutto di Modena	Reg. CE n. 1107 del 12.06.96	GUCE L. 148 del 21.06.96	Emilia Romagna	Modena, Bologna, Reggio Emilia,
Prosciutto di Parma	Reg. CE n. 1107 del 12.06.96 e Reg. CE n. 102 del 04.02.08	GUCE L. 148 del 21.06.96 e GUCE n. 31 del 05.02.08	Emilia Romagna	Parma
Prosciutto di S. Daniele	Reg. CE n. 1107 del 12.06.96	GUCE L. 148 del 21.06.96	Friuli Venezia Giulia	Udine
Prosciutto Toscano	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Toscana	Arezzo, Firenze, Grosseto, Siena, Livorno, Lucca, Massa Carrara, Pistoia, Pisa
Prosciutto Veneto Berico-Euganeo	Reg. CE n. 1107 del 12.06.96	GUCE L. 148 del 21.06.96	Veneto	Vicenza, Verona, Padova
Salame Brianza	Reg. CE n. 1107 del 12.06.96	GUCE L. 148 del 21.06.96	Lombardia	Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Milano, Varese
Salame di Varzi	Reg. CE n. 1107 del 12.06.96	GUCE L. 148 del 21.06.96	Lombardia	Pavia
Salame Piacentino	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Emilia Romagna	Piacenza



Salamini italiani alla cacciatora	Reg. CE n. 1778 del 07.09.01	GUCE L. 240 del 08.09.01	Friuli-Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Piemonte, Emilia-Romagna, Umbria, Toscana, Marche, Abruzzo, Lazio e Molise	L'Aquila, Chieti, Pescara, Teramo, Bologna, Ferrara, Forlì, Modena, Parma, Piacenza, Ravenna, Reggio Emilia, Gorizia, Pordenone, Trieste, Udine, Roma, Frosinone, Rieti, Latina, Viterbo, Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Mantova, Milano, Pavia, Sondrio, Varese, Ancona, Ascoli Piceno, Macerata, Pesaro, Urbino, Alessandria, Asti, Cuneo, Novara, Torino, Vercelli, Arezzo, Siena, Firenze, Pisa, Pistoia, Grosseto, Livorno, Lucca, Massa Carrara, Perugia, Terni, Campobasso, Isernia, Belluno, Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona, Vicenza
Salsiccia di Calabria	Reg. CE n. 134 del 20.01.98	GUCE L. 15 del 21.01.98	Calabria	Catanzaro, Cosenza, Crotone, Reggio Calabria, Vibo Valentia
Soppressata di Calabria	Reg. CE n. 134 del 20.01.98	GUCE L. 15 del 21.01.98	Calabria	Catanzaro, Cosenza, Crotone, Reggio Calabria, Vibo Valentia
Soppressa Vicentina	Reg. CE n. 492 del 18.03.03	GUCE L. 73 del 19.03.03	Veneto	Vicenza
Valle d'Aosta Jambon de Bosses	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Valle d'Aosta	Aosta
Valle d'Aosta Lard d'Arnad	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Valle d'Aosta	Aosta

Fonte: Ministero delle Politiche agricole e forestali

**Tabella 3:** Elenco delle denominazioni “Carni trasformate” iscritte nel Registro italiano IGP

Prodotto	Numero regolamento CE	Data pubblicazione sulla GUCE	Regione	Provincia
Bresaola della Valtellina	Reg. CE n. 1263 del 01.07.96	GUCE L. 163 del 02.07.96	Lombardia	Sondrio
Cotechino Modena	Reg. CE n. 590 del 18.03.99	GUCE L. 74 del 19.03.99	Emilia Romagna, Lombardia, Veneto	Modena, Ferrara, Ravenna, Rimini, Forlì-Cesena, Bologna, Reggio Emilia, Parma, Piacenza, Cremona, Lodi, Pavia, Milano, Varese, Como, Lecco, Bergamo, Brescia, Mantova, Verona, Rovigo
Lardo di Colonnata	Reg. CE n. 1856 del 26.10.04	GUCE L. 324 del 27.10.04	Toscana	Massa Carrara
Mortadella Bologna	Reg. CE n. 1549 del 17.07.98	GUCE L. 202 del 17.07.98	Emilia Romagna, Piemonte, Lombardia, Veneto, Marche, Lazio, Prov. aut. Trento, Toscana	Modena, Parma, Piacenza, Ravenna, Reggio Emilia, Alessandria, Asti, Cuneo, Novara, Torino, Vercelli, Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Mantova, Milano, Pavia, Sondrio, Varese, Belluno, Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona, Vicenza, Ancona, Ascoli Piceno, Macerata, Pesaro, Urbino, Roma, Frosinone, Viterbo, Latina, Rieti, Trento, Arezzo, Firenze, Grosseto, Livorno, Lucca, Massa Carrara, Pisa, Pistoia, Siena, Ferrara, Forlì-Cesena
Prosciutto di Norcia	Reg. CE n. 1065 del 12.06.97	GUCE L. 156 del 13.06.97	Umbria	Perugia
Salame Cremona	Reg. CE n. 1362 del 23.11.07	GUCE L. 305 del 23.11.07	Emilia Romagna, Lombardia, Veneto e Piemonte	Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Lodi, Lecco, Mantova, Milano, Monza e della Brianza, Pavia, Sondrio, Varese, Bologna, Ferrara, Modena, Parma, Ravenna, Rimini, Forlì-Cesena, Reggio Emilia, Piacenza, Alessandria, Asti, Biella, Cuneo, Novara, Torino, Verbano Cusio Ossola, Vercelli, Belluno, Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona, Vicenza
Salame d'oca di Mortara	Reg. CE n. 1165 del 24.06.04	GUCE L. 224 del 25.06.04	Lombardia	Pavia
Salame S. Angelo	Reg. CE n. 944 del 25.09.08	GUCE L. 258 del 26.09.08	Sicilia	Messina
Speck dell' Alto Adige o Südtiroler Markenspeck o Südtiroler Speck	Reg. CE n. 1107 del 12.06.96	GUCE L. 148 del 21.06.96	Prov. aut. Bolzano	Bolzano

Zampone Modena	Reg. CE n. 590 del 18.03.99	GUCE L. 74 del 19.03.99	Emilia Romagna, Lombardia, Veneto	Modena, Ferrara, Ravenna, Rimini, Forli- Cesena, Bologna, Reggio Emilia, Parma, Piacenza, Cremona, Lodi, Pavia, Milano, Varese, Como, Lecco, Bergamo, Brescia, Mantova, Verona, Rovigo
----------------	--------------------------------	----------------------------	--------------------------------------	--

Fonte: Ministero delle Politiche agricole e forestali

**Tabella 4:** Elenco delle denominazioni “Carni” iscritte nel Registro italiano IGP

Prodotto	Numero regolamento CE	Data pubblicazione sulla GUCE	Regione	Provincia
Agnello di Sardegna	Reg. CE n. 138 del 24.01.01	GUCE L. 23 del 25.01.01	Sardegna	Cagliari, Nuoro, Oristano, Sassari
Vitellone bianco dell'Appennino Centrale	Reg. CE n. 134 del 20.01.98	GUCE L. 15 del 21.01.98	Abruzzo, Campania, Emilia Romagna, Lazio, Marche, Molise, Toscana, Umbria	Bologna, Ravenna, Forni-Cesena, Rimini, Pesaro, Ancona, Macerata, Ascoli Piceno, Teramo, Pescara, Chieti, L'Aquila, Campobasso, Isernia, Benevento, Avellino, Frosinone, Rieti, Viterbo, Terni, Perugia, Grosseto, Siena, Arezzo, Firenze, Livorno, Pisa

Fonte: Ministero delle Politiche agricole e forestali

### 3. IL SALAME DI VARZI D.O.P.

Il D.M. 21 Settembre 2005, pubblicato in G.U. n. 231 del 4 ottobre 2005, “Disciplina della produzione e della vendita di taluni prodotti di salumeria” al fine di assicurare la trasparenza del mercato, proteggere ed informare adeguatamente il consumatore, attraverso la definizione di prodotti di salumeria di largo consumo in relazione alla composizione, definisce “salame” “il prodotto di salumeria, costituito da carni ottenute da muscolatura striata appartenente alla carcassa di suino con aggiunta di sale ed eventualmente di carni di altre specie animali, macinate e miscelate con grasso suino in proporzioni variabili, ed insaccato in budello naturale o artificiale”. “Il salame è asciugato e stagionato in condizioni climatiche suscettibili di determinare, nel caso di una graduale riduzione di umidità, l’evolversi di fenomeni fermentativi ed enzimatici naturali tali da portare modificazioni che conferiscono al prodotto le caratteristiche organolettiche tipiche e tali da garantire la conservazione e la salubrità in condizioni normali di temperatura ambiente”. “Nella preparazione del salame è consentito impiegare vino, pepe, aglio, piante aromatiche, zucchero, destrosio, fruttosio, lattosio, latte magro in polvere, proteine del latte, colture microbiche di avviamento alla fermentazione, spezie, aromi, additivi consentiti ad eccezione dei coloranti”.

Il salame di Varzi è prodotto, secondo quanto stabilito dal disciplinare di produzione, in Lombardia, in provincia di Pavia, nella valle Staffora, valle lombarda che si incunea tra l’Appennino ligure e quello emiliano, percorsa dal torrente Staffora. Il clima è influenzato dalle correnti che provengono dal mare e dalle cime dei mon-

ti appenninici e dall'aria della pianura sottostante, clima che favorisce un corretto processo di stagionatura degli insaccati suini. Varzi è il centro principale della Valle Staffora ad una altitudine di quattrocento metri s.l.m..

Il salame di Varzi, che vanta origini antiche, più recentemente con la legge n. 224 del 30 maggio 1989 G.U. n. 133 del 9.6.1989, ha ottenuto il riconoscimento della denominazione "Salame di Varzi" e con Reg. (CE) n. 1107/96 del 12 giugno 1996 GUCE L 148 del 21.6.1996 la Denominazione di Origine Protetta Salame di Varzi in base al Reg. (CEE) n. 2081/92.

Sull'applicazione del Disciplinare di produzione del Salame di Varzi vigila l'Istituto Parma Qualità, organismo autorizzato dal Ministero delle Politiche Agricole (Autorità nazionale di controllo, Direzione generale della qualità dei prodotti agroalimentari) a svolgere funzioni di controllo per le indicazioni geografiche e le denominazioni di origine dei prodotti agricoli e alimentari. L'organismo di tutela è il Consorzio Tutela Salame di Varzi.

Il salame di Varzi è prodotto, secondo quanto stabilito dal disciplinare di produzione, in 15 comuni lombardi, tutti facenti parte della Comunità Montana Oltrepò Pavese: Bagnaria, Brallo di Pregola, Cecima, Fortunago, Godiasco, Menconico, Montesegeale, Ponte Nizza, Rocca Susella, Romagnese, Santa Margherita di Staffora, Val di Nizza, Valverde, Varzi, Zavattarello.

**Figura 2:** Territorio Comunità Montana Oltrepò pavese e zona di produzione del Salame di Varzi



Fonte: Comunità Montana Oltrepò Pavese

Il salame di Varzi deve presentare a fine stagionatura un peso compreso tra i 100 e i 4.000 gr con un diametro al momento dell'insacco compreso tra i 38 e i 110 mm. La consistenza presenta impasto tenero e compatto; l'aspetto al taglio presenta colore rosso vivo con presenza della parte grassa perfettamente bianca; il sapore risulta fragrante e caratteristico strettamente legato al periodo di stagionatura.

La materia prima destinata al salame di Varzi deve rispondere ai requisiti previsti per il suino pesante padano e deve provenire dalle regioni Piemonte, Lombardia e Emilia-Romagna, devono essere utilizzati i tagli di carne magra del suino, con l'esclusione del magro di testa, opportunamente snervati e sgrassati. Il grasso da impiegare è esclusivamente quello del guanciaie, della testata di spalla, della pancetta, del culatello e del lardello. Le carni macellate non devono subire nessun trattamento di congelamento.

La miscela di salagione deve essere costituita da sale marino, sodio o potassio nitrato e/o sodio nitrito, pepe nero in grani interi, infuso di aglio in vino rosso filtrato, è ammesso l'uso di colture starter autoctone, è consentito esclusivamente l'uso di budelli naturali.

Il rapporto tagli magri e tagli grassi utilizzati nella preparazione dell'impasto non deve superare per ogni 100 chilogrammi di carne magra 45 chilogrammi di grasso. La carne deve essere macinata in tritacarne i cui stampi devono avere fori non inferiori a 10 mm per la produzione di salami di diametro fino a 50 mm e non inferiori a 12 mm per la produzione di salami di diametro superiore. Al trito viene aggiunta la miscela di salagione e si ottiene l'impasto del salame. L'impasto viene poi insaccato nel budello di maiale ed il prodotto ottenuto, opportunamente forellato, deve essere legato con spago a maglia fitta. Il budello utilizzato può essere il pelato suino, il retto suino (budello gentile) oppure il doppio pelato suino cucito (cucito doppio). I salami di diametro fino a 50 mm possono essere insaccati anche in budello torto bovino e possono essere legati con spago singolo anziché a maglia fitta.

L'asciugatura e la stagionatura devono avvenire in locali areati, anche con l'utilizzo di attrezzature di ventilazione e/o climatizzazione. Il periodo di stagionatura varia in funzione del diametro del prodotto. I tempi minimi di stagionatura variano da 15 giorni per quelli fino a 50 mm di diametro a 100 giorni per quelli da 90 a 110 mm. Il Salame di Varzi insaccato in budello gentile suino o in budello cucito doppio suino ha un tempo di stagionatura minimo di 100 giorni indipendentemente dal diametro dell'insacco fresco.

Il Salame di Varzi può essere commercializzato in pezzi singoli, o confezionato sottovuoto o in atmosfera controllata, intero o in tranci o affettato.

Le operazioni di affettamento devono avvenire, sotto la sorveglianza della struttura di controllo, esclusivamente nella zona di produzione al fine di garantire la qualità, la tracciabilità e il controllo.

Il salame di Varzi viene immesso al consumo con una etichetta contenente le indicazioni di legge e con il sigillo identificativo, apposto in modo inamovibile sullo spago di legatura.

Sul sigillo, sugli imballaggi o simili devono essere scritte, con caratteri ben visibili e comunque con maggior risalto rispetto a qualsiasi altra indicazione le diciture "Salame di Varzi" e "Denominazione di Origine Protetta" o il suo acronimo

“D.O.P.”

Il sigillo, di materiale plastico o cartaceo plastificato, deve essere conforme e deve riportare le diciture e le rappresentazioni grafiche previste dal disciplinare. Sul retro del sigillo può essere riportato il marchio comunitario identificativo delle produzioni DOP.

Il logo identificativo della D.O.P. Salame di Varzi è costituito dal disegno stilizzato di quattro salumieri, che indossano il tipico grembiule, su sfondo arancione con ombre tratteggiate in nero circondati da una cornice marrone in cui è inserito il logo SALAME DI VARZI D.O.P.

**Figura 3:** Sigillo identificativo ed immagine del Salame di Varzi D.O.P.



*Fonte: Consorzio Tutela Salame di Varzi/Istituto Parma Qualità*

### 3. IL SISTEMA DI CONTROLLO

Sull'applicazione delle norme previste dal Disciplinare di produzione del Salame di Varzi opera l'Istituto Parma Qualità (IPQ) che unitamente all'Istituto Nord Est Qualità (INEQ) attualmente controlla 20 produzioni a base di carne tutelate.

IPQ e INEQ si trovano ad operare in uno scenario complesso, che nel 2007 era costituito da 1.769 allevamenti con scrofe, 4.984 allevamenti riconosciuti in totale, 3.650 allevamenti che hanno inviato suini al macello, 9.188.432 suini adulti inviati alla macellazione, 123 stabilimenti di macellazione operativi, 9.154.966 suini macellati per le DOP, 273 prosciuttifici DOP/IGP e 235 salumifici DOP/IGP.

Il sistema di controllo praticato da IPQ-INEQ prevede un controllo dei requisiti di origine e di conformità della materia prima e del processo produttivo a monte della filiera, fino cioè alla macellazione, e un controllo dei requisiti di conformità e di qualità del prodotto a valle della filiera, per i diversi prodotti.

Gli allevamenti che producono suini devono, entro trenta giorni dalla nascita, su entrambe le cosce dei suinetti, apporre un tatuaggio con il codice dell'allevamento d'origine e il codice del mese di nascita, ciò per permettere la macellazione di capi che abbiano compiuto almeno nove mesi di vita ed escludere che vengano macellati animali nati altrove. Il trasferimento di animali da un allevamento ad un altro riconosciuto deve essere documentato affinché IPQ e INEQ possano controllare ed informatizzare. Un settore specifico dell'attività riguarda poi il controllo dell'alimentazione dei suini che può estendersi fino all'analisi di laboratorio.

Nel 2007 gli allevamenti riconosciuti ai fini delle DOP sono stati 4.984, localizzati in 11 regioni del centro-nord Italia. La concentrazione maggiore degli allevamenti si rileva in Lombardia con 1.973 allevamenti, seguono il Piemonte con 998 e l'Emilia Romagna con 984, ne consegue che il 79,3% degli allevamenti riconosciuti si trova in queste tre regioni.

Per quanto riguarda la distribuzione dei suini, conferiti per la macellazione, per tipo genetico, nel 2007, emerge la prevalenza di suini derivanti da verro ibrido (64,0%), cui seguono i suini figli di meticci di verri derivanti da altre razze (20,1%), i suini Large White o figli di verro Large White (14,4%) e i suini Landrace o figli di verro Landrace (1,5%).

I suini inviati alla macellazione devono essere accompagnati da un documento recante il codice dell'allevamento d'origine, di quello di provenienza con l'indicazione del numero di suini, del loro tipo genetico e della loro destinazione. Il medesimo documento viene inviato anche a IPQ-INEQ che lo controllano e lo informatizzano.

Il macello è tenuto a redigere un documento per ogni singola giornata di macellazione con l'elencazione di tutte le partite, del numero di suini ricevuti e macellati, dei codici di provenienza e d'origine; anche questo documento viene raccolto da IPQ-INEQ, controllato e informatizzato e seguirà ogni singola consegna dei tagli. Inoltre il macello su ciascuna coscia appone un timbro con il proprio codice di riconoscimento che attesta la conformità di origine, di provenienza e qualitativa. I macelli operativi in Italia sono 123 e macellano oltre 9 milioni di suini, il maggior numero di macelli si riscontra in Lombardia con 39 macelli, seguono l'Emilia Romagna con 27

e il Piemonte con 19. Tutti i macelli sono controllati almeno una volta all'anno, viene controllata la veridicità delle informazioni presenti nel documento che sono tenuti a redigere giornalmente e, a campione, vengono accertati i flussi di suini vivi in entrata e i flussi di materia prima in uscita. Tale procedura di controllo, associata all'attività di selezione degli stagionatori, porta all'esclusione dal circuito DOP migliaia di cosce suine fresche e consente di tenere basso l'indice di non conformità finale.

Nel 2007 il numero di suini adulti conferiti per la macellazione ai fini delle DOP è stato di 9,188 milioni in crescita del 3,4% rispetto l'anno precedente. Per quanto riguarda invece l'origine dei suini conferiti ai fini delle DOP per regione, nel 2007, il 55,8%, pari a 5,129 milioni di suini, proveniva da allevamenti lombardi, il 15,1%, pari a 1,385 milioni di suini, proveniva da allevamenti emiliano-romagnoli e il 14,9%, pari a 1,367 milioni di suini, proveniva da allevamenti piemontesi. Queste tre regioni da sole contribuiscono con l'85,8% dei suini adulti conferiti per la macellazione.

La materia prima fresca arriva al salumificio con il timbro di identificazione e di autocertificazione del macello e con una copia del documento emesso dal macello. Il salumificio, per ogni consegna, in autocontrollo riscontra la conformità della materia prima e trascrive in un apposito registro ufficiale tutti gli elementi di descrizione e identificazione. La materia prima viene poi avviata alla lavorazione. Durante tutta la fase di lavorazione il salumificio deve predisporre "schede identificative e descrittive dei lotti di produzione" mentre IPQ e INEQ devono verificare e informatizzare nel proprio database tutti i documenti prodotti per ogni singolo lotto. Una volta che il salame è stato insaccato, gli viene apposto un sigillo metallico che riporta la data dell'inizio lavorazione. Ogni produttore al termine della stagionatura accerta la conformità del prodotto emettendo una "dichiarazione di autocertificazione" contenente tutte le informazioni riguardanti la tracciabilità. Sarà compito di IPQ e INEQ, oltre alla raccolta e informatizzazione dei documenti, verificare autonomamente lo standard qualitativo del prodotto stagionato mediante test probatori che verifichino il tempo di stagionatura minima e l'assenza di difetti morfologici, tecnici e organolettici. Al termine di tali procedure, verificata la conformità del prodotto, verranno applicati i contrassegni di certificazione delle DOP che verranno inseriti nell'etichetta commerciale. Gli ispettori IPQ e INEQ sono tenuti anche a periodici controlli sul salame affettato, devono controllare il salame stagionato utilizzato, la predisposizione delle confezioni, gli stampatori delle etichette autorizzate e il tutto deve avvenire rigorosamente nel territorio delimitato dal disciplinare produttivo.

## **5. LA PRODUZIONE**

La produzione del Salame di Varzi DOP è stata effettuata, nel corso del 2008, da 13 imprese che hanno lavorato 480.079,40 kg di impasto, sono stati avviati alla produzione 481.350 salami freschi e sono stati controllati 476.768 salami stagionati, risultando conformi e quindi in possesso dei requisiti previsti dal disciplinare 472.309 salami stagionati sui quali è stato apposto il contrassegno della DOP. Negli ultimi quattro anni tuttavia la produzione ha fatto registrare una diminuzione del numero di salami omologati freschi avviati alla produzione del 14,4%, mentre il numero dei salami stagionati controllati è diminuito del 12,9% e quello dei salami stagiona-



ti conformi dell'8,8%. Contemporaneamente si è avuta una sensibile diminuzione nel quadriennio del numero dei salami stagionati distolti dalla produzione DOP. La lavorazione media per impresa, in termini di impasto lavorato, nel 2008 è stata di 36.929,18 kg, rilevandosi tuttavia un'elevata dispersione dei valori intorno alla media. Si hanno infatti 4 imprese con produzione al di sotto dei 5.000 kg lavorati per anno, mentre si hanno 2 imprese con oltre 75.001 kg lavorati per anno. Quest'ultime da sole rappresentano il 51,7% dell'impasto lavorato. Le 5 imprese oltre i 25.001 kg rappresentano l'84,5% dell'impasto lavorato mentre le restanti 8 rappresentano solo il 15,5%, le 4 imprese con produzione fino a 5.000 kg lavorati per anno rappresentano solo l'1,7% dell'impasto lavorato.

Le imprese oltre 75.001 kg di impasto lavorato, che rappresentano il 15,4% delle imprese, hanno lavorato il 51,7% dell'impasto e avviato alla stagionatura il 35,5% dei salami omologati freschi, peso medio di 1,054 kg.

Le imprese da 25.001 a 75.000 kg di impasto lavorato, che rappresentano il 23,1% delle imprese, hanno lavorato il 32,8% dell'impasto e avviato alla stagionatura il 45,7% dei salami omologati freschi, peso medio di 0,903 kg.

Mediamente il peso dei salami omologati freschi è stato di 0,997 Kg.

**Tabella 7:** Numeri di salami freschi avviati alla produzione a DOP (omologazione all'inizio della lavorazione)

<b>Anni</b>	<b>Salami omologati n</b>
2005	562.357
2006	526.752
2007	504.396
2008	481.350

Fonte: Istituto Parma Qualità

**Tabella 8:** Controllo finale di conformità sui salami stagionati per l'apposizione del contrassegno della DOP Salame di Varzi

<b>Anni</b>	<b>Salami stagionati controllati n</b>	<b>Salami stagionati distolti* n</b>	<b>Salami stagionati conformi** n</b>
2005	547.511	29.634	517.877
2006	550.041	8.361	541.680
2007	505.332	10.854	497.478
2008	476.768	4.459	472.309

\* salami stagionati distolti dalla produzione DOP per effetto dell'attività di autocontrollo aziendale

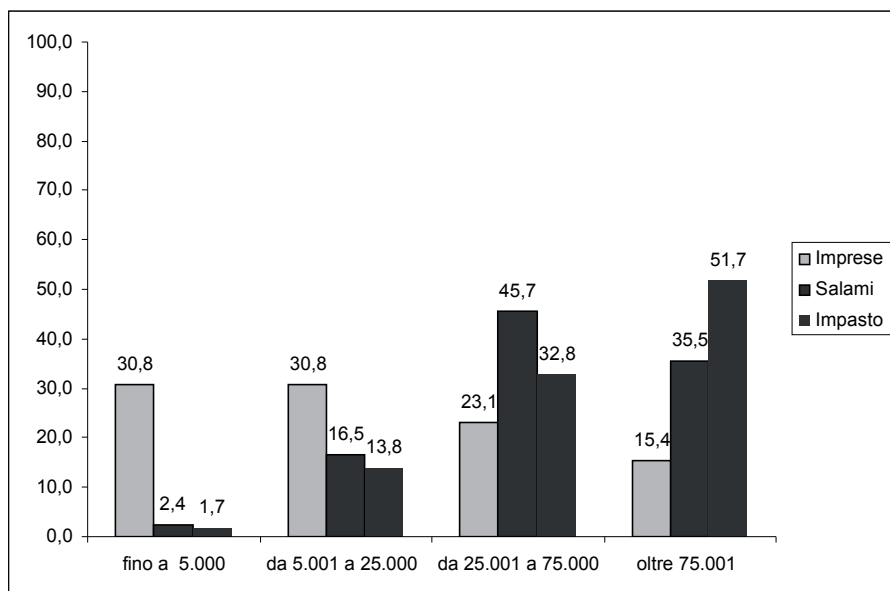
\*\* salami stagionati conformi e quindi in possesso dei requisiti previsti dal disciplinare sui quali è stato apposto il contrassegno della DOP

Fonte: Istituto Parma Qualità

**Tabella 9:** Imprese, salami omologati freschi e impasto lavorato per classe dimensionale Anno 2008

<b>Kg/anno impasto lavorato</b>	<b>Imprese n</b>	<b>Salami n</b>	<b>Impasto kg</b>	<b>Peso medio kg</b>
fino a 5.000	4	8973	8069,56	0,899
da 5.001 a 25.000	4	62782	66489,84	1,059
da 25.001 a 75.000	3	174221	157390,40	0,903
oltre 75.001	2	235374	248129,00	1,054
Totale	13	481350	480078,80	0,997

Fonte: Istituto Parma Qualità

**Grafico 1:** Imprese, salami omologati freschi, impasto lavorato per classe di dimensione delle imprese - Valore % - Anno 2008

Fonte: Istituto Parma Qualità

## 6. CONCLUSIONI

Con una quota di produzione del 9,4% della quantità e del 12,4% del valore della produzione italiana dei salumi, il salame è una delle produzioni più importanti della salumeria italiana. All'interno di questa produzione una grande importanza rivestono, ai sensi del Reg. (CE) n. 510/2006, le produzioni a Denominazione di Origine Protetta (Salame Brianza, Salame di Varzi, Salame Piacentino e Salamini italiani alla cacciatora) e le produzioni a Indicazione Geografica Protetta (Salame Cremona, Salame d'oca di Mortara e Salame S. Angelo). Il salame di Varzi, con Reg. (CE) n.

1107/96 ha ottenuto la DOP.

Il salame di Varzi è prodotto in Lombardia, in provincia di Pavia, nella valle Staffora, valle lombarda che si incunea tra l'Appennino ligure e quello emiliano, secondo quanto stabilito dal Disciplinare di produzione, sull'applicazione di queste norme vigila l'Istituto Parma Qualità. L'organismo di tutela è il Consorzio Tutela Salame di Varzi.

Il salame di Varzi deve presentare a fine stagionatura un peso compreso tra i 100 e i 4.000 gr con un diametro al momento dell'insacco compreso tra i 38 e i 110 mm. La consistenza presenta impasto tenero e compatto; l'aspetto al taglio presenta colore rosso vivo con presenza della parte grassa perfettamente bianca; il sapore risulta fragrante e caratteristico strettamente legato al periodo di stagionatura. I tempi minimi di stagionatura variano 15 giorni per quelli fino a 50 mm di diametro a 100 giorni per quelli da 90 a 110 mm.

L'attività di IPQ prevede un insieme di controlli e di verifiche di conformità dell'allevamento, della macellazione e della produzione salumiera per garantire la tracciabilità in ogni fase del processo produttivo e l'osservanza del disciplinare di produzione.

La produzione del Salame di Varzi DOP è stata effettuata, nel corso del 2008, da 13 imprese che hanno lavorato 480.079,40 kg di impasto, con una produzione di 481.350 salami omologati freschi, sono stati controllati 476.768 salami stagionati e sono risultati conformi e quindi in possesso dei requisiti previsti dal disciplinare 472.309 salami stagionati sui quali è stato apposto il contrassegno della DOP. Negli ultimi quattro anni la produzione ha fatto registrare una diminuzione del numero di salami omologati freschi avviati alla produzione del 14,4%, mentre il numero dei salami stagionati controllati è diminuito del 12,9% e quello dei salami stagionati conformi dell'8,8%. Contemporaneamente si è avuta una sensibile diminuzione del numero dei salami stagionati distolti dalla produzione.

Relativamente alla dimensione delle imprese della lavorazione media per impresa, in termini di impasto lavorato, nel 2008 è stata di 36.929,18 kg, rilevandosi tuttavia un'elevata dispersione dei valori intorno alla media. Due imprese da sole rappresentano il 51,7% dell'impasto lavorato ed unitamente ad altre 3 imprese, oltre 25.001 Kg di impasto lavorato rappresentano l'84,5% dell'impasto lavorato mentre le restanti 8 solo il 15,5%.

Mediamente il peso dei salami omologati freschi è stato di 0,997 Kg.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) ASS.I.CA. (2008) Rapporto annuale 2007, Milano
- 2) Ballarini G. (2005) Il salame di Varzi Dop. Dalle origini ai giorni nostri, Premiata Salumeria Italiana n. 5, Pubblicità Italia Sas, Modena
- 3) Bonazzi G. (2005) "Prosciutto di Parma DOP" e sistema dei controlli, Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma Vol. XXIV, Parma.
- 4) Bonazzi G. (2007) "Culatello di Zibello" DOP, produzione e attività di controllo, Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma Vol.

XXVI, Parma.

- 5) Bonazzi G. (2008) Prosciutto di Modena DOP e certificazioni e controlli nella filiera delle carni suine per le DOP, Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma Vol. XXVII, Parma.
- 6) IPQ, INEQ (2002) Certificare l'origine della qualità, IPQ, INEQ, Parma

## **REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF DAIRY COWS UNDER NEGATIVE ENERGY BALANCE CONDITIONS**

### **EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DELLE VACCHE DA LATTE IN CONDIZIONI DI BILANCIO ENERGETICO NEGATIVO**

Rossi F., Righi F., Romanelli S., Quarantelli A.

#### **KEY WORDS:**

Energy balance, dairy cows, fertility, conception rate

#### **PAROLE CHIAVE:**

Bilancio energetico, vacche da latte, fertilità, tasso di concepimento

#### **ABSTRACT**

The reproductive efficiency of high yielding dairy cow is influenced by several aspects concerning nutrition and rationing: dry matter intake, dietary energy concentration, protein level and vitamin-mineral integration. These aspects have fundamental importance in herd management and in milk production optimization.

This article focuses on the important role of negative energy balance (NEB) in conditioning the metabolic-hormonal activity and reproductive apparatus functionality, and in how these factors can negatively influence the typical reproductive parameters of postpartum dairy cows.

#### **ENERGY BALANCE, BCS AND FERTILITY IN DAIRY COWS**

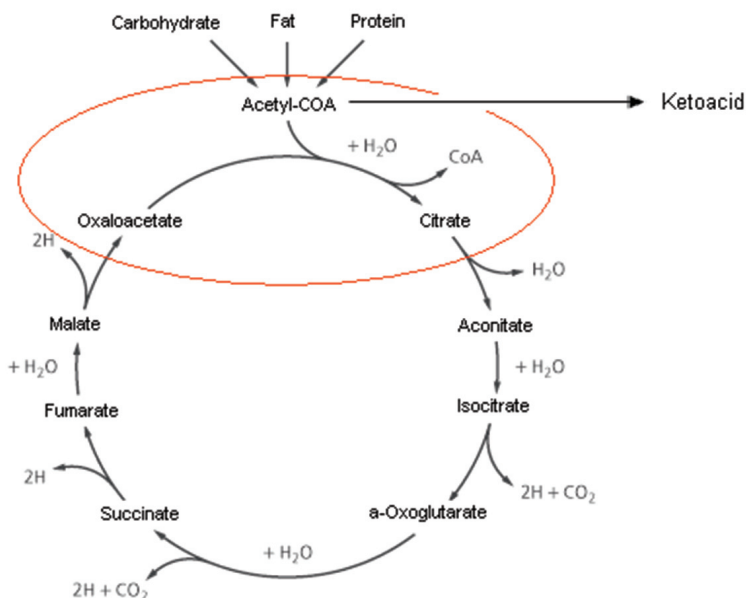
Negative energy balance (NEB) is a frequent condition occurring in high producing dairy cows some days after calving. It consists of an imbalance between diet energy supply and production requirements.

In the early post-calving period, cow face a strong increase in milk production and a decrease in appetite resulting from calving stress, and the possible quick change in diet compared to the last stage of pregnancy. In high yielding dairy cows diet is unable itself to support the loss of nutrients related to milk production. Therefore cows often mobilize their lipid reserves accumulated during dry period and use them as further energy source. Fatty acid released are metabolized to Acetil COA, that is metabolized into Krebs Cycle for energy production (Nelson et Cox, 2002).

The large amount of Acetyl COA accumulated after lipomobilization, cannot be completely utilized in this metabolic pathways, because of the lack of oxalacetate resulting from carbohydrates catabolism and glucose depletion.

As alternative energetic pathways the body produces an excess of ketone bodies, which leads to typical clinical symptoms of post-calving ketoacidosis, like decreasing in ruminal activity and milk production.

As a result, several negative events can be observed: deterioration of milk characteristics, decreased immune response (mastitis, lameness, respiratory diseases and metritis) and reduced reproductive efficiency in the post-partum period.



**Figure 1:** Effect of Acetyl COA excess on the Krebs Cycle.

Negative energy balance can affect cow reproductive performances through some biological mechanisms:

- Metabolic hormonal modifications regulated by pituitary-hypothalamic axis (as LH, FSH, GH, insulin, leptin, IGF-1, oestrogen and progesterone)
- Interactions between blood metabolites and ovarian activity (glucose, NEFA, BOHB)
- Relationship between uterine functionality and immune response during pregnancy and transition period

The oocyte is the structure that suffers more because of the changes in energy requirements of the body. In early development stage, the blood-oocyte barrier is very permeable and oocyte is almost in directly contact with the bloodstream. The permeability of this barrier seems to increase when follicles are in pre-ovulatory

stage, but in this period blood metabolites are able to easily penetrate into follicular fluid and directly act on the oocyte (Fernandez et al., 2006).

The lipomobilization that distinguishes this disease, due to the low plasmatic level of insulin and to the high concentration of GH (growth hormone), is the basis of the increase of non-esterified fatty acids (NEFA) in blood. They metabolites have a direct toxic effect on the follicles with induction of cumulus cells apoptosis, necrosis and follicular development arrest (Jorritsma et al., 2004; Friggens, 2003). A probable negative effect is also supported by ketone bodies (particular  $\beta$ -hydroxybutyrate BOHB) although metabolic alterations are still unknown (Reist et al., 2003).

In the immediate pre-calving stage, low leptin plasmatic levels can serve as reference to highlight a delayed first post-partum ovulation and a longer duration of the calving-conception interval. In this stage, leptin concentration is directly related to cow's BCS and may be indicative of the adipose tissue amount available for lipomobilization (Wathes et al., 2007) and for eventual ketoacids production.

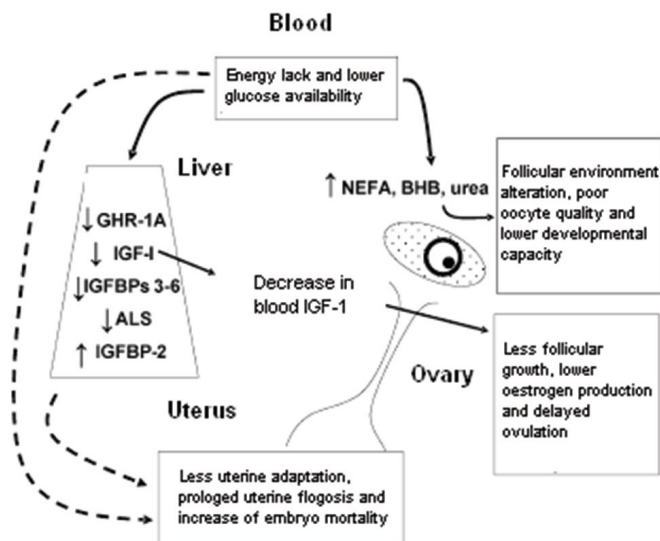
NEB is able to negatively change ovarian activity also through other metabolic pathways. The plasmatic insulin, IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor 1) and leptin decrease has direct effects (lower ovarian sensibility to pituitary gonadotropins) and indirect effects on follicular development, such as on lower pulse secretion frequency of pituitary LH. Insulin has a positive effect on ovarian sensibility to gonadotropins, resulting in best recruitment of small follicles and development of the dominant follicle.

During post-calving, follicle capacity to produce required oestrogens for next ovulation is directly influenced by insulin and IGF-1 plasmatic concentration (Butler, 2003); in particular the latter can result in 40-50% lower levels during negative energy balance in the first two weeks post-calving, and can reflect the same molecular concentration in follicular fluid (Fenwick et al., 2008; Fitzpatrick et al., 2007). Therefore, there is an high decrease of IGF-1 plasmatic levels in the first post-calving week and this fall directly influences several reproductive parameters (calving to first ovulation and to conception intervals). IGF-1 is essential to improve gonadotropins activity on ovarian structures and to stimulate cell proliferation and follicular steroidogenesis (Wathes et al., 2007). Unlike IGF-1, lower insulin plasmatic levels have not shown a strong influence on follicular cell proliferation, but can participate to the regulation of oestrogen production in case of serious energy decrease (Wathes et al., 2007).

Glucose concentration in blood during NEB period is significantly reduced. However, cow hematic glucose is physiologically low because of reduced ruminal absorption of glucose after almost complete fermentation to propionic acid (47,2-55,8 mg/dl) and it directly influences follicular fluid glucose concentration (Lopez et al., 2003; Martin et al., 2008). During NEB and ketosis, a delayed oocyte development is observed, due to glucose shortage, fundamental molecule for energy (ATP), RNA and DNA production by follicular and oocyte cells.

Another consequence of the post-calving lower energy is a lack of follicular ovulation, which continues its development to follicular cyst (Boland et al., 2001). This pathogenesis is supported by the lack of pituitary LH secretion that does not allow follicular ovulation and a major oestrogen production. These are responsible

of continue cysts development and of the characteristic behavior of cows affected by this pathology, (increase of walking activity and mount other animals).



**Figure 2:** Summary diagram of negative energy balance direct and indirect effects on the reproductive apparatus function, mediated by metabolic-hormonal change that involve bloodstream and liver: decrease of GH receptors (GHR-1A) and IGF-1, IGF binding protein (IGF-BP) and acid-labile subunits (ALS) (Whates et al., 2007 modified).

Between NEB effects, some authors (Van Knegsel et al., 2007) mention the effect on progesterone (P4) plasmatic concentration; during the first post-calving days, NEB impacts corpus luteum activity (lower energy availability for luteal cells), and consequently progesterone production, especially during second and third oestrus cycles.

This condition does not allow changes in endometrial morpho-functional characteristics at the time of post-calving first service, and negatively affects intra-uterine environment, necessary for embryo implantation.

The uterine effects of negative energy balance are identified as a delayed uterine involution after post-calving (30-40 days) and a major incidence of herd endometritis. These facts, responsible for strong delay in resume of normal reproductive functions after calving, are due to alteration of some genes expression connected with NEB, that regulate the immune response of the reproductive tract (IL 1 $\beta$  and IL 8 encoding) and the recondition of normal uterine size (Boland et al., 2001). The latter problem derived from alteration that regulate protein change and collagen catabolism of uterine wall (matrix metalloproteinases MMPs-1), that resulte poorly tonic, unable to expel the fetal membranes and virtually defenseless towards pathogens because of lack of mononuclear cells (Wathes et al., 2007).

Retained placenta, is a serious disease connected with the two previous illness, resulting from problem in separation of placental cotyledons from endometrial caruncles and hence lack expulsion of fetal membranes within 24 hours after calving.

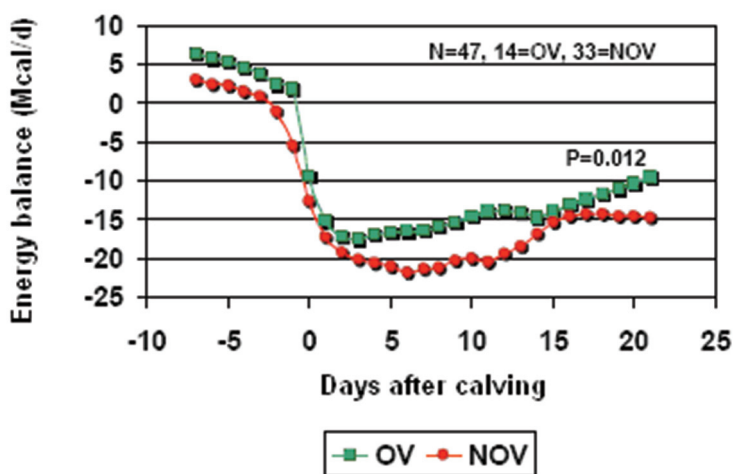


NEB can influence differently this aspect: for example reducing the intensity of uterine contractions essential for expulsion of pregnancy residuals and immune response decrement (Van Knegsel et al., 2007).

The main problem in management of reproductive disorders through negative energy balance control (in post-calving dairy cows) is that this phenomena has become almost impossible to avoid in current modern dairy herds, because of the genetic potential.

One of the most used method for indirectly estimate the energy balance, is the control of body condition score (BCS); it was observed that a decrease of 0,5 BCS points between dry period and first weeks of lactation (transition period), coincide with 10% conception rate (CR) loss (Butler, 2003).

In several studies (Butler, 2006; Schneider, 2004; Wathes et al., 2007) it was concluded that the decrease of one point BCS at the moment of post-calving first insemination, can reduce cow reproductive efficiency by 17-38%. Consequently interval from calving to conception can increase over 120-130 days (usually if cow exceed 180-200 days after calving, becomes to high culling risk).



**Figure 3:** Energy balance becomes negative a few hours before calving and remains on very negative values in cows with delayed ovulation (NOV) while tend to rebalance in cows with normal pre-ovulatory activity after parturition (OV) (Butler, 2006 modified).

It has been demonstrate that (Roche et al., 2007) with optimal or high BCS during the steaming-up and immediately after calving (BCS 2,75-3,25), there is a greater tendency to correctly express a oestrus during voluntary waiting period, compared with cows that exhibiting poor body condition in the same period.

Besides the strong influence of BCS on duration of anoestrus after calving, lower body condition during transition period can influence also pregnancy rate (PR). The loss of a point BCS during the first weeks post-partum is an excellent indicator of cow reproductive potential at the moment of first service after calving. According to

Montiel et Ahuja (2003), cows with 0,5-1 BCS losses show a 53% potential conception rate, While a loss higher than one point BCS may reduce to 17% the potential conception rate, which consequently affects PR.

These data express the fundamental importance to assess BCS of dry and transition dairy cows, for indirectly estimate reproductive capacity at the moment of first service.

## CONCLUSIONS

Negative energy balance (NEB) is the major nutritional factor decreasing reproductive efficiency of high yielding dairy cows, that induces a delay in first ovulation after calving (or a low oocytes quality), an increase in embryo mortality incidence and an increased incidence of uterine diseases with interval from calving to conception that increases over 120-130 days, reduction on conception rate (CR) and decrease in pregnancy rate (PR).

## REFERENCES

- 1) Boland M.P. Lonigan P., O'Callaghan D. (2001) "Effect of nutrition and andocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development" *Theriogenology* vol. 55, pp. 1323-1340
- 2) Butler W.R. (2000) "Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle" *Animal Reproduction Science* vol. 60-61, pp. 449-457
- 3) Butler W.R. (2003) "Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows" *Livestock Production Science* vol. 83, pp. 211-218
- 4) Butler W.R. (2006) "Relationships of negative energy balance with fertility" *Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop* pp. 51-60
- 5) Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Kenny D.A., Diskin M.G., Patton J., Murphy J.J., Wathes D.C. (2008) "Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows" *Domestic Animal Endocrinology* vol. 34, pp. 31-44
- 6) Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Llewellyn S., Kenny D.A., Patton J., Murphy J.J., Wathes D.C. (2008) "Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct" *Reproduction* vol. 135, pp. 63-75
- 7) Fernandez R., Martini A.C, Navarro V.M., Castellano J.M., Dieguez C., Aguilar E., Pinilla L., Tena-Sempere M. (2006) "Novel signals for the integration of energy balance and reproduction" *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 254-255, pp. 127-132
- 8) Fitzpatrick R., Llewellyn S., Kenny D.A., Murphy J.J., Scaramuzzi R.J., Wathes D.C. (2007) "Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows" *Reproduction* vol. 133, pp.627-639
- 9) Friggens N.C. (2003) "Body lipid reserves and the reproductive cycle: towards

- a better understanding” *Livestock Production Science* vol. 83, pp. 219-236
- 10) Jorritsma R., Cesar M.L., Hermans J.T., Kruitwagen C.L.J.J., Vos P.L.A.M., Kruip T.A.M. (2004) “Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro” *Animal Reproduction Science* vol. 81, pp. 225-235
  - 11) Lopez Gautius F., Yaniz J., Madriles-Helm D. (2003) “Effects of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: a meta-analysis” *Theriogenology* vol. 59, pp. 801-812
  - 12) Martin B., Golden E., Carlson O.D., Egan J.M., Mattson M.P., Maudsley S. (2008) “Caloric restriction: Impact upon pituitary function and reproduction” *Ageing Research Reviews* vol. 7, pp. 209-224
  - 13) Montiel F., Ahuja C. (2005) “Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review” *Animal Reproduction Science* vol. 85, pp. 1-26
  - 14) Nelson D.L., Cox M.M. (2002) “I principi della biochimica di Lehninger” Ed. Zanichelli
  - 15) Oliveira J.F.C., Neves J.P., Moraes J.C.F., Goncalves P.B.D., Bahr J.M., Hernandez A.G., Costa L.F.S. “Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress” *Animal Reproduction Science* vol. 73, pp. 1-10
  - 16) Reist M., Erdin D.K., Von Euw D., Tschumperlin K.M.T., Leuenberger H., Hammon H.M., Morel C., Philipona C., Zbinden Y., Kunzi N., Blum J.W. (2003) “Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows” *Theriogenology* vol. 59, pp. 1707-1723
  - 17) Roche J.F. (2006) “The effect of nutritional management of the dairy cows on reproductive efficiency” *Animal Reproduction Science* vol. 96, pp. 286-296
  - 18) Roche J.R., Macdonald K.A., Burke C.R., Lee J.M., Berry D.P. (2007) “Associations among body condition score, body weight and reproductive performance in seasonal-calving dairy cattle” *Journal of Dairy Science* vol. 90, pp. 376-391
  - 19) Schneider J.E. (2004) “Energy balance and reproduction” *Physiology and Behaviour* vol. 81, pp. 289-317
  - 20) Van Knegsel A.T.M., Van Den Brand H., Dijkstra J., Kemp B. (2007) “Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation” *Theriogenology* vol. 68s, pp. 274-280
  - 21) Wathes D.C., Fenwick M., Cheng Z., Bourne N., Llewellyn S., Morris D.G., Kenny D., Murphy J., Fitzpatrick R. (2007) “Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow” *Theriogenology* vol. 68s, pp. 232-241



## **STUDY OF ALTERNATIVE FIELD SYSTEMS FOR THE EVALUATION OF TOTAL MIXED RATION PHYSICAL FORM**

### **STUDIO DI SISTEMI ALTERNATIVI DI CAMPO PER LA VALUTAZIONE DELLA STRUTTURA FISICA DELLA RAZIONE**

Righi F.<sup>1</sup>, Rubini P.<sup>2</sup>, Romanelli S.<sup>1</sup>, Renzi M.<sup>1</sup>, Rossi F.<sup>1</sup>, Quarantelli A.<sup>1</sup>

#### **KEY WORDS:**

Total Mixed Ration, physical form, particle size, field evaluation

#### **PAROLE CHIAVE:**

Razione unifeed, forma fisica, dimensione delle particelle, valutazione di campo

#### **ABSTRACT**

Fiber plays a fundamental role in ruminant and dairy cattle nutrition. Fiber requirement has been well characterized for dairy cow and ration are always adjusted for this parameter from a quantitative and qualitative point of view. After the introduction of total mixed ration in farm practice, there has been a growing demand for the possibility of measuring fiber physical characteristics with the aim to maximize productivity and reduce health problems. The Penn State Particle Separator (PSPS) is an instrument used to measure ration physical form but, based on some research, it is not fully accurate in giving information about ration in vivo behavior and dairy performances. Because of this, field measurement of ration physical characteristics is still a challenge for practitioners. Cortal Extrasoy S.p.a. developed some instruments in the attempt to increase the accuracy of on farm ration evaluation: the “Fibrometro”, the “Ruminometro” and the “Densitometro”. Some similarities were found between Fibrometro and PSPS such as between Ruminometro and Densitometro. Fibrometro and PSPS data resulted also related to milk yield. More research are needed to validate the use of these tools for fiber physical form measurement and to establish a relationship between these data and productivity and animal health.

#### **INTRODUCTION**

It has been widely demonstrated that both the amount and physical form of dietary fiber are important in lactating dairy cows ration in order to maintain proper

1 Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti - Sezione di scienza degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Medicina Veterinaria 0521 032624 - Via del Taglio 10, 43100 Parma

2 Tecnico delle Produzioni Animali e Sicurezza degli Alimenti, libero professionista, Mantova

ruminal function (Tafaj et al., 2001; Yang et al., 2002; Teimouri Yansari et al., 2004), animal health status (Sudweeks et al., 1981) and milk composition (Kononoff and Heinrichs, 2003a,b).

One of the most important factors related to fiber physical form is dry matter intake (DMI): when ration is equilibrated and the energy requirement is high, DMI mainly depends upon physical issues. The high energy requirement reduces rumen wall sensibility to distension potentially increasing feed consumption. In these conditions, DMI became limited mainly by passage rate, the latter being closely related to dietary particle size and fiber physical form. Fiber physical form has been in fact demonstrated to affect ruminal stratification, ruminal filling and retention such as ruminal feed degradation and fermentation.

As reported by Teimouri Yansari et al. (2004), an artificial reduction of fibrous particle size lead to an increase of ruminal content density such as fiber hydration rate and functional specific weight, reducing in the same time fiber water holding capacity. These effects are normally obtained by animals through chewing activity and rumination and induce as a consequence the increase of particles passage rate or a reduction of retention time (Woodford and Murphy, 1988). The increased ruminal content turnover lead to an improved DMI. This mechanism is considered advantageous for animal productivity but it can increase the risk of metabolic pathologies such as fatty cow syndrome, abomasal ulcers, acidosis, ruminal paracheratosis, abomasal dislocation, laminitis and milk fat reduction. Indeed, the lack of coarse fiber reduces rumination, ruminal motility and ruminal mucosa integrity (Sudweeks et al., 1981; Woodford and Murphy, 1988). It has been demonstrated that saliva secretion increases during chewing and rumination and that time spent chewing and ruminating is directly related to saliva production (Balch et al., 1955; Poutiainen, 1966; Santini et al., 1983; Kononoff and Heinrichs, 2003a). This means that fiber physical form can also contribute, through its effect in chewing and rumination, to ruminal buffering. This effect on ruminal pH has some consequences on ruminal Volatile Fatty Acid (VFA) production and in particular it affects acetate to propionate ratio and milk fat synthesis. As reported by various authors (Woodford and Murphy, 1988; Kononoff and Heinrichs, 2003a; Teimouri Yansari, 2004), the effect of feed particle size on ruminal pH and on milk fat is more sensible when fiber content is low or under the recommended levels. To meet high producing lactating dairy cattle requirements, relatively high proportions of concentrates are included in the diet. This sometimes lead to a dramatic decrease in ration fiber content. Moreover, in total mixed rations (TMR), forages are often finely chopped and fiber physical effectiveness appears reduced. In farms, it became fundamental to find an equilibrium between DMI (increased when particle size is reduced) and ration security (increased when coarse fiber is a ration component). The need for a cheap, rapid and accurate method for ration field physical form determination for regular use on the farm led to the development of various instruments.

On the base of the standard method for determining the particle size distribution of chopped forages – the standard 424 of the American Society of Agricultural Engineers ( ASAE) -, Kononoff et al. (2003) developed a practical device for the measurement of forages and/or TMR physical form, the New Penn

State Particle Separator (PSPS). Composed of three sieves (Upper: 19.0 mm, Middle: 8.0 mm, Lower: 1.18 mm) and a Bottom pan, the PSPS includes a 1.18 mm screen for the evaluation of physically effective NDF (peNDF) in rations based on Mertens' equation (Mertens, 1997). Optimal ranges of particles distribution, express as a percent of total sample (dry matter and/or as fed) are also provided for silages, haylages and TMR by the same authors. peNDF is at the moment one the most important parameters for the evaluation of the effectiveness of TMR in stimulating chewing activity, increasing ruminal buffering and sustaining milk fat synthesis. The Penn State Particle Separator (PSPS) is an instrument used to perform this measurement but, based on some research, it is not fully accurate in determining peNDF in rations. Because of this, field measurement of peNDF is still a challenge for practitioners. In this work, 3 different instruments developed by Cortal Extrasoy S.p.a. ("Fibrometro", "Ruminometro" and "Densitometro") are tested as predictors of productive parameters and are compared to PSPS as tools to measure particle size distribution and peNDF.

## **MATERIAL AND METHODS**

Fibrometro developed by Cortal Extrasoy S.p.a. is a 5 fraction sieve separator composed of 4 sieves and a bottom pan (sieve 1: 19 mm; sieve 2: 12 mm; sieve 3: 6 mm; sieve 4: 3 mm; bottom pan). Each sieve is 300 mm long, 300 mm wide and 80 mm deep. Fibrometro is used as described by Kononoff et al. (2003) for PSPS. Ruminometro is a 6 liters graduated cylindrical container in which a sample of about 150 g is suspended in water for the evaluation of the floating fraction. Densitometro is a 4 liters cylindrical container in which a sample of TMR is compacted through 10 vertical pushes for the measurement of initial density and density variation.

The study was conducted on a total of 19 dairy farms, ranging from 60 to 200 lactating cows, located in the area of Parmigiano Reggiano cheese production, in which TMR technique was applied. Diet formulation was different between farms but respected the "policy" for Parmigiano Reggiano cheese production. Each farm has been visited once during December 2007 and January 2008. Only the fresh group (30 to 60 days in milk) ration and performances were considered for observations and measurements. At each visit the following data were recorded: (a) average milk yield and milk composition (fat, casein, acidity and urea), on the base of data supplied by the local breeders association laboratory (APA); (b) DMI, estimated on the base of the bulk TMR fed to cows and of theorts relieved in the feed bunk, for the calculation of Feed Conversion Rate (FCR); (c) TMR particle size distribution, calculated for each sieve and for the bottom pan as percent of the initial sample. Particle size was measured using PSPS as described by Kononoff et al. (2003) on three TMR samples of about 500 g, collected in the initial, middle and final portion of the feed bunk; (d) TMR particle size distribution using the "Fibrometro" by Cortal Extrasoy S.p.a.; particle distribution was calculated, as reported for PSPS, for each of the 4 sieves and for the bottom pan as percent of the initial sample (500 g), obtained from 3 subsamples in the initial, middle and final portion of the feed bunk; (e) Floating fraction thickness, using the "Ruminometro" by Cortal Extrasoy S.p.a., measured on

a sample of 150 g mixed in water through 10 vertical movements; (f) TMR initial density and density after compaction by 10 vertical pushes of a sample of 4 dm<sup>3</sup> of TMR, using the “Densitometro”, by Cortal Extrasoy S.p.a. Statistical analysis was conducted using software SPSS version 14.0. Correlations between recorded parameters were evaluated.

## RESULTS AND DISCUSSION

In table 1 and 2 are reported some characteristics of the studied rations. Mean values are considered normal for high producing dairy cows rations in Parmigiano Reggiano area, showing an average F:C ratio of 1.21 and an average NDF of 35.08%. Crude Protein (CP) and Ether Extract ranged from 12.80 to 16.14% and from 3.00 to 4.99% respectively while NSC ranged from 29.32 to 44.00 being Starch about 58% of NSC. Based on PSPS evaluation, particle size distribution showed an high variability among the observed TMR rations, for both Upper, Middle and Lower screens such as for bottom pan. The latter ranged from 16.44 to 49.76% (average 29.03%) while the Upper screen varied from 0.00 to 33.62%. These data are substantially different from data reported by Righi et al. (2007), indicating a very high variability in Parmigiano Reggiano area rations. Productivity of the observed parameters are reported in table 3: all the parameters, including milk yield, were in the range of normality.

**Table 1** – Compositional and chemical rations characteristics (expressed on a DM basis)

	F:C	ASH (%)	NDF (%)	NSC (%)	CP (%)	EE (%)	STARCH (%)
MEAN	1.21 ±	7.50 ±	35.08 ±	38.89 ±	14.54 ±	3.77 ±	22.70 ±
± SD	0.20	0.88	3.02	3.14	1.12	0.55	2.30
MIN.	0.85	5.53	28.41	29.32	12.80	3.00	15.76
MAX	1.50	8.77	43.29	44.00	16.14	4.99	25.58

**Table 2** – Particle size distribution evaluated with Penn State Particle Separator (expressed on a DM basis)

	UPPER (%)	MIDDLE (%)	LOWER (%)	BOTTOM (%)
MEAN ± SD	11.47 ± 9.33	18.92 ± 3.93	40.58 ± 6.43	29.03 ± 9.76
MIN.	0.00	13.32	27.32	16.44
MAX	33.62	27.49	52.39	49.76

**Table 3** – Herds productivity parameters (expressed on a DM basis)

	MILK YIELD (KG)	CASEIN (%)	FAT (%)	ACIDITY (°SH)	MILK UREA (MG/100 ML)
MEAN ± SD	30.61 ± 3.22	2.66 ± 0.07	3.61 ± 0.27	3.36 ± 0.17	23.71 ± 2.90
MIN.	24.00	2.54	3.02	3.05	19.00
MAX	36.00	2.80	4.02	3.73	27.00

In table 3 are shown the relationship between retention capacity of Fibrometro and PSPS screens. Significant and positive correlation were found between PSPS



Upper screen and screen 1 of Fibrometro ( $R=0.785$ ;  $P<0.001$ ) such as between PSPS Middle, Lower and Bottom screens and screens 2 ( $R=0.717$ ;  $P<0.001$ ), 4 ( $R=0.459$ ;  $P<0.048$ ) and 5 ( $R=0.615$ ;  $P<0.005$ ) of Fibrometro respectively. Any relationship was demonstrated for screen n. 3 of Fibrometro which retains particles of intermediate size, mainly represented by Non Forage Fiber Sources and leaf particles, highly digestible and producing acetic acid as fermentation end product.

**Table 3** – Relationship between PSPS and Fibrometro measurements

FIBROMETRO	1	2	3	4	5
PSPS					
UPPER	$R=0.785$ $P<0.000$	$R=-0.277$ $P<0.251$	$R=0.534$ $P<0.019$	$R=-0.118$ $P<0.613$	$R=-0.607$ $P<0.006$
MIDDLE	$R=-0.512$ $P<0.025$	$R=0.717$ $P<0.001$	$R=-0.240$ $P<0.922$	$R=0.153$ $P<0.531$	$R=0.059$ $P<0.810$
LOWER	$R=-0.235$ $P<0.332$	$R=0.399$ $P<0.090$	$R=-0.148$ $P<0.547$	$R=0.459$ $P<0.048$	$R=-0.095$ $P<0.699$
BOTTOM	$R=-0.389$ $P<0.100$	$R=-0.287$ $P<0.233$	$R=-0.403$ $P<0.087$	$R=0.251$ $P<0.300$	$R=0.615$ $P<0.005$

Any significant correlation was found between floating fraction thickness in Ruminometro and Screens retention capacity of PSPS, even if a tendency to a positive relationship between floating fraction and Upper and Middle screens and a tendency to a negative relationship of this parameter with Lower and Bottom retention capacity were observed (Table 4). Initial density measured with Densitometro appeared negatively and significantly ( $R=-0.770$ ;  $P=0.01$ ) related to particles proportion retained in the Upper screen of PSPS, indicating a negative effect of bigger particles on TMR density.

**Table 4** - Relationship between PSPS and Ruminometro measurements

PSPS	UPPER	MIDDLE	LOWER	BOTTOM
RUMINOMETRO				
FLOATING FRACTION THICKNESS	$R=0.098$ $P=0.690$	$R=0.114$ $P=0.643$	$R=-0.029$ $P=0.905$	$R=-0.120$ $P=0.624$

**Table 5** - Relationship between PSPS and Densitometro measurements

PSPS	UPPER	MIDDLE	LOWER	BOTTOM
DENSITOMETRO				
INITIAL DENSITY	$R=-0.770$ $P=0.01$	$R=0.468$ $P=0.046$	$R=0.164$ $P=0.502$	$R=0.439$ $P=0.060$
DENSITY VARIATION	$R=0.013$ $P=0.950$	$R=0.058$ $P=0.814$	$R=0.162$ $P=0.507$	$R=0.071$ $P=0.773$

In Table 6 and 7 the correlations between the ration physical characteristic measured with PSPS, Fibrometro, Ruminometro and Densitometro parameters and the main productivity data observed on the herds are summarised. Particle size

distribution measured with PSPS seems to affect mainly DMI, being bottom particles proportion positively and significantly ( $R=0.604$ ;  $P=0.008$ ) correlated with DMI. Fibrometro particle distribution appeared related with DMI and milk yield (Table 3). In particular, DMI appeared negatively correlated ( $R=-0.607$ ;  $P=0.008$ ) with retention capacity of screen n. 2 of Fibrometro probably indicating a lower passage rate of these particles negatively affecting feed intake. Similar results were obtained by Righi et al. (2007) in analogy with that reported by Kononoff and Heinrichs (2003a,b) which observed a reduction in DMI with increasing TMR particle size. In contrast with this finding is the negative correlation ( $R=-0.485$ ;  $P=0.035$ ) between the proportion of particles retained in the bottom pan of Fibrometro and milk production which was expected to increase together with DMI. Nevertheless, this data is overcome by an increased FCR observed in correspondence with the increase in the proportion of smaller particles retained in the bottom pan of both instruments.

Ruminometro and Densitometro measurements did not show any relationship with both DMI and milk production. Floating fraction thickness measured with Ruminometro was expected to be negatively related to both DMI and Milk production. Floating fraction is in fact composed of low density (lower than 1,2 as reported by Stetter Neel, 1995), bigger size particles introduced in the rumen. These particles stimulates rumination process and have in general a lower passage rate (Welch, 1982 and 1986; Beauchemin, 1991; Grant, 1997), increasing rumen filling and reducing ruminal turnover. The effect of these phenomena is in general a reduction of feed intake and consequently a reduced milk production, the latter being strongly related to DMI (Brown et al., 1977), even if this relationship was not observed in the present study, as previously reported. A significant, negative correlation was observed between floating fraction thickness (Ruminometro) and density variation ( $R=-0.518$ ;  $P<0.023$ ). This demonstrate that the presence of small, high density particles (not floating particles) facilitate ration compaction in the rumen, reducing the filling effect. A similar, even not significant relationship ( $R=-0.317$ ;  $P=0.186$ ) was found between floating fraction thickness and forage ration proportion, indicating the important role of forages in creating the floating fraction. Any effects was observed with regard to feed efficiency.

**Table 6** – Relationship between physical measurements and productive parameters

INSTRUMENT/ PARAMETER	DMI	MILK YIELD	FCR
PSPS			
UPPER	R=-0.002 P=0.995	R=0.446 P=0.055	R=-0.334 P=0.162
MIDDLE	R=-0.456 P=0.057	R=-0.291 P=0.227	R=-0.222 P=0.361
LOWER	R=-0.659 P=0.003	R=-0.282 P=0.243	R=-0.352 P=0.139
BOTTOM	R=0.604 P=0.008	R=-0.124 P=0.613	R=0.641 P=0.003
FIBROMETRO			
1	R=0.021 P=0,934	R=0.681 P=0,001	R=-0.465 P=0.045
2	R=-0.607 P=0,008	R=-0.175 P=0,474	R=-0.442 P=0.058
3	R=0.016 P=0,950	R=0.278 P=0,250	R=-0.236 P=0.331
4	R=-0.11 P=0,664	R=-0.093 P=0,704	R=-0.050 P=0.840
5	R=0.243 P=0,332	R=-0.485 P=0,035	R=0.589 P=0.008
RUMINOMETRO			
FLOATING FRACTION THICKNESS	R=0.038 P=0,882	R=-0.040 P=0,872	R=-0.007 P=0.976
DENSITOMETRO			
INITIAL DENSITY	R=-0.088 P=0.730	R=-0.414 P=0.078	R=0.256 P=0.290
DENSITY VARIATION	R=0.004 P=0.988	R=0.033 P=0.893	R=0.046 P=0.853

Data regarding the relationship between diets measured physical characteristics and milk quality are reported in table 7. Any significative correlation was observed between PSPS particle size distribution and milk quality. Despite some significative relation observed for Fibrometro measurements with acidity and urea in milk and for initial density and milk urea, any clear relationship was found between Fibrometro, Ruminometro and Densitometro data and data regarding milk composition. The trend to have higher fat level in presence of smaller, low density particles reported by Woodford and Murphy (1998) and more recently by Kononoff and Heinrichs (2003b) was respected.

**Table 7** - Relationship between physical measurements and Milk quality

INSTRUMENT/ PARAMETER	CASEIN (%)	FAT (%)	ACIDIY (°SH)	UREA (MG/DL)
PSPS				
UPPER	R=-0.338 P=0.157	R=-0.220 P=0.365	R=-0.176 P=0.471	R=-0.453 P=0.052
MIDDLE	R=0.160 P=0.512	R=0.183 P=0.453	R=0.342 P=0.151	R=-0.131 P=0.593
LOWER	R=0.367 P=0.122	R=0.205 P=0.400	R=-0.251 P=0.300	R=0.125 P=0.611
BOTTOM	R=0.017 P=0.944	R=0.002 P=0.994	R=0.195 P=0.423	R=0.403 P=0.087
FIBROMETRO				
1	R=-0.280 P=0.245	R=0.095 P=0.699	R=-0.342 P=0.152	R=-0.390 P=0.099
2	R=0.243 P=0.316	R=0.189 P=0.437	R=0.542 P=0.016	R=0.071 P=0.774
3	R=-0.433 P=0.064	R=-0.014 P=0.954	R=-0.111 P=0.650	R=-0.752 P=0.000
4	R=0.122 P=0.619	R=0.228 P=0.347	R=-0.599 P=0.007	R=-0.181 P=0.458
5	R=0.220 P=0.365	R=-0.216 P=0.375	R=0.315 P=0.189	R=0.586 P=0.008
RUMINOMETRO				
FLOATING FRACTION	R=0.007 P=0.978	R=0.132 P=0.194	R=-0.197 P=0.418	R=-0.242 P=0.317
DENSITOMETRO				
INITIAL DENSITY	R=0.331 P=0.166	R=-0.035 P=0.887	R=0.350 P=0.142	R=0.537 P=0.018
DENSITY VARIATION	R=-0.436 P=0.062	R=-0.373 P=0.115	R=0.373 P=0.116	R=-0.057 P=0.817

## CONCLUSIONS

The present study was aimed at the evaluation of some alternative systems for the study of TMR ration physical form. Some similarities were observed between PSPS and Fibrometro particle size distribution making it possible to employ both systems for the evaluation of ration physical characteristics. Both devices gave in fact some information regarding intake even if some relationship with productivity is still not explained. Ruminometro data appeared independent from PSPS particle size distribution such as from DMI, Milk yield and Milk quality. Initial density measured with Densitometro showed some relationship with PSPS data but failed to explain totally or partially productive data. PSPS and Fibrometro seems to be the most useful tools for field TMR physical form evaluation.

## REFERENCES

- 1) Balch, C.C., D.A. Balch, S. Bartlett, M.P. Bartrum, V.W. Johnson, S.J. Rowland and J. Turner, 1955. Studies on the secretion of milk of low fat content by cows on diets low in hay and high in concentrates. VI. The effects on the physical and biochemical processes of the reticulo-rumen. *J.Dairy Sci.*, 22:270.
- 2) Beauchemin K.A., 1991a. Ingestion and mastication of feed by dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food animal practice*, 7(2), 439-463.
- 3) Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., Rode, L.M., 2003. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation and milk production. *J.Dairy Sci.* 86:630-643.
- 4) Brown, C.A., Chandler, P.T., Holter, J.B., 1977. Development of predictive equations for milk yield and dry matter intake in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 60:1739-1754.
- 5) Hutjens, 2001. Evaluating Nutritional Management Changes. Proceedings of the 5th Western Dairy Management Conference, Las Vegas, Nevada.
- 6) Grant R. J. 1997. Interactions among forages and nonforage fiber sources. *J. Dairy Sci.* 1997 Jul; 80(7):1438-46.
- 7) Kononoff, P. J., Heinrichs, A. J., Buckmaster, D. R., 2003. Modification of the Penn State Forage and Total Mixed Ration Particle Separator and the Effects of Moisture Content on its Measurements. *J. Dairy Sci.* 86:1858-1863.
- 8) Kononoff P.J. and A.J.Heinrichs, 2003a. The effect of reducing alfalfa haylage particle size on cows in early lactation. *J.Dairy Sci*, 86:1445-1457.
- 9) Kononoff P.J. and A.J.Heinrichs, 2003b. The effect of corn silage particle size and cottonseed hulls on cows in early lactation. *J.Dairy Sci.*, 86:2438-2451.
- 10) Mertens, D.R., 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cattle. *J.Dairy Sci.* 80:1463-1482.
- 11) Poutiainen, E. 1966. The proportion of saliva in the fluid flowing through the reticulo-rumen of the cow. *Ann. Agr. Fenniae*, 5: 342.
- 12) Righi, F., Quarantelli, A., Tonelli L., Renzi, M., Gandolfi, B., 2007. Use of Penn State Particle Separator for the evaluation of total mixed rations typical of Parmigiano Reggiano cheese production area. *Ital.J.Anim.Sci.* Vol. 6 (suppl. 1), 347-349.
- 13) Santini, F.S., A.R. Hardie, N.A. Jorgensen, and M.F. Finner. 1983. Proposed use of adjusted intake based on forage particle length for calculation of roughage indexes. *J.Dairy Sci.*, 66: 811.
- 14) Stetter Neel J.P., E.C. Prigge, and E.C. Townsend, 1995. Influence of moisture content of forage on ruminal functional specific gravity and passage of digesta. *J.Anim. Sci.*, 73: 3094-3102.
- 15) Sudweeks, E.M., Ely, L.O., Mertens, D.R., L.R., Sisk, 1981. Assessing minimum amounts and form of roughages in ruminant diets: roughage value index system. *J.Anim.Sci.* 53(5):1406-1411.
- 16) Swain, S.M. and L.E. Armentano. 1994. Quantitative Evaluation of Fiber from Nonforage Sources Used to Replace Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science*, 77:8.

- 17) Tafaj M., H. Steingrass, W. Drochner, 2001. Influence of hay particle size at different concentrate and feeding levels on digestive processes and feed intake in ruminants. 2. Passage, digestibility and feed intake. Arch. Tierernahr., 54 (3): 243-59.
- 18) Teimouri Yansari A., Valizadeh, R., Naserian, A., Christensen, D.A., Yu, P., Eftekhari Shahroodi, F., 2004. Effects of alfalfa particle size and specific gravity on chewing activity, digestibility, and performances of holstein dairy cows. J.Dairy Sci. 87:3912-3924.
- 19) Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., 2002. Effects of particle size of Alfalfa-Based Dairy cow diets on site and extent of digestion. J.Dairy Sci. 85:1958-1968.
- 20) Welch, J.G.. 1982. Rumination, particle size and passage from the rumen. J. Anim. Sci., 54:885.
- 21) Welch, J.G.. 1986. Physical parameters of fiber affecting passage. J.Dairy Sci., 69:2750.
- 22) Woodford S.T. and M.R. Murphy, 1988. Effect o forage physical form on chewing activity, dry matter intake, and rumen function of dairy cows in early lactation. J.Dairy Sci., 71:674-686.

## **ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DEL COLORE DEL MANTELLO NEL CANE LAGOTTO ROMAGNOLO**

### **ANALYSIS OF THE COAT COLOR DISTRIBUTION IN THE LAGOTTO ROMAGNOLO DOG**

Valentino Beretti, Franca Vaccari Simonini, Chiara Serena Soffiantini, Paola Superchi,  
Alberto Sabbioni

#### **PAROLE CHIAVE:**

colore del mantello, frequenza, morfologia

#### **KEY WORDS:**

coat color, frequency, morphology

#### **RIASSUNTO**

Scopo della presente ricerca è stato quello di valutare la frequenza delle diverse tipologie di colore del mantello nel cane Lagotto Romagnolo e le sue eventuali variazioni osservate in relazione al sesso e all'anno di nascita. Sono stati elaborati i dati del Libro Genealogico del cane Lagotto Romagnolo contenenti le registrazioni di 11233 cani, nati fra il 1990 ed il 2006. E' stata calcolata la frequenza dei diversi tipi di mantello presenti nella razza e successivamente è stato valutato l'effetto dei fattori sesso e classe di anno di nascita, attraverso l'applicazione del test del chi-quadrato. Per quest'ultimo fattore è stata dimostrata una variazione statisticamente significativa della frequenza del colore del mantello. E' stata messa in evidenza una netta diminuzione del mantello bianco sporco unicolore a favore del mantello bianco-arancio.

Tale modificazione potrebbe essere imputata alla variazione nell'impiego prevalente della razza, che nel corso degli ultimi decenni è passato dal riporto acquatico venatorio, alla selezione per la ricerca del tartufo.

#### **SUMMARY**

The aim of the study was to evaluate the frequencies of the different types of coat-color of Lagotto Romagnolo dog and their variations according to sex and year of birth.

11233 records of dogs, born from 1990 and 2006, from Genealogy Book of Lagotto Romagnolo dog have been considered.

The frequencies of the different types of coat color have been calculated and the effect of sex and year of birth have been subsequently evaluated by the use of chi-square test. According to this latter factor, a significant variation of coat-color has been shown: the frequency of white solid color has decreased while white-orange coat has increased.

This variation could depend on the transformation of the use of Lagotto Romagnolo dog through the years: during the last decades the main attitude of this breed changed from water-retriever to truffle dog.

## INTRODUZIONE

Il Lagotto Romagnolo è una razza canina originaria delle pianure di Comacchio e delle zone paludose di Ravenna, nota fin dal 1600 (Morsiani, 1996). Lo standard ufficiale è stato approvato a livello nazionale nel 1991 (ENCI, 2008) e, successivamente, nel 2005 è avvenuto il riconoscimento internazionale (FCI, 2008) con il suo inserimento nel gruppo 8° dei cani da riporto acquatico. Gli allevamenti di questa razza sono diffusi su tutto il territorio nazionale e in diversi Paesi esteri (centro-europei, scandinavi, Gran Bretagna e USA).

Il Lagotto, morfologicamente tipico cane da acqua, di mole medio-piccola, nella costituzione corporea è un leggero mesomorfo, con tronco che tende al quadrato; l'aspetto generale è rustico, fortemente costruito e ben proporzionato, con pelo fitto e ricciuto, a tessitura lanosa.

Il termine "Lagotto" deriva dal dialetto romagnolo "can Lagòt", il nome attribuito dai "vallaroli", i cacciatori delle lagune di Ravenna e Comacchio, al cane comunemente utilizzato nella caccia in acqua e nel riporto. Il suo mantello folto e ricco di sottopelo lo facilitava infatti al lavoro in acqua, anche nelle giornate più rigide. La seconda attività diffusa tra i "vallaroli" era la cerca del tartufo, nella quale il Lagotto si distinse per l'ottimo olfatto e la facile addestrabilità. Il suo pelo fitto ed idrorepellente lo rendeva ideale nella ricerca tra i rovi del sottobosco e nelle spinaie collinari.

Lo standard ufficiale della razza (ENCI, 2008) descrive le caratteristiche ideali del mantello e, in particolare, del colore: i colori ammessi sono il bianco sporco unicolore, il bianco con macchie marrone o arancio, il roano-marrone, il marrone unicolore (nelle diverse tonalità) e l'arancio unicolore. In alcuni soggetti può essere presente una maschera marrone o testa di moro.

Morsiani (1996) aggiunge che in alcuni soggetti si possono avere piedi anteriori e posteriori bianchi (su mantello marrone unicolore o roano-marrone). Tale caratteristica, anche se esteticamente poco gradevole, può essere tollerata, mentre costituisce difetto eliminatorio il pelo non arricciato o tosato a zero e il mantello nero o pezzato di nero.

Nel recente passato da parte del Club degli allevatori del Lagotto Romagnolo sono state proposte azioni volte a promuovere selezioni mirate sugli accoppiamenti, per aumentare la frequenza della colorazione del mantello marrone e bianco-marrone (Grandi, 2002) e, soprattutto, volte a modificare lo standard ufficiale della razza per ammettere la presenza delle focature.



La razza canina Lagotto Romagnolo rappresenta un'importante risorsa genetica autoctona della Regione Emilia-Romagna; il rinnovato interesse dell'opinione pubblica ha spinto i legislatori a promuovere azioni volte alla tutela e alla salvaguardia della biodiversità (Legge Regionale, 22/01/2008), supportando progetti di ricerca finalizzati alla identificazione e caratterizzazione del patrimonio genetico locale. Recentemente queste ricerche hanno portato alla definizione delle caratteristiche morfologiche (Vaccari Simonini et al., 2006) e della struttura genetica della popolazione (Sabbioni et al., 2006); molto rimane ancora da sviluppare per quanto riguarda alcuni aspetti fenotipici (colore e tipologia del mantello), genetici (studio del DNA molecolare) e funzionali (valutazione nelle prove di lavoro per la ricerca del tartufo).

Scopo del presente lavoro è stato quello di esaminare la distribuzione delle diverse colorazioni nel cane Lagotto Romagnolo, cercando di mettere in evidenza eventuali modificazioni significative nella ripartizione delle classi di frequenza legate al sesso ed all'anno di nascita.

## **MATERIALI E METODI**

Sono stati impiegati i dati del libro genealogico della razza canina "Lagotto Romagnolo" forniti dall'ENCI, contenente il pedigree di 12493 cani, nati fra il 1977 ed il 2006 e provenienti da 1043 allevamenti; da questo database iniziale sono stati eliminati i soggetti che non avevano una descrizione del colore del mantello propria e di entrambi i genitori; dopo l'editing il database sottoposto ad elaborazione è stato di 11233 soggetti, di cui 5934 femmine e 5299 maschi, nati fra il 1990 ed il 2006. Le attribuzioni degli animali alle classi di colore sono state effettuate dagli stessi allevatori e recepite dall'organo istituzionale per l'emissione dei certificati genealogici. I dati sono stati sottoposti ad una elaborazione statistica di tipo descrittivo (package SPSS ver. 15.0.1, 2006) al fine di evidenziare la frequenza delle varie colorazioni del mantello riscontrate nella popolazione; successivamente è stata verificata la distribuzione in base al sesso e all'anno di nascita. In quest'ultimo caso gli animali sono stati suddivisi in 3 classi (classe 1: nati tra il 1990 e il 1995; classe 2 nati fra il 1996 ed il 2001; classe 3 nati fra il 2002 ed il 2006). E' stato impiegato il test del chi-quadrato (Pearson, 1914) per evidenziare differenze statisticamente significative nelle frequenze osservate ed attese dei tipi di mantello in base alla variabile sesso e classe di anno di nascita.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Nella tabella 1 sono riportate le frequenze delle colorazioni del mantello rilevate nell'intera popolazione; poiché si tratta di animali iscritti al Libro Genealogico sono state evidentemente riscontrate solo le colorazioni ammesse dallo standard, mentre le colorazioni indesiderate e che quindi rappresentano causa di mancata iscrizione (nero uniforme, mantello pezzato a macchie nere) non sono state rilevate. La distribuzione delle diverse colorazioni del mantello non è risultata omogenea, dal momento che si nota una netta prevalenza dei mantelli macchiati (71,49%) rispetto ai mantelli unicolori (28,51%); in particolare il bianco-marrone rappresenta il colore

più frequente dell'intera popolazione, mentre il mantello arancio unicolore è quello riscontrato in misura minore.

**Tabella 1** Frequenze del colore del mantello nel cane Lagotto Romagnolo.

COLORE	N°	PERCENTUALE
Arancio Unicolore	178	1,58
Bianco-Arancio	2488	22,15
Bianco-Marrone	3982	35,45
Bianco Unicolore	1886	16,80
Marrone Unicolore	1139	10,14
Roano-Marrone	1560	13,88
Totale	11233	100

Nella razza Perro de Agua Espanol, appartenente allo stesso gruppo FCI, Flores et al. (1982) hanno messo in evidenza un rapporto fra mantelli unicolori e pezzati rispettivamente del 63,31% e del 36,61%, rapporto opposto a quello del Lagotto Romagnolo; sempre nella stessa razza spagnola ricerche più recenti (Barba Capote et al., 1995) hanno evidenziato una frequenza ancora maggiore dei mantelli uniformi pari all'81,93% rispetto al 18,07% dei mantelli pezzati.

Nella tabella 2 è riportata la frequenza delle colorazioni in base al sesso; attraverso l'applicazione del test del chi-quadrato è stato possibile mettere in evidenza che le diverse tipologie di mantello non si distribuiscono in modo statisticamente diverso in relazione al sesso.

Nella tabella 3 sono invece riportate le frequenze delle colorazioni del mantello in base all'anno di nascita; appare evidente come questa variabile abbia avuto un impatto statisticamente significativo sulla frequenza delle diverse colorazioni nella popolazione oggetto del presente studio; solamente le colorazioni arancio unicolore e marrone unicolore hanno mantenuto costante la loro frequenza nel corso degli anni. Per le colorazioni che hanno manifestato una variazione statisticamente significativa della frequenza negli anni, è possibile mettere in evidenza che, mentre i mantelli roano-marrone e bianco-marrone hanno avuto un andamento tendenzialmente in aumento, ma con carattere discontinuo, la colorazione bianco-arancio ha mostrato un trend lineare in crescita e la colorazione bianco sporco unicolore una diminuzione.

**Tabella 2** Frequenza dei mantelli nella popolazione suddivisa in base al sesso.

TIPI DI MANTELLO		Femmine	Maschi	Chi-square	P
ARANCIO UNIC.	Osservati n°	97	81	0,10	0,7498
	Attesi n°	94	84		
	Osservati %	1,63	1,53	0,00	0,9651
	Attesi%	1,58	1,59		
BIANCO ARANCIO	Osservati n°	1345	1143	0,78	0,3783
	Attesi n°	1314	1174		
	Osservati %	22,67	21,57	0,01	0,9052
	Attesi%	22,14	22,16		
BIANCO MARRONE	Osservati n°	2117	1865	0,09	0,7704
	Attesi n°	2104	1878		
	Osservati %	35,68	35,20	0,02	0,9012
	Attesi%	34,45	35,44		
BIANCO SPORCO UNIC.	Osservati n°	953	933	1,96	0,1612
	Attesi n°	996	890		
	Osservati %	16,06	17,61	0,03	0,8522
	Attesi%	16,78	16,80		
MARRONE UNIC.	Osservati n°	624	515	0,85	0,3775
	Attesi n°	602	537		
	Osservati %	10,52	9,72	0,02	0,9011
	Attesi%	10,14	10,13		
ROANO MARRONE	Osservati n°	798	762	0,87	0,3515
	Attesi n°	824	736		
	Osservati %	13,45	14,38	0,02	0,9008
	Attesi%	13,89	13,89		
TOTALE	Osservati n°	5934	5299		

Quest'ultima modificazione a nostro avviso può essere interpretata come il risultato di una selezione indiretta operata dagli allevatori; infatti nel recente passato il Lagotto Romagnolo ha progressivamente perso l'attitudine venatoria di cane da riporto acquatico e la selezione si è orientata sulla ricerca del tartufo; in accordo con quanto affermato da Barba Capote et al. (1995) in una razza affine come il Perro de Agua Espanol, l'impiego del cane può influenzare in modo significativo la prevalenza di una colorazione del mantello rispetto ad un'altra. Essi, suddividendo la popolazione in base alla provenienza geografica, hanno infatti evidenziato come nel Perro de Agua Espanol allevato nel nord della Spagna ed impiegato per il riporto acquatico prevalga il mantello bianco, rispetto alla popolazione allevata al sud, im-

piegata prevalentemente come cane da pastore, dove prevale il mantello nero-rosso e marrone-rosso. Essi giustificano il fenomeno come una rispondenza diretta all'impiego dell'animale: nel cane da riporto acquatico il colore bianco garantirebbe una migliore visibilità dell'animale in acqua, mentre il mantello colorato ne favorirebbe il riconoscimento all'interno del gregge di pecore. A nostro avviso quanto da noi messo in evidenza nel cane Lagotto Romagnolo rispecchia questa ipotesi, nel senso che la diminuzione dell'impiego nel riporto acquatico ha contestualmente ridotto l'importanza del mantello bianco uniforme a favore dei mantelli macchiati che mimetizzano l'animale nel sottobosco durante la ricerca del tartufo. Un'altra ipotesi potrebbe però essere avanzata in relazione alle variazioni del colore del mantello riscontrate negli animali: secondo i nostri dati, i mantelli unicolori sono passati dal 33,5% nei soggetti nati tra il 1990 e il 1995 al 24,4% nell'ultima generazione, a fronte di una crescita (dal 66,5% al 75,6%) di quelli pezzati. In altre razze di cani (Cocker Spaniel) è stata notata una riduzione significativa della aggressività in relazione al colore del mantello (Perez-Guisado et al., 2006); in particolare gli animali pezzati risulterebbero meno aggressivi di quelli a mantello uniforme. Se tale ipotesi fosse applicabile al cane Lagotto Romagnolo, l'aumento della frequenza dei pezzati potrebbe essere interpretata anche come una selezione indiretta di soggetti meno aggressivi con l'uomo, quando, dopo il ritrovamento del tartufo, questo viene loro tolto.

**Tabella 3** Frequenza del colore del mantello in base all'anno di nascita nel cane Lagotto Romagnolo.

TIPI DI MANTELLO		CLASSE ANNO DI NASCITA			Totale	Chi-square	P
		1	2	3			
ARANCIO UNICOLORE	Osservati n°	50	67	61	178	0,560	0,756
	Attesi n°	46,0	70,8	61,1	178		
	Osservati %	1,7	1,5	1,6	1,6	0,063	0,969
	Attesi%	1,6	1,6	1,6	1,6		
BIANCO ARANCIO	Osservati n°	541	945	1002	2488	56,412	0,000
	Attesi n°	643,4	990,3	854,3	2488		
	Osservati %	18,6	21,1	26,0	22,1	6,347	0,042
	Attesi%	21,9	21,9	21,9	21,9		
BIANCO MARRONE	Osservati n°	1095	1538	1349	3982	8,927	0,012
	Attesi n°	1029,8	1584,9	1367,3	3982		
	Osservati %	37,7	34,4	35,0	35,4	0,855	0,652
	Attesi%	35,7	35,7	35,7	35,7		
BIANCO SPORCO UNICOLORE	Osservati n°	645	743	498	1886	102,550	0,000
	Attesi n°	487,7	750,7	647,6	1886		
	Osservati %	22,2	16,6	12,9	16,8	12,594	0,002
	Attesi%	17,2	17,2	17,2	17,2		
MARRONE UNICOLORE	Osservati n°	277	481	381	1139	3,332	0,189
	Attesi n°	294,6	453,3	391,1	1139		
	Osservati %	9,5	10,8	9,9	10,1	0,436	0,804
	Attesi%	10,1	10,1	10,1	10,1		
ROANO MARRONE	Osservati n°	297	697	566	1560	45,433	0,000
	Attesi n°	403,4	620,9	535,6	1560		
	Osservati %	10,2	15,6	14,7	13,9	6,621	0,036
	Attesi%	13,5	13,5	13,5	13,5		
Totale		2905	4471	3857	11233		

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha voluto approfondire la distribuzione del colore del mantello nella razza canina Lagotto Romagnolo. Prendendo in considerazione l'intero database storico dell'ENCI è stato possibile caratterizzare questo aspetto morfologico valutandone la situazione attuale ma anche l'andamento nel corso del tempo. E' stata evidenziata una netta prevalenza dei mantelli pezzati sui mantelli uniformi che si è sempre più rafforzata nel corso degli anni; in particolare è emerso che la colorazione bianco uniforme ha manifestato una costante diminuzione della frequenza nella

popolazione a favore del mantello bianco-arancio. A nostro avviso le modificazioni osservate sono imputabili, in buona parte, all'impiego prevalente della razza negli ultimi anni; il Lagotto Romagnolo infatti, se ora si può considerare l'unica razza selezionata esclusivamente per la ricerca del tartufo, in passato era un eccellente cane da caccia specializzato nel riporto acquatico. La razza quindi ha subito un'intensa selezione volta ad eliminare l'istinto venatorio, indirizzando le qualità olfattive solo ed esclusivamente alla ricerca del tartufo; in accordo con quanto riportato da altri Autori, riteniamo che l'impiego prevalente della razza possa aver influenzato contestualmente ed in modo significativo la frequenza delle colorazioni del mantello. Nel caso del Lagotto il mantello bianco unicolore, molto funzionale nel lavoro del riporto acquatico, perderebbe la sua importanza nell'odierna destinazione della razza. Anche la probabile minore aggressività dei soggetti pezzati potrebbe in parte spiegare le variazioni riscontrate.

La ricerca si deve considerare come parte integrante di un progetto più ampio che, partendo dalle caratteristiche morfologiche e genetiche della popolazione del cane Lagotto Romagnolo, ha lo scopo di giungere ad una sua valorizzazione, legata allo sviluppo della attitudine alla ricerca del tartufo.

Ricerca eseguita con un contributo della Regione Emilia-Romagna. Si ringrazia il Club Italiano del Lagotto Romagnolo (nella persona del Dott. Morsiani G.) e L'E.N.C.I. per la disponibilità fornita.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Barba Capote C.J., Delgado Bermejo J.V., Herrera Garcia M. (1995) - Analysis of the coat color variability in the Spanish Water Dog. Arch. Zootec., 44, 403-409.
- 2) FCI (2008) indirizzo homepage: <http://www.fci.be>
- 3) Flores Alés A. J., García Martínez J.V., Aranda Casas, R. J. (1982) Contribución al estudio de algunos caracteres étnicos del perro turco andaluz. I Symposium Nacional de las Razas Caninas Españolas, Vol. I, pag. 63-80 Universidad de Córdoba. Marzo 1982.
- 4) Grandi G. (2002) Note sul colore del Lagotto Romagnolo ed aggiornamento dello Standard, [www.lagottoromagnolo.org](http://www.lagottoromagnolo.org)
- 5) Morsiani G. (1996) Il Lagotto Romagnolo. Mursia editore, Milano
- 6) ENCI (2008) indirizzo homepage: <http://www.enci.it>
- 7) Pearson K.: (1914) - Tables for statisticians and biometricians. Cambridge University Press
- 8) Perez-Guisado J., Lopez-Rodriguez R., Munoz-Serrano A. (2006): Heritability of dominant-aggressive behaviour in English Cocker Spaniels. Applied Animal Behaviour Science, 100, 219-227.
- 9) LEGGE SULLA TUTELA DEL PATRIMONIO DI RAZZE E VARIETA' LOCALI DI INTERESSE AGRARIO DEL TERRITORIO EMILIANO-ROMAGNOLO (2008):[http://www.regione.emiliaromagna.it/wcm/ERMES/notizie/news/2008/gen/biodiversita\\_legge.htm](http://www.regione.emiliaromagna.it/wcm/ERMES/notizie/news/2008/gen/biodiversita_legge.htm)

- 10) Sabbioni A., Beretti V., Vaccari Simonini F. (2007) - Demographic parameters, genetic variability and structure of the population in “Lagotto Romagnolo” dog breed Proc. 61th SISVET Congress, 409-410.
- 11) SPSS (2006): Ver. 15.0.1 Base Manual. SPSS Inc., Chicago, IL, USA.
- 12) Vaccari Simonini F., Beretti V., Sabbioni A., (2007) - Morphologic characteristics of “Lagotto Romagnolo” dog breed Proc. 61th SISVET Congress, 411-412.





## **SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA DOLCIARIA IN DIETE PER SCROFE IN LATTAZIONE**

### **BAKERY WASTES IN SOWS LACTATION DIETS**

Superchi Paola, Barbera Elisabetta, Beretti Valentino, Gatti Lina, Sabbioni Alberto <sup>1</sup>

#### **PAROLE CHIAVE**

Scrofe - lattazione – sottoprodotti industria dolciaria

#### **KEY WORDS**

Sows – lactation – bakery wastes

#### **RIASSUNTO**

Scopo dell'indagine è stato quello di verificare gli effetti dei sottoprodotti dell'industria dolciaria sulle performance delle scrofe in lattazione.

24 scrofe ibride Hermitage hanno ricevuto nel corso della lattazione (20,08±2,81 d), un mangime completo, somministrato *ad libitum*, al quale è stato aggiunto (gruppo T) o non (gruppo C) la farina di biscotto alla dose di impiego del 15%.

L'introduzione della f. di biscotti non ha migliorato, a differenza di quanto riportato in bibliografia, l'appetibilità del mangime tanto è vero che le scrofe così trattate hanno denunciato un consumo volontario medio giornaliero, rispetto a quelle di controllo, inferiore del 10%, senza, per questo, andare incontro ad un peggioramento delle performance produttive e riproduttive.

#### **ABSTRACT**

The aim of this work was to verify the effect of bakery waste on the performance of lactating sows.

During the lactation period (days 20,08 ± 2,81), 24 Hermitage sows received a diet to which bakery waste was added at a dose of 15% (group T) or not (group C); rations were given *ad libitum* and were formulated in order to meet energy and protein requirements.

The introduction of bakery waste didn't improve the palatability of the feed, despite what has been reported in the bibliography, so much so that the voluntary feed intake of the treated sows was 10% lower than that of the control group. Neverthe-

---

<sup>1</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti-Università degli Studi di Parma. Via del Taglio,10. +39 0521/032618. paola.superchi@unipr.it

less, productive performance of the treated sows were not different from those of the control group.

## INTRODUCTION

In the last few decades sows' precocity and prolificacy have been remarkably increased and at the same time sow milk production has changed from 4 kg (1) to more than 8 kg per day (2÷4).

However, the conjoint introduction to the market of sows with low fat reserves has increased the risks related to nutritional deficit, which become clear with productivity increase (5,6).

The relationship between nutritional status and reproductive efficiency has gotten more delicate. The physiologic mechanisms that explain the relations between nutrition and reproduction are not completely known, but the joining element seems to be the different factors that regulate the animal metabolic status and the plasmatic concentration of some substrates such as hormones or neurotransmitters (7).

During lactation, although sows are fed *ad libitum*, very often they don't eat sufficient food to compensate the high requests for milk production (6).

The effects of underfeeding during lactation may lead, in the short term, to a longer weaning to estrus interval (8,9) whilst in the long term they may reduce sows longevity (10).

The production of energetic substrates in sows, glucose in particular, depends very much on the energy intake from food and, similarly, on the sources of energy used.

A diet rich in starch, compared to an isoenergetic diet rich in lipids in the lactating sows, determines a higher glucose and insulin postprandial peak and an increase in LH pulse frequency (11).

The correct food management in the lactating sows, therefore, must meet the nutritional contribution of single principles without neglecting the healthiness and palatability of raw materials.

In the lactating sow's diet the energetic contribution is generally given by cereals but the cereal's price has reached the highest value in the last decade. Moreover the FAO's report, Food Outlook (Roma, 13<sup>th</sup> February 2008) estimates that cereal's price will also remain high for this year.

A food source that could be enhanced as an animal feed, also being an additional means in order to decrease the costs related to energising feed purchasing, is biscuit flour.

It has been estimated that in Italy the annual amount of bakery waste is about 110000-130000 tons per year, of which 70% is produced in Northern Italy (12).

The chemical-nutritive value of bakery wastes is a function of the product of origin (table 1). A high variability can affect the content of starch and sugar, fat and cellulose.

**Table 1** – Chemical - nutritive value (as fed basis, %)

DRY MATTER	88.00
CP	9.5-10.4
FAT	9.0-13.0
CELLULOSE	1.5-4.0
ASH	2.5-3.5
STARCH	31.0-53.0
SUCROSE	10.0-27.0
LINOLEIC ACID	1.9-4.2

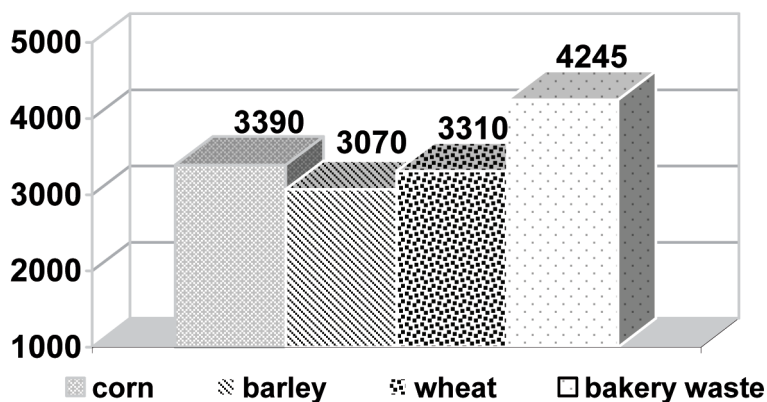
(Cevolani -12)

Fats are composed primarily of long chain saturated fatty acids (palmitic, 26.77%; stearic, 8.09%) and monounsaturated (oleic, 43.64%) as the amount of linoleic acid is generally low.

Their energy value, compared to that from the main cereals (figure 1), is 25-38% higher (13).

Cevolani et al. (13) observed that using about 15-20 % of the ration from bakery waste, increases dry matter intake of the lactating sows. The effects are particularly evident in the Summer, when the high temperatures in the farrowing room make it more difficult to achieve the energy requirements.

The aim of this study has been to verify if the use of bakery waste can improve the sow's energy balance at the end of lactation, enhancing the cyclic activity.

**Fig. 1** – Energy value bakery waste and the main cereals surces (kcal/kg ED)

## MATERIALS AND METHODS

The trial was carried out in a pig farm and involved hybrid Hermitage sows. During pregnancy the sows have been raised in multiple boxes (11 sows per box)

and fed with a diet consisting of 25% commercial feed (27.2% PG), 30% corn meal, 23% barley meal and 22% soft wheat bran. The diet was given in increasing doses, from 1 (at the beginning of the pregnancy) to 3 kg per sow per day (at the end of the pregnancy).

One week before the expected date of farrowing, 24 sows have been equally divided into two groups and put into contiguous farrowing rooms.

The sows parity number has been  $5.08 \pm 2.11$  (group C ) and  $4.00 \pm 2.88$  (group T).

During the lactation period ( $20.08 \text{ d} \pm 2.81$ ) the sows received a complete pelleted feed formulated in order to meet the energy and protein requirements. Sows in group T received the feed with 15% of bakery waste, as the group C received the feed without bakery waste (table 2).The ration have been given to both groups *ad libitum*.

The nutritional status evaluation in the sows, at farrowing and at weaning, was based on visual analysis of the body condition score (BCS) on a scale from 1 to 5 (1= very thin; 5= very fat).

Backfat thickness (P2) of the sows was measured by ultrasound (Lean-meter, Renco Corporation, Minneapolis, MN).

During lactation the voluntary daily feed intake per sow was determined from the difference between the weight of the ration, given once a day, and the weight of the residuals after 24 hours. Water was always available *ad libitum* during the lactation period.

To estimate if the bakery waste presence in the feed could influence the digestive process, the faecal score has been evaluated daily using a scale from 1 to 5 (1=liquid faeces; 5= dry faeces).

The reproductive efficiency has been estimated by measuring the weaning to estrus interval and the weaning to conception interval. The pregnancy control has been made on d 21 after insemination using an ultrasonograph of 3,5 Mhz (CTS 200 Plus Probe – Medica BO, Italy).

The farrowing room temperature was kept at 23° C and each crate was supplied with a heat lamp for piglets.

**Table 2** – Composition (%) and chemical analysis of diets (as-fed basis, %).

	GROUP C	GROUP T
CORN MEAL	28	26
BAKERY WASTE	----	15
BARLEY MEAL	20	12
SOYBEAN MEAL	18	18
WHEAT BRAN	10	8
WHEAT FLOUR MIDDINGS	7	7
SOYA BEAN HULLS	5	4
SOYA OIL	4.5	2.5
DRIED BEET PULPS	3	3
CALCIUM CARBONATE	2	2
DICALCIUM PHOSPHATE	1	1
SODIUM CHLORIDE	0.7	0.7
PREMIX	0.5	0.5
L-LYSINE	0.3	0.3
<hr/>		
DRY MATTER	87.12	87.12
CP	16.58	16.31
FAT	3.98	4.65
CELLULOSE	6.30	6.20
ASH	5.13	5.80
LYSINE	0.80	0.80
STARCH	29.31	29.35
ED Kcal/kg	3199	3242

The number of piglets born alive, stillborn, died in the first 24 hours and during lactation were registered. The litters were balanced within 24 hours and were weighed on d 5 postpartum and at weaning (d 21). From d 9 the piglets have been given creep feed whose consumption has been checked every day.

The recorded data have been submitted to ANOVA (SPSS 14.0) using the group as fixed factor and the farrowing order in linear and quadratic form as a covariate.

Also the number of piglets weaned and their weaning weight have been covaried, respectively, with the number of piglets born alive and their weight at 5d.

## RESULTS

Regardless of which group they belonged to, during the period of the experiment, the sows didn't shown any metabolic trouble related to the use of bakery waste and the faecal score has been equal to 3 for all the sows.

When the sows went into the farrowing room their average backfat thickness was on average 14.71 mm, a lower value compared to that considered ideal (19-20 mm) for this productive phase (table 3) by Dourmad et al. (14).

The catabolic process was very similar between the two groups ( $P>0.05$ ) and in any case it was very low; backfat thickness decreased on average 1.50 mm during 21 days.

**Table 3** – Sows body condition

		GROUP C	GROUP T	RSE
BACKFAT THICKNESS (P2):				
- AT FARROWING	mm	13.72	15.70	2.68
- AT WEANING	mm	13.15	13.27	0.78
$\Delta$ P2	mm	1.42	1.58	0.84
BCS:				
- AT FARROWING		2.33	2.88	0.45
- AT WEANING		2.35	2.45	0.18

According to Hultén et al. (15), the reduced lipolysis observed in thin sows compared to fat sows is due to the different nature of the energy used for productive aims, derived as in our case, by a more efficient use of the feed, and not by a greater use of lipidic reserves.

The groups didn't show any significant difference ( $P>0.05$ ) related to the number of piglets at birth and at weaning (table 4).

The significant difference related to the higher mean weight of piglets at d 5 ( $P<0.05$ ) in the control group was nullified during weaning.

**Table 4** - Sows reproductive parameters

		GROUP C	GROUP T	RSE
PIGLETS:				
BORN ALIVE	n.	11.54	10.54	3.11
STLLBORN	n.	1.04	1.30	1.89
DEAD WITHIN 24 h	n.	0.58	0.59	0.85
WEANED	n.	9.36	9.39	1.17
WEIGHT AT d 5	kg	2.51b	2.02a	0.41
WEIGHT AT d 21	kg	5.30	4.63	0.76
ADG 5-21 d	g	0.25	0.23	0.03
MILK PROD.	g/piglet/ d	809	738	65.63

a,b different for  $P<0.05$

It is possible to assume that sows of the group T, despite a not significant ( $P>0.05$ ) lower milk production compared to group C, have produced a richer and more nutritional milk that allowed their piglets to recover the weight loss in the first days of life.

Also for the reproductive parameters (table 5) significant differences between groups have not been registered ( $P > 0.05$ ). The parameters must be considered ideal, especially if we consider the low fat condition of the sows at farrowing, an element that is recognised by many Authors as a risk factor for the recovery of the cyclic activity after lactation.

**Table 5** - Sows reproductive parameters

		GROUP C	GROUP T	RSE
WEANING TO ESTRUS INTERVAL	d	4.98	4.84	0.34
WEANING TO CONCEPTION INTERVAL	d	7.94	5.15	6.77

The close relationship between sow's nutritional status and their performance has been verified by various studies (15÷18).

The selection objectives of the hybrid sows used in this experiment have clearly been successful in increasing the production of lean meat without penalizing the sows reproductive efficiency.

Despite the differences were not significant ( $P > 0.05$ ) it is interesting to observe that in the sows fed with bakery waste the unproductive days have decreased more than 2.5 days.

During lactation the average voluntary daily feed intake (table 6) was higher at 11.30% ( $P < 0.05$ ) for sows in the control group but it has not lead to a milk production advantage.

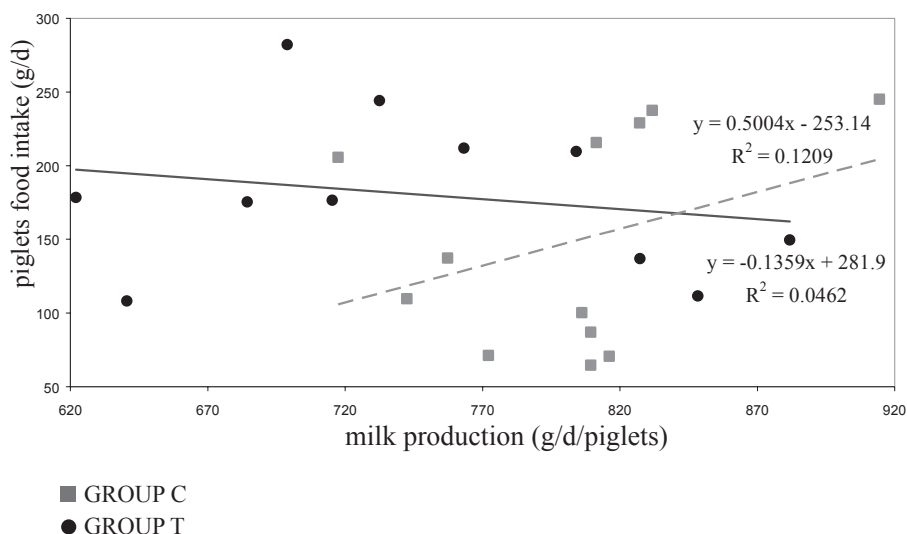
Table 6- Voluntary daily intake for sows and piglets during lactation

		GROUP C	GROUP T	RSE
SOWS FEED INTAKE	kg	6.50b	5.84a	0.49
PIGLETS FEED INTAKE	g	155.92	171.51	0.78

a,b different for  $P < 0.05$

The average voluntary daily feed intake of the piglets during lactation was not significant ( $P > 0.05$ ). In order to understand why the piglets born from sows in group C were not able to consolidate during lactation their weight advantage ( $P < 0.05$ ), recorded at d 5, compared to the piglets born from sows in group T, we have put into relation sows milk production and the piglets feed intake (figure 2).

Figure 2- Relationship between sows milk production and piglets feed intake



It is clear that as for the piglets born from sows of C group there is a direct and positive relation between the parameters, for the piglets born from sows of T group a larger availability of milk corresponds to a reduction of feed intake.

This would enforce the hypothesis that the sows fed with bakery waste produced a more nutritional milk that allowed their piglets to recover the weight difference recorded at d 5 *postpartum*.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

In the feeding of pigs, typical monogastric omnivorous, the use of alternative feed other than from the usual sources of protein and energy, has always been an interesting topic thanks to the possibility of decreasing production costs.

However, for any new product available on the market it is necessary to obtain a series of data useful to assure a suitable dietary use and farm management before introducing the product into the feed formula.

First of all, it is essential to acquire a detailed knowledge of the products nutritional characteristics in order to carry out targeted substitutions without neglecting the palatability that could have a positive or negative effect on daily voluntary feed intake.

Then it is necessary to be sure that the commercial availability of the product is assured in time and that during conservation degradation does not occur that could modify the characteristics of the product.

An interesting, though partial, substitute to the common ingredients used in pigs feed preparation, especially cereals, is bakery waste that are left over during from processing or that for many reasons are not being commercialised anymore.



Food industry waste is collected through a system that follows the HACCP rules of the factory, therefore these products are interesting from a health and safety point of view and, at the same time, have prestigious chemical composition and nutritional values.

The high palatability, one of the strong points of these products and one of the reasons for using them when feeding lactating sows, did not allow in the current study the increase of voluntary feed intake which is the main objective, in order to allow the lactating to face the negative energy balance that always occurs in this phase and to the piglets to get to the weaning stage with the right physiologic maturity and weight.

Further studies should be carried out in order to verify if bakery waste can influence milk nutritional value and, therefore, whether it backs up the proposed hypothesis that justifies the weight recovery registered during lactation in the piglets born from sows fed with bakery waste.

In conclusion, bakery by-products may be used in feeding pigs, as a partial substitute for other food sources especially when other food have unfavourable market prices.

#### LITERATURE CITED

- 1) Boomgaardt J., Baker D.H., Jensen A.H., Harmon B.G. (1972) – Effect of dietary lysine levels on 21-day lactation performance of first-litter sows. *J. Anim. Sci.*, 34, 408-413.
- 2) Johnston L.J., Pettigrew J.E., Rust J.W. (1993) – Response of maternal-line sows to dietary protein concentration during lactation. *J. Anim. Sci.*, 71, 2151-2160.
- 3) Mackenzie D.D.S., Revell K.D. (1998) – Genetic influences on milk quantity. In: *In: Verstegen M.W.A., Moughan P.J. and Schrama J.W. (Eds.) The lactating sow. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.*
- 4) Quesnel H. (2005) - Etat nutritionnel et reproduction chez la truie allaitante. *INRA Prod. Anim.* 18, 4, 277-286.
- 5) Quesnel H., Prunier A. (1995) - L'ovulation après le tarissement des truies: mécanismes physiologiques et facteurs de variation. *INRA Prod. Anim.*, 8, 165-174.
- 6) Quiniou N., Dourmad J.Y., Noblet J. (1998) – Facteurs de variation de l'appétit des truies en lactation. *INRA Prod. Anim.*, 11, 247-249.
- 7) Booth P.J. (1989) - Influenze metaboliche sulla funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio nel maiale. *Atti Convegno "Riproduzione nella specie suina"*. Bologna, 17 aprile, 101-109.
- 8) Aherne F., Kirkwood R.N. (1985) - Nutrition and sow prolificacy. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.33, 169-178.
- 9) Zak L.J., Cosgrove J.R., Aherne F.X., Foxcroft G.R. (1997) - Pattern of feed intake and associated metabolic and endocrine changes differentially affect post-weaning fertility in primiparous lactating sows. *J. Anim. Sci.*, 75, 208-217.
- 10) Dourmad J.Y., Etienne M., Noblet J. (1998) – Alimentation et gestion des

- réserves corporelles de la truie: conséquences sur sa longévité. *INRA Prod. Anim.*, 11, 245-251.
- 11) van den Brand H., Dieleman S.J., Soede N.M., Kemp B. (2000) – Dietary energy source at two feeding levels during lactation of primiparous sows. I. Effect on glucose, insulin, and LH and on follicle development, weaning-to-oestrus-interval and ovulation rate. *J. Anim. Sci.*, 78, 396-404.
  - 12) Cevolani D. (2004) – Prontuario degli alimenti per il suino. Edizioni Agricole de Il Sole 24 ore. Edagricole s.r.l., Bologna, pp.449.
  - 13) Cevolani D., Massa V., Rizzi M. (2007) – Biscotti nella razione di scrofe e suinetti. *Suinicoltura*, 48, 9, 54-58.
  - 14) Dourmad Y.J., Etienne M., Noblet J. (2001). Mesurer l'épaisseur de lard dorsal des truies pour définir leurs programmes alimentaires. *INRA Prod. Anim.*, 14, 41–50.
  - 15) Hultén F., Valros A., Rundgren M., Einarsson S. (2002) – Reproductive endocrinology and postweaning performance in the multiparous sow. Part.1. Influence of metabolic status during lactation. *Theriogenology*, 58, 1503-1517.
  - 16) van der Peet-Schwering C.M.M, Swinkels J.W.G.M., den Hartog L.A. (1998)- Nutritional strategy and reproduction. In:Verstegen M.W.A., Moughan P.J. and Schrama J.W. *The lactating sow*. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.
  - 17) Mullan B.P., Williams I.H. (1989). The effect of body reserves at farrowing on the reproductive performance of first litter sows. *Anim. Prod.*, 48, 449-457.
  - 18) Maes D.G.D., Janssens G.P.J., Delputte P., Lammertyn A., de Kruif A. (2004). Back fat measurements in sows from three commercial pig herds: relationship with reproductive efficiency and correlation with visual body condition scores. *Livest. Prod. Sci.*, 91, 57-67.

## **CHEESE YIELD: FACTORS OF VARIATION AND PREDICTIVE FORMULAS. A REVIEW FOCUSED PARTICULARLY ON GRANA TYPE CHEESES**

### **LA RESA IN FORMAGGIO: FATTORI DI VARIAZIONE E FORMULE DI PREVISIONE. UNA RASSEGNA RIFERITA IN PARTICOLARE AI FORMAGGI TIPO GRANA**

Formaggioni Paolo\*, Summer Andrea, Franceschi Piero,  
Malacarne Massimo, Mariani Primo

#### **KEY WORDS:**

Cheese yield, factors of variation, predictive formulas, Grana type cheeses.

#### **PAROLE CHIAVE:**

Resa in formaggio, fattori di variazione, formule di previsione, formaggi tipo Grana.

#### **RIASSUNTO**

Si definisce resa casearia la quantità di formaggio espressa in chilogrammi che si ricava da 100 kg di latte. Si tratta di un parametro di notevole importanza: maggiore è la percentuale di solidi recuperata, maggiore è la quantità di formaggio ottenuta e quindi il guadagno in termini economici. Nel processo caseario, pertanto, risulta fondamentale il massimo recupero possibile di sostanze del latte nella cagliata. La letteratura in materia di resa è vasta: accanto ad articoli di carattere generale, vere e proprie rassegne sulla resa, in cui vengono soprattutto prese in esame considerazioni teoriche sul trasferimento delle varie componenti del latte al formaggio con particolare riferimento al grasso e alle diverse frazioni azotate, vi sono altri contributi che esaminano esclusivamente l'influenza esercitata dai contenuti di grasso e di proteina (o caseina); altri ancora rivolgono l'attenzione all'influenza dei fattori fisiologici e del contenuto delle cellule somatiche.

Nella prima parte di questa rassegna saranno descritti alcuni di questi contributi, focalizzando l'attenzione sui principali fattori di variazione della resa.

Nella seconda parte, invece, verranno analizzate e descritte le principali strategie di approccio per elaborare formule di previsione della resa. Sono state, infatti, proposte diverse formule di previsione (o di predizione) della resa; alcune basano i loro calcoli sulle caratteristiche chimiche del latte, altre su formule statistiche con coefficienti ricavati da un elevato numero di prove di caseificazione. Al termine della

---

\* paolo.formaggioni@unipr.it Sezione di Scienza e Tecnologie Lattiero Casearie. Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi di Parma, Via del Taglio 10, 43100 Parma.

trattazione è presente un prospetto riassuntivo con alcune delle formule di previsione della resa riportate in letteratura.

## **ABSTRACT**

Cheese yield is defined as the amount of cheese, expressed in kilograms, obtained from 100 kg of milk. It is a very important parameter: the higher the recovered percentage of solids, the greater the amount of cheese obtained and therefore gain in economic terms. In the cheesemaking process, therefore, it is very important to obtain the maximum possible recovery of substances from milk. The literature on this matter is immense: next to articles of a more general character, real reviews on yield, in which theoretical considerations on the transfer of the various components from milk to cheese are investigated – with particular reference to fat and to nitrogen fractions – there are other papers that focus their attention only on the effects exercised by fat and protein (or casein); other authors study in particular the effects of physiological factors and somatic cell count. There are also some experimental contributions devoted to the elaboration of predictive formulas of yield for the various cheese productions, often using completely different parameters and approaches of calculation. In the first part of this review some of these contributions will be described, focusing attention on the main factors of variation of cheese yield. In the second part, instead, the main strategies of approach in order to elaborate formulas of prediction of cheese yield will be analysed and described. Various formulas of prediction of the cheese yield have been proposed: some of them base their calculations on the chemical characteristic of milk, others on statistical formulas with coefficients calculated from a high number of cheesemaking trials. At the end of the paper there is a final prospect with some of the yield predictive formulas present in literature.

## **INTRODUCTION**

Cheese yield is defined as the amount of cheese, expressed in kilograms, obtained from 100 kg of milk. It is a very important parameter: the higher the recovered percentage of solids, the greater is the amount of cheese obtained and therefore gain in economic terms. In the cheesemaking process, therefore, it is very important to obtain the maximum possible recovery of substances from milk.

It is, therefore, obvious how wide it is to elaborate a rapid method that allows for an estimate, before transformation, of the final cheese yield on the basis of the composition of the raw material, in order to make a comparison between the forecast yield and the actual one: this would allow the cheesemaker to have a constant check on the efficiency of operations, and to estimate the influence that some technological strategies can exercise on the entire process of cheesemaking.

Equally important is the calculation of the effects that each milk component, and, in particular, fat and casein, can have on cheese yield, in order to adopt a milk quality payment system that could remunerate each parameter for its actual value.

The literature on this matter is wide: next to articles of a more general character, real reviews on the yield, in which theoretical considerations on the transfer

of the various components from milk to cheese are investigated (with particular reference to fat and to nitrogen fractions); there are other papers that focus their attention only on the effects of fat and protein (or casein); other authors study in particular the effects of physiological factors and somatic cell count. There are also some experimental contributions devoted to elaborating predictive formulas of yield for the various cheese productions, often using completely different parameters and approaches of calculation.

## **PART 1: CHEESE YIELD AND FACTORS OF VARIATION**

### **Reviews and monographs on cheese yield**

Lelievre et al. [1] analyse the factors that contribute to the determination of cheese yield, adopting the principle of the mass balance: in practice, the weight of the finished product is constituted by the sum of the weight of the fat, moisture and the not-fat dry matter of the cheese. The weight of the fat in the cheese is calculated as the weight of the fat contained in milk less the weight of the fat that is lost in the whey; while the not-fat dry matter is constituted mainly of casein and partially of the mineral components. The authors [1] consider the contribution of other components, such as lactose and whey proteins to be negligible; through an opportune equation the authors make a relation between the not-fat dry matter of the cheese and the casein content of the milk, then suggest a cheese yield formula that considers the contributions of fat and casein of the milk.

Gilles and Lawrence [2] study the effect of casein and fat on cheese yield: the moisture factor is mainly related to the casein content, because this component manifests a greater capacity to absorb water, thus increasing its weight. A fat increase tends to lower the rate of curd syneresis and, therefore, to increase whey retention; consequently, the fat also contributes to determine the cheese yield for a quota that is relatively greater than that corresponding to its own weight.

Lawrence [3] characterises and analyses the factors that can mainly affect the composition of the milk and, consequently, the cheese yield: breed, variability between individuals, stage of lactation, seasonal variations, feeding factors, age of the cow, mastitis, *etc.*

Callanan [4] describes in detail the recovery of milk substances, focusing its study particularly on protein, fat, “particles of curd”, dry matter of the whey starter and minerals, and, furthermore, on the influence of the cheesemaking process towards the recovery of the specific constituents; in conclusion, he describes the strategies to carry out in order to optimise cheese yields. This experimental work [4] is part of a monograph on the cheese yield published by the FIL-IDF (International Dairy Federation) [5] in which the different aspects concerning cheese yield and the factors that can influence it are reviewed. Another monograph, also published by the FIL-IDF (International Dairy Federation) [6], consists of the Proceedings of the Seminar “Cheese yield and factors affecting its control” (Cork).

The review of Lucey and Kelly [7] diffusely describes different aspects related to cheese yield: characteristics of the milk (contents of protein and fat, genetic variants of proteins, somatic cells), cheesemaking conditions (incorporation of whey

proteins in the curd, homogenisation of the fat, type of coagulant, use of different starters, curd firmness, typology of vat, treatment of the curd). The authors [7] also consider different predictive formulas for determine cheese yield and strategies in order to minimise cheesemaking losses.

The review of van Boekel [8] regards the transfer of the components from milk to cheese: the author considers mainly the protein, estimating the amount of each single protein fraction that is retained in the curd and that is lost in the whey and suggests more accurate methods for the determination of the paracasein. The author [8] considers the phenomenon of the steric exclusion: the hydration water that is around the casein micelles is not available for the solubilisation of molecules, because the steric dimensions of the latter do not allow them to approach the casein micelles. This phenomenon determines that the concentration of some fractions (particularly whey proteins) is incorrect. To correct for the volume of fat and protein and for non-solvent water, a factor F must be applied to the concentration of each solute in the whey in order to obtain its concentration in milk; this factor F is different for each solute and depending on its molecular weight. The interest of the author [8] is focused on the destiny of proteose-peptones. In a specific paper, van Boekel and Crijs [9] found that, while in the acid coagulation at pH 4.6 all proteose-peptones are lost in the whey, in the rennet coagulation three quarters of them, that are PP5 and PP8, are retained in the curd, contributing to increase the cheese yield.

Van den Berg et al. [10] analyse some aspects of the review of van Boekel [8], about the transfer of the various components from milk to cheese, focusing mainly on cheesemaking technology and the treatments which milk undergoes, such as termisation, bactofugation, pasteurisation, enzyme addition, denaturation of the whey proteins, addition of whey starter and calcium chloride, and the influence that all these aspects have on the transfer of substances in the curd.

Coulon et al. [11] consider the numerous factors that contribute to the variations of the casein number, focusing particularly on the effect of feeding factors.

Verdier-Metz et al. [12] study the relationships between the contents of fat and protein of milk and the cheese yield in the production of Saint-Nectaire cheese; its cheesemaking is carried out standardising the fat/casein ratio of the vat milk. The authors [12] observe a linear correlation between the increase of yield and the increase of the sum of the contents of fat and casein; this sum explains 77% of the fresh yield.

Emmons et al. [13] describe the various predictive formulas already present in literature and develop new formulas, using an approach based on theoretical considerations concerning the distribution of solids and of the moisture in the different phases; the review has the merit of supplying a general picture of the subject, with wide considerations on the transfer of the components from milk to cheese. Emmons et al. [14] have recently dedicated a monography to this theme: they pick up and develop the concepts of steric exclusion, describing the analytical methods in order to determine the paracasein content focusing, in particular, on the destiny of the fat and the various nitrogen fractions (paracasein, whey proteins, proteose-peptones) in the course of cheesemaking.

The authors [14] also make interesting considerations concerning the paracasein, which can be partially lost in the whey as curd particles named “curd fines”, with consequent lowering of the cheese yield. Concerning the fraction of proteose-peptone, Emmons et al. [14] observe a different behaviour with respect to the results of van Boekel and Crijns [9]: according to them, this fraction [14] would not be included in the curd in an appreciable amount.

### **Fat, casein and cheese yield**

Casein content, together with fat content, has a fundamental role in determining cheesemaking yield [2, 7, 15-22]. Data relative to the production of Cheddar cheese from milk with a fat to casein ratio of 1.46 clearly show the close relationship between casein content and industrial milk yield [23].

These observations, furthermore, underline the great differences that characterise milk produced by different cattle breeds. Yield does, in fact, vary from a minimum of 9.67 kg of cheese from milk with 2.38% casein (Holstein), to a maximum of 11.33 kg of cheese from milk with 2.86% casein (Jersey), with a margin of 1.66 kg of cheese per 100 kg of milk in favour of the Jersey: this is a marked difference. Milks with 2.57 % (Ayrshire) and 2.72 % (Guernsey) of casein occupy the middle ground.

Thus, the quantity of cheese varies in direct relationship to milk casein content, and is related to fat to casein ratio of vat milk. This second factor can clearly be seen in the production of Parmigiano-Reggiano, and is even more marked in the production of Grana Padano cheese, both of which are made using partially skimmed milk [24-28].

As far as Parmigiano-Reggiano cheese is concerned, available observations [29] clearly indicate that cheese yield is strongly associated with the casein content of milk. Average monthly values of 24 hour cheese yield, taken over a 5 year period in a cheese factory in the province of Parma, show a strict correlation ( $r = 0.82$ ;  $n=60$ ), highly significant ( $P < 0.001$ ), with the weighed average of the casein content of milk, collected from 9 different herds. Milk that was, on average, lower in casein (2.27%), gave a decisively inferior cheese yield (7.38 kg) than milk which was richer in casein (casein = 2.48 %; yield = 7.94 kg cheese per 100 kg milk).

The fat to casein ratio of vat milk represents an important variable of the industrial cheese yield [30], as demonstrated by the few data present in literature, even if such ratio is strictly related to the variety and the typicality of the cheese.

### **Rennet-coagulation properties and cheese yield**

Curd firming time ( $k_{20}$ ) and curd firmness ( $a_{30}$ ) are the coagulation properties whose effect on the yield was mainly studied, so that some authors considered them as additional parameters, together with fat and casein contents, in the elaboration of the cheese yield predictive formulas.

Aleandri et al. [27] observe that curd firmness is the only coagulation parameter correlated with cheese yield; it is, indeed, one of the main factors that can significantly affect yield. The two parameters, curd firmness and cheese yield, are related by a non linear relationship. In particular, the influence of the curd firmness on cheese yield is more marked if the fat content is low. The parameter  $a_{30}$  reflects

the “quality” of caseins, that is their genetic type. It is known, in fact, that some genotypes, such as, for example, the k-casein B are related to a greater k-casein and total casein content. The content of casein is directly related to the cheese yield, while the k-casein content has repercussions on the size of the casein micelles, which results smaller, and therefore on the rennet-coagulation properties, that manifest a significant improvement. The curd is firmer and able to retain a greater amount of substances, thus increasing cheese yield. Therefore, as observed from Aleandri et al. [27], the parameter “ $a_{30}$ ” is related to the casein genotype, and practically reflects the “quality” of the casein, that in the term “% content of casein” was not comprised.

In the production of soft cheese, Colin and Laurent [31] and Colin et al. [32] underline that milk coagulation properties, in particular curd firming time  $k_{20}$ , can have a marked influence on the cheese yield. These authors assert, in fact, that the simultaneous use of the chemical parameters and the coagulation parameters improves remarkably predictions of the fresh yield, while the ripened cheese yield would not be related to the coagulation parameters. The authors [31, 32] found that the curd firming time explains 74% of the variation of the fresh yield.

Bynum and Olson [33] have observed, in Cheddar cheesemaking, a significant effect of the curd firmness on the yield: an increase in firmness leads to a lowering of the losses of fat and casein, and, therefore, to an increase of the cheese yield .

As observed by various authors [7, 34-40], the poor rheological characteristics of the curd and the altered technological conditions of cheesemaking can determine losses of yield in cheese, because of a smaller recovery of fat and casein, also because curd particles form “curd fines” that remain in the whey.

### **Physiological factors, somatic cell count and cheese yield**

According to Sapru et al. [41] in Cheddar cheese, the relative losses in fat and protein during cheesemaking are greater for cow milk produced at the end of lactation with respect to milk produced at the beginning of lactation, with consequent minor recovery of substances in the curd. However, since the late lactation milk has a higher content of casein and fat, the higher losses do not markedly affect, and the cheese yield of late lactation milk is higher than the cheese yield of early lactation milk.

An analogous result is found by Coulon et al. [42] in the production of Saint Nectaire; the authors [42], in fact, in cheesemaking from cow milk produced at the end of lactation, obtained an increase in fresh yield, due to an increase in fat and protein contents.

In a study on Parmigiano-Reggiano cheese, carried out on Italian Friesian cow milk, Mariani and Casali [43] observe that the milk in correspondence of elevated levels of production tends to become poor in fat and casein: in terms of cheese yield, the milk of the less productive cows is more suitable for cheesemaking.

Numerous papers demonstrate that milk with high contents of somatic cells leads to a greater loss of protein in the cheesemaking and therefore to a lessening of cheese yield; these losses are probably due to the greater proteolytic activity of plasmin on caseins, that characterise such milk [44, 45].



### **Seasonal variations of milk characteristics and of cheese yield**

The seasonal variations of the cheese yield are in strict relationship with the seasonal variations of fat and casein contents and, partially, also with those of the coagulation parameters. The seasonal variations of fat and casein are markedly affected by the differences of herd management and feeding, specific to each cheese production, both regarding the seasonality of deliveries, and in relation to the feeding regime, which in some production still conserves differences between grass feeding in summer and hay in winter. On the variation of the coagulation properties, instead, the environmental temperature exercises a direct effect, which has repercussions on the state of welfare of the animal and, consequently, on the quality of the milk.

Seasonal variations of the composition of milk, in particular those regarding the protein or casein content, markedly affect the cheese yield of most cheese productions [2, 15, 25, 30]. Pecorari and Mariani [29] and Mariani et al. [46] find minimum values for yield in Grana Padano cheese in correspondence with the months of June, July and August and maximum ones in the autumnal months, above all in October.

This result is confirmed in literature: Ozimek and Kennelly [47] have also underlined an analogous trend for the yield in Cheddar cheese, with minimum values in the months of June, July and August and the maximum ones in correspondence with the autumnal months; an analogous result is reported by Bynum and Olson [33] and Barbano and Sherbon [15], both concerning the yield of Cheddar cheese, and from Altiero et al. [48] for the Mozzarella Bufala Campana cheese; these latter authors put in evidence the strict relationship between the seasonal variations of milk fat and casein contents and those of cheese yield.

Banks and Tamime [36], instead, find for the content of fat the maximum values in the month of May and minimum values in December and January and for the casein maximum values in May and minimum values in January and November; consequently, the yield of milk in Cheddar cheese, manifests minimum values in January and maximum in September and October. From these data it clearly emerges that the climatic conditions and the physiological state of the cows exercise a determining role on the contents of fat and casein and on the coagulation properties, factors that, conversely, markedly affect the cheese yield.

### **PART 2: FORMULAS OF MEASUREMENT AND PREDICTION OF CHEESE YIELD**

Various formulas of measurement and formulas of prediction of the cheese yield have been proposed; the first are based on the weight of the cheese or of some of its components (e.g. dry not-fat extract), the second may be applied also without cheesemaking and base their calculations on the chemical characteristics of milk or on statistical formulas with coefficients calculated from an elevated number of cheesemaking trials.

For some parts of this paper we have referred to the review of Vandeweghe [17].

## 1. Formulas of measurement

Cheese yield is the amount of cheese (kg) obtained from 100 parts of milk (amount expressed as litres or kg). Two quantities are therefore compared: the amount of milk used and the amount of cheese obtained. For the measurement of cheese yields various formulas have been elaborated which consider different parameters.

*Calculation beginning from the amount of dry not-fat extract of the cheese: coefficient G*

This method, elaborated by Guérault [49], is based on the measurement of the dry not-fat extract that is present in the cheese from a litre of skimmed milk:

$$\text{coefficient G (g)} = (10 * \text{ESD} * \text{P}) / \text{V}$$

where P is the weight of the cheese obtained expressed in kg, V is the volume of used skimmed milk expressed in litres, and ESD is the dry not-fat extract of the cheese (% on 100g of cheese). This formula offers an aid for the cheesemaker to search for the causes of eventual anomalies in the cheesemaking process or eventual losses; it also allows for establishing the seasonal variations of the cheese yield and calculating a coefficient G foreseen for milk with different contents of dry not-fat extract. It has been demonstrated that considering the dry not-fat extract explains only 60% of the variation that happens to the cheese yield; while to estimate individually the content of fat and the content of nitrogen fractions explains about 80% of the possible cheese yield variation [50-52].

*Calculation beginning from the dry extract of the milk, of the cheese and of the whey obtained*

Starting from 100 kg of milk that is transformed in X kg of curd and (100 - X) kg of whey (in the approximation that there are no losses), the following relation is obtained:

$$100 \text{ kg} * \text{ES milk} = \text{X} * \text{ES curd} + (100 - \text{X}) * \text{ES whey}$$

where ES milk, ES curd and ES whey are respectively the dry extract of the milk, of the curd obtained and of the whey, in grams per kg. Resolving the previous equation in X:

$$\text{Yield X} = 100 (\text{ES milk} - \text{ES whey}) / (\text{ES curd} - \text{ES whey})$$

## 2. Predictive formulas

The rennet curd after syneresis retains approximately half, in weight, of all the constituent of the milk constituting the total dry extract. For each of them the proportions are approximately the following: fat 92%; nitrogen fractions 74%; casein 94%; lactose 5%; ash 20%; total dry extract 50%; not-fat residue 33%. These proportions depend on the type of cheesemaking. The casein and the fat are mostly

retained in the curd. The other constituents are retained in an amount proportional to the content of water of the curd, that is the whey that was not expelled during syneresis.

The predictive formulas serve in order to estimate the obtainable maximum cheese yields for a particular type of cheese and, therefore, in order to calibrate the transformation process according to the actual cheese yields obtained in the cheese factory for that type of cheese; practically they concur to give indications as to the goodness of the technological process of cheesemaking.

Two fundamental types of theoretical formulas of cheese yield exist: those based on the statistical analysis of the analytical results of a high number of trials and those which are based on relative theoretical considerations as to the distribution of solids and of moisture between the various phases of the different processes of the cheesemaking.

### ***Formulas based on the statistical analysis of a high number of trials***

#### *Formulas of van Slyke, Peter and Roeder*

In 1894 van Slyke elaborated a formula based on the result of the fabrication of Cheddar cheese in 48 cheese factories in the State of New York [53]. The formula of van Slyke is valid above all for Cheddar, but it is the basis for formulas elaborated successively for different cheese varieties. According to this formula, the cheese yield, expressed in kg of cheese for 100 kg of milk, can be calculated by the following equation:

$$\text{cheese yield} = [(0.93 G + C - 0.1) * 1.09 * 100] / (100 - U)$$

where G is the milk fat (%), C is casein (%), U is the moisture of cheese (%), 1.09 is a constant that considers the effect of salt and other solids and 0.1 represents the presumed loss of casein. Varying the constants, the same formula can be applied to the calculation of the cheese yields of other cheeses.

More generic, but perhaps also more generally applicable, is the formula of Peter [54], which tries to forecast the cheese yield removing from the total dry residue of milk an empirical quota P, variable with the types of cheese, and putting it in relationship with the total dry residue of the cheese. The cheese yield can be forecast by this formula:

$$\text{cheese yield (kg cheese /100 kg milk)} = (\text{ES milk} - P) * 100 / \text{ES cheese}$$

The value of P is variable depending on the type of cheese and is approximately 6.3-6.5 for hard cheeses.

Roeder [55], starting from the formula of Peter proposed a formula in which the dry total residue of the milk is subdivided into fat and not-fat residue, and in the latter the casein quota is distinguished from the rest. Estimating that casein constitutes approximately 32% of the not-fat residue of milk, Roeder [55] assumes an average

recovery of the fat of approximately 90%, while the quota of retention of the rest (68%) of the not-fat residue of milk is estimated at 10.2% of the total not-fat residue; with these assumptions the quota that can pass in the cheese becomes:

$$0.9 (G + 0.32 \text{ RSM}) + 1.102 \text{ RSM}$$

which, when developed, becomes

$$(0.9 G + 0.39 \text{ RSM}) * 100 / \text{RST}$$

where G is the fat, RSM is the dry not fat residue and RST is the total dry residue, all expressed in percentages.

#### *Formulas of multiple regression beginning from fat and protein (casein)*

One of the more important formulas, probably the one mainly used [51, 52, 56], is the following:

$$a * G + b * P$$

where G and P are respectively the fat and the protein of the milk, while “a” and “b” are two coefficients which take into account the recovery of these two components, that is the contribution with which each of them participates in the curd formation. The two coefficients vary depending on the type of cheese and manufacture and are the average value resulting from a high number of trials. The variant that uses the casein content instead of the total protein has been shown as mainly able to forecast cheese yield. These predictive formulas tend to give results that differ in excess or defect with respect to the effective cheese yields of a cheese factory; they serve however to orient the technician and can constitute a basis of evaluation of the technological results.

#### *Formulas of Colin, Laurent and Vignon*

Colin and Laurent [31] and Colin et al. [32], in the elaboration of formulas of cheese yield for soft cheese, draw attention, in particular, to the coagulation properties; they develop, in fact, multiple regressions that take into account numerous parameters that can be related to cheese yield: besides TP, TB (taux butyreux) and Tcas, respectively the content of protein, fat and casein, they take into consideration also MAC (curd nitrogen substance), the proportions of  $\alpha_{s1}$ -casein and  $\beta$ -casein and, in particular, the curd firming time  $k_{20}$ . Several predictive formulas, obtained from several combinations of the parameters cited above, are considered, with relative coefficients calculated by multiple regression. The formula that, according to the authors, results as more suitable in order to forecast the cheese yield for soft cheese is the one that considers protein content and  $k_{20}$ :

$$Y (\text{soft cheese}) = 9.75 - 0.021 * k_{20} + 0.211 * \text{TP}$$

## ***Formulas based on theoretical considerations relative to the distribution of the solids and the moisture between the different phases***

### *Formulas of Emmons*

The second typology of formulas, based on theoretical considerations relative to the distribution of the solids and the moisture between the different phases, proposed by Emmons et al. [13] is based on the principle that the cheese is constituted by three phases: fat matter, paracasein “tissue” and watery phase, which consists of water and the substances dissolved in it. The different ways to distribute the soluble substances in water and the same water in the other constituents give rise to four different types of formulas:

- type A formulas in which the solid particles of the whey, the salt and the water amount are distributed proportionally to the fat and to the paracasein;
- type B formulas in which the solid particles of the whey and the salt are included in the paracasein so as to form the “dry not-fat cheese”, and the water content is distributed proportionally to fat and dry not-fat substance;
- type C formulas in which solid particles of the whey, salt and moisture are distributed in proportion to the paracasein only;
- type D formulas in which solid particles of the whey, salt and moisture are considered together as the “watery phase” and where all the phases are confronted on the base of their volumes.

The choice of determined formula typology depends on the type of cheese, for example if cheese is fat, soft, or hard.

### ***The sponge theory of Maubois and Mocquot***

Maubois and Mocquot [57] propose a predictive formula for cheese yield suitable for all types of cheese and independent of the cheesemaking technology. In these studies the authors compare the cheese to a sponge imbibed in a liquid; the weft of the sponge is the paracasein (which captures the fat) while the liquid is the whey. The calculations starting from this model lead to the following formula:

$$RM = [(MAC * 10) (200 - 3s)] / [200 (F - g) - 2s (100 - g)]$$

where RM is the maximum cheese yield expressed as the maximum weight of cheese obtained from 100 kg of milk; MAC is the content of paracasein of the milk expressed in g for kg of milk; F is the amount of total dry matter contained in 100 g of cheese; “g” is the amount of fat contained in 100 g of cheese; “s” is the dry matter of the whey included in the cheese, expressed in g for 100 g of whey.

Thus, once the composition of the cheese has been defined (dry matter, fat, dry matter of the whey included in the cheese) and the casein content of the milk, by means of this formula it is possible to estimate the maximum weight of cheese that can be obtained.

### 3. Evaluation of the cheese yield in Grana type cheese *Formulas of Cusmano and Russo*

For estimating the yield in Parmigiano-Reggiano cheese, two different procedures can be considered: in relation to the content of dry matter of vat milk or in relation to the amounts of fat and casein that pass into the curd.

*Based on the content of dry matter of vat milk*

In relation to the content of dry matter of vat milk, the cheese yield is given from the following expression:

$$\text{Cheese yield} = \text{Dry matter of vat milk} * 0.7$$

This formula is valid only for hard cheeses of the Gruyère and Emmental type. The simplicity of such expression resides in the fact that the value of the dry matter can be easily calculated by means of the formula of Fleischmann, having only two analytical data: specific gravity and fat content (Gerber) of vat milk. Coefficient 0.7 of the formula is, in fact, the ratio between cheese yield of vat milk and the dry matter of vat milk. The average value of such a ratio for Parmigiano-Reggiano, is, according to Cusmano and Russo [24], 0.7043.

In the case of Parmigiano-Reggiano, however, rather than the cheese yield referred to the vat milk, it is more interesting to consider the cheese yield referred to 100 kg of milk delivered to the cheese factory and transformed (whole milk of the evening milking + whole milk of the morning milking); this yield can be calculated by means of the ratio: amount of milk transformed/ amount of vat milk (LT/LC) that is equal to 1.046. Corrected by this value, the value of the coefficient changes from 0.7043 to 0.6733, and concurs to calculate, if the value of the dry matter of vat milk is known, the yield in fresh (at 24h) cheese (RFLT) obtainable from 100 kg of milk delivered to the cheese factory and destined for transformation:

$$\text{RFLT} = \text{Dry matter of vat milk} * 0.6733.$$

The cheese yields calculated in this way differ from the actual ones for an amount equal to  $\pm 205$ – $228$  grams for 100 kg of milk. This is a rather relevant approximation, therefore it is preferable to utilise the other type of approach, that is in relation to the amounts of fat and casein that “pass” into the curd.

*In relation to the amounts of fat and casein that are recovered into the curd*

The formulas obtained on the basis of the amounts of fat and casein that are recovered into the curd lead to a better evaluation of the cheese yield. For this purpose, Cusmano and Russo [24], in relation to the contents of fat and casein which are recovered into the curd, examine the ratio:

$$\text{RLC} / (\text{G} + \text{C})$$

where milk RLC is the actual cheese yield obtained from 100 kg of vat milk, while G and C are respectively the fat and the casein recovered in the curd. This last relation is expressed in the following way:

$$\begin{aligned} \text{RLC} &= \text{Weight of fresh cheese (at 24 h)} * 100 / \text{weight vat milk} \\ G + C &= ((Gc + C) / Dc) - (g / d) \end{aligned}$$

where Gc is the fat in the vat milk, C is the casein in the vat milk, Dc is the specific gravity of the vat milk, “g” is the fat of the whey and “d” is the specific gravity of the whey.

The average value of the ratio RLC/(G + C) is 1.824. On the basis of the data relative to the contents of fat and casein in the vat milk, of the content of fat in the residual whey, of the specific gravities of the milk and of the whey, the fresh cheese yield (RFLC) from 100 kg of vat milk can be calculated:

$$\text{RFLC} = [((Gc + C) / Dc) - (g / d)] * 1.824$$

From the value of the cheese yield referred to the vat milk, by means of the coefficient 1.744 (that is 1.824/1.046), the cheese yield of the milk delivered and transformed can also be obtained.

Therefore, the fresh cheese yield referred to delivered and transformed milk is defined as:

$$\text{RFLT} = [((Gc + C) / Dc) - (g / d)] * 1.744$$

The presumed cheese yields, calculated with this formula, differ from the actual ones in the amount of  $\pm 100$  grams. If, in addition to the previously considered factors, one considers also the so-called “decrease in weight” (due to size of the wheel, temperature and moisture of the conservation warehouse), the cheese yield obtainable at the end of the year (RPFA) can be forecast by means of the following formula:

$$\text{RPFA} = [((Gc + C) / Dc) - (g / d)] * 1.562$$

### ***Formulas of Aleandri, Schneider and Buttazzoni***

For the calculation of Parmigiano-Reggiano cheese yield, Aleandri et al. [27] draw attention to the curd firmness  $a_{30}$  (that they call  $E_{30}$ ); they observe that this parameter is one of the main to exert a significant effect on cheese yield. The authors [27] elaborate a formula of multiple regression that contemplates, in addition to the contents of fat and protein, also curd firmness. They find, moreover, that the correlation between curd firmness and cheese yield is not linear. The formula elaborated by Aleandri et al. for cheese yield referred to the “mass” of milk (whole milk of evening milking + whole milk of morning milking) is the following:

$$\text{Predicted cheese yield} = \text{cost.} + b_1 * (\text{kg fat}) + b_2 * (a_{30}) + b_3 * (\text{kg protein})^2 + b_4 * (a_{30})^2 + b_5 * (a_{30} * \text{fat}\%)$$

The coefficient of correlation of Pearson obtained between the cheese yields calculated in this way and the actual cheese yields was 0.910. The calculated coefficients were:

$$\text{cost.} = 22.2270; b_1 = 1.2737; b_2 = 0.7064; b_3 = 0.0161; b_4 = - 0.0037; b_5 = - 0.2315.$$

Another formula elaborated by these authors [58] which does not, however, contemplate, the term  $a_{30}$ , is the following:

$$\text{Predicted cheese yield} = \text{cost.} + b_1 * (\text{kg fat}) + b_2 * (\text{kg protein})^2$$

This formula was correlated with actual yield using the Pearson coefficient 0.906, therefore with a less precise correlation between presumed and actual cheese yield. The calculated coefficients, for this last formula, were the following:

$$\text{cost.} = 2.83329; b_1 = 0.711144; b_2 = 0.179.$$

## **APPENDIX: FINAL PROSPECT WITH SOME OF THE CHEESE YIELD PREDICTIVE FORMULAS PRESENT IN LITERATURE**

Some of the formulas present in literature are reviewed here. Those elaborated by Aleandri et al. and those of Cusmano and Russo are referred to Parmigiano-Reggiano cheese.

### **FORMULE OF VAN SLYKE [53]**

$$(1) \text{ Cheese yield at 24 h} = [(0.93 * G + C - 0.1) * 1.09 * 100] / (100 - U)$$

[van Slyke, 1894]

where U is the moisture of the cheese.

### **FORMULAS OF CUSMANO AND RUSSO [24]**

$$(2) \text{ Cheese yield at 24 h} = [((G + C) / D) - (g / d)] * 1.824$$

$$(3) \text{ Cheese yield at 24 h on whole milk} = [((G + C) / D) - (g / d)] * 1.744$$

[Cusmano and Russo, 1962]

G and C are the fat and casein (g/100g) in vat milk, D is the density of vat milk, “g” is the fat of cooked whey and “d” the density of cooked whey. “Whole milk” is the evening whole milk + the morning whole milk, that is the milk delivered to the cheese factory.



FORMULA OF BANKS et al. [59]

$$(4) \text{ Cheese yield at 24 h} = 1.58 * G + 1.23 * P$$

[Banks et al., 1981]

FORMULA OF GARBELLI AND MASSONI [60]

$$(5) \text{ Cheese yield at 24 h} = (G + C * 1.1) / S$$

[Garbelli and Massoni, 1986]

where S is the dry matter content of the cheese divided by the weight of the cheese at 24 hours. The formula, needing the weight of the cheese at 24 hours, is only of interest when the initial amount of milk is not known.

FORMULAS OF ALEANDRI, BUTTAZZONI E SCHNEIDER [27, 58, 61]

$$(6) \text{ Cheese yield at 6 months} = 22.2270 + 1.2737 * \text{kgG} + 0.7064 * a_{30} + 0.0161 * (\text{kgP})^2 + - 0.0037 * (a_{30})^2 - 0.2315 (a_{30} * G)$$

[Aleandri et al., 1989b]

$$(7) \text{ Cheese yield at 6 months} = 28.339 + 0.9877 * \text{kgG} + 0.0179 * (\text{kgP})^2$$

[Aleandri et al., 1989a]

kgG and kgP are respectively the kg of protein and fat in the vat milk, obtained by multiplying protein (g/100g) and fat (g/100g) per the amount of vat milk (kg). The terms G and P, instead, indicate the values expressed in g/100g.

$$(8) \text{ Cheese yield at 6 months} = 2.83329 + 0.711144 * G + 0.179 * P^2$$

[Buttazzoni and Aleandri, 1990]

FORMULAS OF CHAMBA [62]

$$(9) \text{ Cheese yield at 24 h} = 0.216 * \text{kgP} + 0.056 * \text{kgG} + 0.079$$

(Comté cheese)

$$(10) \text{ Cheese yield at 24 h} = 0.164 * \text{kgP} + 0.106 * \text{kg}$$

(Emmental cheese)

[Chamba, 1991]

FORMULAS OF COLIN et al. [32]

$$(11) \text{ Cheese yield at 24 h} = 0.37 + 0.36 * \text{kgP} + 0.15 * \text{kgG}$$

$$(12) \text{ Cheese yield at 24 h} = 9.75 + 0.021 * k_{20} + 0.211 * \text{kgP}$$

[Colin et al., 1992]

where kgP and kgG are respectively the kg of protein and fat present in the vat and  $k_{20}$  is the curd firming time.

The values of cheese yield calculated with the formulas of Colin et al. result as being very high because the formulas are referred to a soft cheese. The same authors find yields of 15-16 kg/100kg.

#### **APPENDICE: PROSPETTO FINALE CON ALCUNE DELLE FORMULE DI PREVISIONE DELLA RESA PRESENTI IN LETTERATURA**

Di seguito vengono presentate alcune delle formule di previsione della resa presenti in letteratura. Quelle di Aleandri et al. e quelle di Cusmano e Russo, in particolare, sono state elaborate per il Parmigiano-Reggiano.

##### FORMULA DI VAN SLYKE [53]

$$(1) \text{ Resa } 24 \text{ h} = [(0,93 * G + C + 0,1) * 1,09 * 100] / (100 + U)$$

[van Slyke, 1894]

dove U è l'umidità del formaggio.

##### FORMULE DI CUSMANO E RUSSO [24]

$$(2) \text{ Resa } 24 \text{ h} = [((G + C) / D) - (g / d)] * 1,824$$

$$(3) \text{ Resa } 24 \text{ h massa} = [((G + C) / D) - (g / d)] * 1,744$$

[Cusmano and Russo, 1962]

G e C sono il grasso e la caseina (g/100g) del latte in caldaia, D è la densità del latte in caldaia, "g" è il grasso del siero cotto e "d" la densità del siero cotto. "Massa" è il latte intero della sera + latte intero della mattina, cioè il latte conferito in caseificio.

##### FORMULA DI BANKS et al. [59]

$$(4) \text{ Resa } 24 \text{ h} = 1,58 * G + 1,23 * P$$

[Banks et al., 1981]

##### FORMULA DI GARBELLI E MASSONI [60]

$$(5) \text{ Resa } 24 \text{ h} = (G + C * 1,1) / S$$

[Garbelli and Massoni, 1986]

dove S è il contenuto di sostanza secca del formaggio diviso per il peso della forma a 24 ore. La formula, richiedendo il peso del formaggio a 24 ore, può avere un interesse solo per chi non sia a conoscenza della quantità di latte messa in opera.

FORMULE DI ALEANDRI, BUTTAZZONI E SCHNEIDER [27, 58, 61]

(6) Resa 6 mesi =  $22,2270 + 1,2737 * \text{kgG} + 0,7064 * a30 + 0,0161 * (\text{kgP})^2 +$   
 $- 0,0037 * (a30)^2 - 0,2315 (a30 * G)$   
[Aleandri et al., 1989b]

(7) Resa 6 mesi =  $28,339 + 0,9877 * \text{kgG} + 0,0179 * (\text{kgP})^2$   
Aleandri et al., 1989a]

kgG e kgP sono rispettivamente i kg di proteina e grasso del latte in caldaia, ottenuti moltiplicando il grasso (g/100g) e la caseina (g/100g) per la quantità di latte in caldaia (kg). I termini G e P, invece, indicano i valori espressi in g/100g.

(8) Resa a 6 mesi =  $2,83329 + 0,711144 * G + 0,179 * P^2$   
[Buttazzoni and Aleandri, 1990]

FORMULE DI CHAMBA [62]

(9) Resa 24 h =  $0,216 * \text{kgP} + 0,056 * \text{kgG} + 0,079$   
(Comté cheese)

(10) Resa 24 h =  $0,164 * \text{kgP} + 0,106 * \text{kgG}$   
(Emmental cheese)  
[Chamba, 1991]

FORMULE DI COLIN et al. [32]

(11) Resa 24 h =  $0,37 + 0,36 * \text{kgP} + 0,15 * \text{kgG}$   
(12) Resa 24 h =  $9,75 + 0,021 * k20 + 0,211 * \text{kgP}$   
Colin et al., 1992]

dove kgP e kgG sono rispettivamente i chili di proteina e di grasso contenuti nel latte in caldaia e k20 è il tempo di rassodamento del coagulo.

I valori di resa calcolati con le formule di Colin et al. risultano piuttosto elevati poichè le formule sono da applicare a formaggi a pasta molle. Gli autori stessi rilevano rese di 15-16 kg/100kg.

**REFERENCES**

- 1) Lelievre J., Freese O.J., Gilles J. (1983) Prediction of Cheddar cheese yield. *New Zealand J Dairy Sci Technol*, 18: 169-172.
- 2) Gilles J., Lawrence R.C. (1985) The yield of cheese. *New Zealand J Dairy Sci Technol*, 20: 205-214.
- 3) Lawrence R.C. (1991) Cheese yield potential of milk. In: *Factors affecting the yield of cheese*, IDF Publication, Special Issue n. 9301, 109-120.

- 4) Callanan T. (1991) Recovery of milk constituents in cheesemaking (relation to process control). In: Factors affecting the yield of cheese, IDF Publication, Special Issue n. 9301, 49-52.
- 5) AA.VV. (1991) Factors affecting the yield of cheese, IDF Publication, Special Issue n. 9301, 213 pp.
- 6) AA.VV. (1993) Cheese yield and factors affecting its control, IDF Seminar, Cork (Ireland), 540 pp.
- 7) Lucey J., Kelly J. (1994) Cheese yield. *J Soc Dairy Technol*, 47(1): 1-14.
- 8) van Boekel M.A.J.S. (1993) Transfer of milk components to cheese: scientific considerations. In: Cheese yield and factors affecting its control, IDF Seminar, Cork (Ireland), 19-28.
- 9) van Boekel M.A.J.S., Crijns C.L. (1994) Behaviour of the proteose-peptone fraction during renneting of milk. *Neth Milk and Dairy J*, 48: 117-126.
- 10) van den Berg M.G., van den Berg G., van Boekel M.A.J.S. (1996) Mass transfer processes involved in Gouda cheese manufacture, in relation to casein and yield. *Neth Milk and Dairy J*, 50: 501-540.
- 11) Coulon J.-B., Hurtaud C., Remond B., Verité R. (1998) Factors contributing to variation in the proportion of casein in cows' milk true protein: a review of recent INRA experiments. *J Dairy Res*, 65: 375-387.
- 12) Verdier-Metz I., Coulon J.-B., Pradel Ph. (2001) Relationship between milk fat and protein contents and cheese yield. *Anim Res*, 50: 365-371.
- 13) Emmons D.B., Ernstrom C.A., Lacroix C., Verret P. (1990) Predictive formulas for yield of cheese from composition of milk: a review. *J Dairy Sci*, 73: 1365-1394.
- 14) Emmons D.B., Dubé C., Modler H.W. (2003) Transfer of protein from milk to cheese. *J Dairy Sci*, 86: 469-485.
- 15) Barbano D.M., Sherbon J.W. (1984) Cheddar cheese yields in New York. *J Dairy Sci*, 67: 1873-1883.
- 16) Kerjean J.R. (1984) Conséquences fromagères des variations de composition du lait: qualité chimique du lait de fromagerie. Colloque INRA-ENSAR-INAPG "La composition chimique du lait et ses incidences technologiques", 1-15, Rennes (France), 28 septembre 1984.
- 17) Vandeweghe J. (1984) Le rendement en fromage: prédétermination et mesure. In: *Le Fromage*, 467-475, (Coord. A. Eck). Technique et Documentation (Lavoisier), Paris.
- 18) Banks J.M., Clapperton J.L., Muir D.D., Girdler A.K. (1986) The influence of diet and breed of cow on the efficiency of conversion of milk constituents to curd in cheese manufacture. *J Sci Food Agric*, 37: 461-468.
- 19) Lawrence R.C. (1988) Les facteurs du rendement fromager des laits. *Revue Laitière Française*, 478: 85-91.
- 20) Lou Y., Ng-Kwai-Hang K.F. (1992) Effects of protein and fat levels in milk on Cheddar cheese yield. *Food Research Int.*, 25: 437-444.
- 21) Lou Y., Ng-Kwai-Hang K.F. (1992) Effects of protein and fat levels in milk on cheese and whey composition. *Food Research Int.*, 25: 445-451.
- 22) van den Berg M.G. (1994) The transformation of casein in milk into the

- paracasein structure of cheese and its relation to non-casein milk components. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.i. no. 9402, 35-47.
- 23) Custer E.W. (1979) The effect of milk composition on the yield and quality of cheese. II. The effects of breeds. *J Dairy Sci*, 62(suppl.1): 48-49.
  - 24) Cusmano I., Russo F. (1962) Sul procedimento per determinare la resa in formaggio e burro nella trasformazione del latte a Parmigiano-Reggiano. *Il Latte*, 33: 852-858.
  - 25) Cusmano I., Russo F., Tromellini P. (1963) Sul rapporto grasso-caseina del latte in caldaia da trasformare in formaggio Parmigiano-Reggiano. *Il Latte*, 37: 456-464.
  - 26) Galaverni R. (1972) I problemi tecnici ed economici della caseificazione e della maturazione dei formaggi. Atti "Giornate Studio Problemi Lattiero-caseari", 159-164, Ente Aut. Mostra Cons. Alim., Parma, 26-27 aprile 1972.
  - 27) Aleandri R., Schneider J.C., Buttazzoni L.G. (1989) Evaluation of milk for cheese production based on milk characteristics and Formagraph measures. *J Dairy Sci*, 72: 1967-1975.
  - 28) Pecorari M., Fossa E., Sandri S., Tedeschi G., Pellegrino L., Mariani P. (1995) Il ruolo del contenuto in caseina del latte nella produzione del Parmigiano-Reggiano: resa, composizione chimica, proteolisi, lipolisi e caratteristiche organolettiche del formaggio stagionato. *Sci Tecn Latt-cas*, 46: 211-232.
  - 29) Pecorari M., Mariani P. (1990) Caseina, attitudine alla coagulazione del latte, resa e qualità del formaggio. *Sci Tecn Latt-cas*, 41: 225-244.
  - 30) Labuschagne J.H. (1982) Influenza della composizione chimica del latte sulla qualità del formaggio. *Il Latte*, 7: 294-298.
  - 31) Colin O., Laurent F. (1991) Qualité du lait et transformation fromagère. Colloque "Proteines et rendements en Industries Laitières", ENSAIA - Nancy, 2-3 ottobre 1991.
  - 32) Colin O., Laurent F., Vignon B. (1992) Variations du rendement fromager en pâte molle. Relations avec la composition du lait et les paramètres de la coagulation. *Lait*, 72: 307-319.
  - 33) Bynum D.G., Olson N.F. (1982) Influence of curd firmness at cutting on Cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. *J Dairy Sci*, 65: 2281-2290.
  - 34) Antila V., Hakkarainen H., Lappalainen R. (1982) The transfer of milk components to Finnish Edam and Emmental cheeses. *Milchwissenschaft*, 37: 321-324.
  - 35) Banks J.M., Muir D.D. (1984) Coagulum strength and cheese yield. *Dairy Industries Int*, 49(9): 17, 19, 21, 36.
  - 36) Banks J.M., Tamime A.Y. (1987) Seasonal trends in the efficiency of recovery of milk fat and casein in cheese manufacture. *J Soc Dairy Technol*, 40: 64-66.
  - 37) Mayes J.J., Sutherland B.J. (1989) Further notes on coagulum firmness and yield in Cheddar cheese manufacture. *Aust J Dairy Technol*, 44: 47-48.
  - 38) Ng-Kway-Hang K.F., Politis I., Cue R.I., Marziali A.S. (1989) Correlations between coagulation properties of milk and cheese yielding capacity and

- cheese composition. *Can Inst Food Sci Technol J*, 22: 291-294.
- 39) McCarron S.B., Strugnell C.J. (1990) An evaluation of fat recovery into Cheddar cheese in a modern creamery. *Irish J Food Sci Technol*, 14: 25-33.
  - 40) Strand A.H., Hulbækdal A. (1993) Effect of varying curd firmness at cutting on Norvegia cheese. *Meieriposten*, 82(13;14): 372-379; 415-417.
  - 41) Sapru A., Barbano D.M., Yun J.J., Klei L., Oltenacu P.A., Bandler D.K. (1997) Cheddar cheese: influence of milking frequency and stage of lactation on composition and yield. *J Dairy Sci*, 80: 437-446.
  - 42) Coulon J.-B., Verdier I., Pradel Ph., Almena M. (1998) Effect of lactation stage on the cheesemaking properties of milk and the quality of Saint-Nectaire-type cheese. *J Dairy Res*, 65: 295-305.
  - 43) Mariani P., Casali G. (1985) Composizione e resa casearia del latte di vacche Frisone in rapporto ai livelli di produzione. *L'industria del Latte*, 21(1): 15-32.
  - 44) Barbano D.M., Rasmussen R.R., Lynch J.M. (1991) Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *J Dairy Sci*, 74: 369-388.
  - 45) Klei L., Yun J., Sapru A., Lynch J., Barbano D., Sears Ph., Galton D. (1998) Effects of milk somatic cell count on Cottage cheese yield and quality. *J Dairy Sci*, 81: 1205-1213.
  - 46) Mariani P., Summer A., Maffezzoli F., Zanzucchi G. (1995) Variazioni stagionali della resa del latte in formaggio Grana Padano. *Ann Fac Med Vet, Univ Parma*, 15: 159-166.
  - 47) Ozimek L., Kennelly J. (1993) The effect of seasonal and regional variation in milk composition on potential cheese yield. In: *Cheese yield and factors affecting its control IDF Seminar, Cork (Ireland)*, 95-100.
  - 48) Altiero V., Moio L., Addeo F. (1989) Previsione della resa in Mozzarella sulla base del contenuto in grasso e proteine del latte di Bufala. *Sci Tecn Latt.-cas*, 40: 425-433.
  - 49) Guèrault A.M. (1958) *La fromagerie devant les techniques nouvelles*. Ed. Sèpaic, Paris.
  - 50) Mocquot G., Ricordeau G., Auriol P. (1963) Estimation du rendement en fromage Gruyère de Comté en fonction de la richesse du lait de chaudière. *Ann Zootechn*, 12(1): 53-66.
  - 51) Ricordeau G., Mocquot G. (1967) Influence des variations saisonnières de la composition du lait de chèvre sur le rendement en fromage. Conséquences pratiques pour la sélection. *Ann Zootechn*, 16(2): 165-181.
  - 52) Maubois J.-L., Ricordeau G., Mocquot G. (1970) Étude des rendements en fromagerie de Camembert et de Saint-Paulin. *Lait*, 50(497): 351-373.
  - 53) van Slyke L.L. (1894) Investigations relating to the manufacture of cheese. *N.Y. Agric. Exp. Stat, Bull. n. 65*.
  - 54) Peter A. (1949) In: *Atti Int. Dairy Congr., London. Vol. 2*, 825.
  - 55) Roeder H. (1941) *Dtsch Molkereiztg*, 64: 46.
  - 56) AA.VV. (Tavola rotonda) (1981) Detection and measurement of levels of liquids in the dairy industry. *Techn Lait*, 957: 19-28.
  - 57) Maubois J.-L., Mocquot G. (1971) L'appréciation des rendements en

- fromagerie. Lait, 51: 416-420.
- 58) Aleandri R., Buttazzoni L., Schneider J.C. (1989) The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese production ability. Proc. 51<sup>th</sup> Annual Meeting European Association for Animal Production (EAAP), Dublin, Ireland, August 1989.
  - 59) Banks J.M., Banks W., Muir D., Wilson A.G. (1981) Cheese yield: composition does matter. Dairy Industries Int, 46(5): 15, 17, 19, 21-22.
  - 60) Garbelli S., Massoni F. (1986) Il formaggio Grana. Collana a cura di S. Carini, Istituto Sperimentale Lattiero-caseario, Lodi, pag. 18-19.
  - 61) Buttazzoni L., Aleandri R. (1990) Stima della quantità di formaggio Parmigiano-Reggiano prodotto da latte a composizione nota ed effetti dei polimorfismi genetici delle proteine del latte. Nota zootecnica n.6, Associazione Italiana Allevatori, maggio 1990.
  - 62) Chamba J.F. (1991) Proteines et rendement en fromagerie de pâte cuite. Colloque "Proteines et rendements en Industries Laitières", ENSAIA - Nancy, 2-3 ottobre 1991.





## **L'ANALISI DI SOSTENIBILITA' DEL CICLO DI GESTIONE D'IMPRESA: UN'APPLICAZIONE AD UN'IMPRESA BIOLOGICA CON ALLEVAMENTO BOVINO DA LATTE <sup>1</sup>**

### **SUSTAINABILITY ANALYSIS IN COMPANY BUSINESS CYCLE: AN APPLICATION TO AN ORGANIC BOVINE BREEDING**

Bonazzi Giuseppe - Iotti Mattia <sup>2</sup>

#### **PAROLE CHIAVE:**

Sostenibilità dell'indebitamento, costo del debito, leva finanziaria, zootecnia biologica da latte.

#### **KEY WORDS:**

Debt sustainability, cost of debt, financial leverage, organic dairy livestock.

#### **SOMMARIO**

La valutazione della convenienza alla realizzazione di un investimento può essere effettuata facendo riferimento alla capacità dell'investimento stesso di generare flussi finanziari netti attualizzati positivi, secondo un approccio finanziario. La valutazione della convenienza può essere effettuata anche facendo riferimento al ciclo della gestione d'impresa e, in questo caso, si considera il risultato d'esercizio, reddito netto o profitto, quale indicatore rilevante e sintetico espressivo della bontà dell'investimento in impresa. È necessario tuttavia integrare le analisi di convenienza finanziaria e le analisi di convenienza reddituale con metodologie di analisi finalizzate alla valutazione della sostenibilità dell'investimento, in particolare in situazioni d'investimento e/o d'impresa in cui, in tutto o in parte, il finanziamento degli investimenti sia effettuato facendo ricorso al capitale di terzi (cioè al capitale di finanziamento a titolo esplicitamente, o implicitamente, oneroso). In tale ambito, l'analisi si sviluppa in particolare attraverso indici che pongono in rapporto valori economici e valori patrimoniali, con un riferimento particolare alla valutazione della capacità della gestione d'impresa di fare fronte al costo dell'indebitamento e restituire il debito contratto.

L'approccio di valutazione di sostenibilità esposto è stato applicato, nel lavoro, ad un'impresa agraria con zootecnica bovina da latte con produzione biologica e lavorazione del latte in caseificio aziendale per la produzione di formaggio

---

1 Lo studio è frutto del lavoro comune dei due autori, tuttavia, in sede di stesura del testo Giuseppe Bonazzi ha redatto i paragrafi 1, 2, 4, 6 Mattia Iotti ha redatto i paragrafi 3, 4.

2 Sezione Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

Parmigiano-Reggiano DOP, oltre a produzioni accessorie, e con commercializzazione al consumatore finale mediante un punto vendita, a conduzione diretta. Per l'effettuazione degli investimenti necessari all'ammodernamento delle strutture aziendali l'impresa ha effettuato investimenti finanziati con capitale di terzi reperito a titolo oneroso presso il sistema del credito e, per tale motivo, nel caso analizzato diviene essenziale la valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa, unitamente all'analisi della dinamica reddituale.

All'impresa sono stati applicati indici di sostenibilità del ciclo di gestione, mettendo in rapporto margini reddituali intermedi che assimilano il flusso finanziario generato dalla gestione, quali margine operativo lordo (EBITDA) e reddito operativo (EBIT), con valori espressivi del costo del debito (oneri finanziari e saldo della gestione finanziaria), del servizio del debito, del debito finanziario residuo totale e del debito finanziario residuo per mutui e finanziamenti.

Dall'analisi emerge che l'impresa analizzata, pur a fronte di una dinamica reddituale espressiva di un reddito netto positivo, pur modesto, presenta insostenibilità del ciclo della gestione d'impresa, tanto nella sostenibilità del costo del debito, quanto nella sostenibilità del servizio del debito, quanto nell'attitudine alla restituzione del debito contratto, evidenziando la necessità di un'analisi non limitata alla sola dinamica reddituale, ma necessariamente estesa alla valutazione di sostenibilità dell'investimento al fine della quantificazione della capacità dell'impresa di permanere in bonis nel tempo, potendo far fronte alle uscite finanziarie per servizio del debito determinato dalla realizzazione di investimenti. Al fine della quantificazione di sostenibilità si evidenzia, altresì, l'utilità di analisi condotte attraverso il calcolo di indici di rotazione del capitale e di durata del ciclo commerciale, ove disponibile il complesso dei dati patrimoniali dell'impresa.

## **ABSTRACT**

The evaluation of the investment convenience may be referred to the capacity of investments to generate net positive discounted cash flows, according to a financial approach. The assessment of convenience may also be used with reference to the cycle of business management and, in this case, it is considered the operating result or net income or profit as relevant indicators and synthetic expressions of the goodness of the investment in enterprise. It could be necessary in improving financial and income analysis to use methods aimed to assess the investment sustainability, particularly in situations in which investments, in whole or in part, are financed using debts (with an explicit or implicit cost). In this case, the analysis is developed in particular using indices that put in relations income and assets, with specific reference to assess the ability of businesses to cover the cost of debt and to repay debt.

In the paper, the approach for assessing sustainability is applied to a farm with dairy organic production, processing milk in a dairy farm for the production of Parmigiano-Reggiano DOP, as well as other productions. The farm has direct access to final consumers through a direct retail outlet. The farm, in order to complete

investment and to modernize farm structures, made investments financed with capital raised on debt capital market, having bank credit access to onerous debt. In this situation, it is important to analyze the sustainability of the business cycle and the company's income trend.

In the paper, sustainability indices of company business cycle are applied to a case study, using indices that compare intermediate income streams generated from operations, such as gross operating profit (EBITDA) and operating income (EBIT), with values expressive of the cost of debt (as financial charges and balance of financial settlement), debt service, total outstanding debt and outstanding debt for loans.

The analysis shows that the analyzed company, even in a situation of positive net income, while modest, has unsustainable company business cycle, unsustainable cost of debt, unsustainable debt service, unsustainable capacity the repay debt; in this way, the paper shows the need of an analysis not limited to income trends, but necessarily extended to the business sustainability evaluation, with the purpose to quantify the firm capacity to remain in bonis over time, covering the financial expenditure for debt service used to cover investments. In order to quantify the business sustainability, it could be useful to improve analysis conducted by capital turnover and commercial cycle length indices, if patrimonial data were available.

## **1. PREMESSA**

La valutazione della convenienza alla realizzazione di un investimento può essere effettuata facendo riferimento alla capacità dell'investimento stesso di generare flussi finanziari netti attualizzati positivi. In tale ipotesi bisogna preliminarmente definire un opportuno tasso di sconto e deve essere fissato un orizzonte temporale che tenga in considerazione il periodo entro cui l'investimento è in grado di generare i propri effetti, siano questi economici, patrimoniali o, in specifico, finanziari. L'approccio alla valutazione di convenienza alla realizzazione dell'investimento assume quindi, secondo questa metodologia, una declinazione finanziaria, per considerazione dei flussi in entrata ed in uscita derivanti dall'investimento, calcolati secondo il principio di cassa (o finanziario).

La valutazione della convenienza alla realizzazione di un investimento può essere effettuata facendo anche riferimento al ciclo della gestione d'impresa e, in questo caso, si considera il risultato d'esercizio, reddito netto o profitto, quale indicatore rilevante e sintetico espressivo della bontà dell'investimento in impresa. Al fine della definizione della convenienza, il risultato d'esercizio deve essere in grado di remunerare, adeguatamente, dato il profilo di rischio dell'investimento, l'apporto di capitale proprio effettuato dai soci, a titolo di capitale di rischio, per il finanziamento dell'attività d'impresa. In questo caso la valutazione di convenienza assume una declinazione economica, in quanto l'oggetto di analisi è il reddito d'esercizio, qualificato come la variazione che il patrimonio netto apportato dal soggetto imprenditoriale subisce per effetto della gestione (Zappa, 1950). La quantificazione del reddito d'esercizio è effettuata per somma algebrica di

componenti positivi e negativi di reddito, calcolati secondo il principio di competenza economica, avendo riferimento cioè al momento di creazione del valore per effetto della gestione d'impresa e prescindendo, quindi, dal momento finanziario di manifestazione dell'entrata e/o dell'uscita di denaro per effetto degli accadimenti di gestione. La valutazione della convenienza economica alla realizzazione dell'investimento e/o alla gestione dell'impresa permette quindi di quantificare la remunerazione che l'investimento di capitale effettuato dal soggetto imprenditoriale realizzatore l'investimento riceve, in termini di risultato reddituale, per effetto della gestione (Mella, 2001). Al fine della valutazione dell'investimento e/o nell'ambito della valutazione di convenienza alla gestione dell'impresa è necessario, tuttavia, integrare le analisi di convenienza finanziaria e le analisi di convenienza reddituale con metodologie di analisi finalizzate alla valutazione della sostenibilità dell'investimento, cioè l'attitudine dell'investimento a perdurare nel tempo, in relazione alle scelte di finanziamento effettuate dal soggetto imprenditoriale promotore e/o dal soggetto manageriale gestore l'investimento e/o l'impresa.

La valutazione di sostenibilità dell'investimento diviene essenziale in situazioni d'investimento e/o d'impresa, intendendo l'impresa come una particolare forma di investimento (Onida, 1987) in cui, in tutto o in parte, il finanziamento degli investimenti sia stato effettuato facendo ricorso al capitale di terzi (cioè al capitale di finanziamento a titolo esplicitamente, o implicitamente, oneroso); in tale ambito la valutazione della sostenibilità si palesa nella quantificazione della capacità dell'investimento di generare flussi (reddituali e/o finanziari) in grado di compensare il costo, esplicito o implicito, di ricorso al capitale di terzi per il finanziamento del ciclo degli investimenti. La valutazione di sostenibilità degli investimenti assume rilievo, inoltre, nella valutazione del ciclo di gestione di imprese che abbiano effettuato investimenti e, in particolare, ove il livello di intensità di capitale sia elevato (come nel caso delle imprese attive nel settore agricolo), la valutazione di sostenibilità assume importanza, a fronte dell'elevato livello di investimento necessario per la generazione del valore della produzione dato dalla gestione d'impresa.

## **2. LA METODOLOGIA DI QUANTIFICAZIONE DEI FLUSSI E L'ANALISI DEI MARGINI REDDITUALI INTERMEDI**

L'analisi di sostenibilità degli investimenti, e/o del ciclo d'impresa, è effettuata facendo riferimento a rapporti tra valori di bilancio (indici) finalizzati a mettere in evidenza la capacità del ciclo d'impresa di far fronte al costo dell'indebitamento, cioè al costo del reperimento presso terzi di capitale di finanziamento a titolo oneroso ed al servizio del debito, cioè al costo del debito aumentato della quota capitale in restituzione del debito contratto. L'analisi di sostenibilità ha, inoltre, riferimento alla capacità della gestione d'impresa di far fronte alla restituzione del debito contratto tramite utilizzo di flussi reddituali, opportunamente quantificati, da utilizzare per il rimborso del debito contratto.

Al fine della valutazione di sostenibilità è necessario, in primo luogo, qualificare i dati di base necessari per l'effettuazione della valutazione. In tale ambito è opportuno distinguere tra imprese per le quali si abbia la disponibilità completa dei dati economici, patrimoniali e finanziari (quali imprese tenute alla redazione del bilancio d'esercizio e/o imprese per le quali si disponga del complesso dei dati citati, ad esempio per conoscenza diretta dei dati contabili di base) ed imprese per le quali si disponga solamente di una parte del complesso dei dati. Al variare delle situazione di disponibilità dei dati si ha la possibilità, e la necessità, di graduare in modo differente l'analisi, ed il livello di approfondimento dell'analisi stessa.

Nel caso in cui si abbia la completa disponibilità dei dati economici, patrimoniali e finanziari dell'impresa oggetto di analisi si ha la possibilità di proporre un'analisi approfondita e completa di sostenibilità. Infatti, la disponibilità completa dei dati permette di quantificare l'aggregato di flusso finanziario generato dalla gestione. Il flusso finanziario generato dalla gestione diviene quindi l'elemento centrale da porre a confronto, tramite indici di sostenibilità, con gli aggregati di costo del debito, servizio del debito e debito residuo, al fine della valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa. Il flusso finanziario rilevante al fine della valutazione di sostenibilità è il flusso finanziario disponibile per il servizio del debito, qualificato come unlevered free cash flow, cioè flusso di cassa disponibile per il servizio del debito (cioè prima del servizio dell'indebitamento, quindi unlevered). L'unlevered free cash flow ( $Ufcf^{\pm}$ ) è definito anche free cash flow to firm o free operating cash flow<sup>1</sup>, cioè flusso di cassa disponibile a favore dei portatori di capitale di debito (debtholders) e dei portatori di capitale di rischio, cioè il soggetto imprenditoriale detentore della proprietà dell'impresa (equityholders). Nel caso in cui l'aggregato di partenza sia il reddito operativo (EBIT) si esprime (Shireves et al., 2000) come segue:

$$(1) \quad Ufcf^{\pm} = EBIT^{\pm}(1 - t_m^+) + DA^+ - \Delta^{\pm}I_{cf} - \Delta^{\pm}I_{cc} + T_{da}^{\pm}$$

Nella (1)  $Ebit^{\pm}$  è reddito operativo (earning before interest and tax),  $t_m^+$  esprime l'aliquota marginale d'imposta dell'impresa analizzata,  $DA^+$  esprime svalutazioni ed ammortamenti (depreciation, amortization),  $\Delta^{\pm}I_{cf}$  esprime la variazione di investimenti in capitale fisso,  $\Delta^{\pm}I_{cc}$  esprime la variazione di investimenti in capitale circolante e  $T_{da}^{\pm}$  esprime le imposte differite ed anticipate (tax). La somma algebrica tra unlevered free cash flow e servizio del debito non discrezionale esprime il free cash flow to equity, quale flusso finanziario disponibile per la distribuzione ai portatori di capitale di rischio (equityholders). Nel caso in cui

---

<sup>1</sup> Sul tema della qualificazione e quantificazione dei flussi si considerino Albisetti R., 2000 e Brealey et. al., 2003.

l'aggregato di partenza sia il reddito operativo ( $EBIT^{\pm}$ ), la formula relativa al calcolo del free cash flow to equity è la seguente:

$$(2) \quad Fcfe^{\pm} = Ufcf^{\pm} + Cfd^{\pm}$$

Nella (2)  $Fcfe^{\pm}$  è free cash flow to equity,  $Ufcf^{\pm}$  è unlevered free cash flow e  $Cfd^{\pm}$  è cash flow utilizzato per il servizio del debito.

Al fine della valutazione di sostenibilità, effettuata utilizzando i flussi finanziari unlevered e levered in rapporto con aggregati di costo del debito, di servizio del debito e di debito residuo, diviene essenziale la disponibilità, preliminare, del complesso dei dati economici, patrimoniali e finanziari dell'impresa; infatti, per il calcolo della (1) si ha la necessità di disporre di informazioni relative alla variazione, tempo per tempo, di investimenti in capitale fisso ( $\Delta^{\pm}I_{cf}$ ) e in capitale circolante ( $\Delta^{\pm}I_{cc}$ ). Queste informazioni di dettaglio sono disponibili solo per quelle imprese, o per quelle situazioni di approfondimento di dati, in cui si abbia conoscenza della situazione patrimoniale di dettaglio dell'impresa, o dell'investimento, oggetto di analisi. Per le situazioni oggetto di analisi per le quali non si ha disponibilità delle situazioni patrimoniali, tempo per tempo, si ha la necessità di quantificare diversamente il concetto di flusso disponibile per la verifica della sostenibilità. Si consideri, in specifico, la situazione delle imprese agrarie per le quali, a fronte di specifiche semplificazioni negli obblighi di tenuta della contabilità, previste agli articoli 2214 e seguenti del codice civile, non vi è obbligo di tenuta del libro giornale; quindi, la contabilità delle imprese agrarie assume modalità di redazione semplificata, con i soli obblighi delle registrazioni contabili ai fini dell'imposta sul valore aggiunto (IVA), sulla base delle norme contenute nel DPR 633/1972. In tali imprese agrarie, ad eccezione delle imprese attive in forma di società di capitali, per le quali vi è, ex lege, un obbligo civilistico relativo alla redazione annuale del bilancio d'esercizio, non vi è obbligo civilistico di esplicitazione della componente patrimoniale del dato contabile d'impresa. Si ha quindi sovente, per mancanza di obbligo ex lege, assenza dei dati patrimoniali nelle imprese agrarie non attive in forma di società di capitali. Ove si intenda effettuare, per le imprese agrarie, una valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa, in assenza di dati di dettaglio di fonte riservata interna all'impresa, è necessario quantificare secondo una procedura alternativa il concetto di flusso disponibile per il pagamento del costo del debito, per il servizio del debito e per il rimborso del debito contratto.

In considerazione dell'assenza dei dati patrimoniali, attraverso cui pervenire alla quantificazione dei dati di flusso finanziario per la valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa, è necessario procedere, quindi, alla quantificazione di un aggregato reddituale che approssimi il livello di flusso finanziario generato dalla gestione, pur in assenza di dati finanziari di dettaglio. A tal fine, ove sia disponibile il conto economico dell'impresa oggetto di analisi è possibile, mediante la riclassificazione del dato economico di gestione, pervenire alla quantificazione di

risultati economici (reddituati) intermedi che approssimino la creazione di flussi finanziari per effetto della gestione.

Punto di avvio dell'analisi, ai fini della quantificazione di margini reddituali intermedi che approssimino il livello di creazione dei flussi finanziari per effetto della gestione, è la riclassificazione del conto economico dell'impresa secondo la metodologia definita a valore aggiunto; si tratta di una riclassificazione che adotta una classificazione per natura dei componenti positivi e negativi di reddito, quindi effettuabile anche dal lettore esterno del bilancio (si tratta, infatti, della riclassificazione tipicamente adottata dagli analisti degli istituti di credito, dunque esterni). La riclassificazione permette di evidenziare risultati economici intermedi tra cui, appunto, il valore aggiunto, cioè la ricchezza prodotta dall'impresa al netto dei costi esterni di produzione; si può quindi definire il valore aggiunto come il margine disponibile per la remunerazione dei fattori interni di produzione (Azzini, 1982).

**Tab. 1 – Conto economico riclassificato a valore aggiunto**

<b>CONTO ECONOMICO RICLASSIFICATO A VALORE AGGIUNTO</b>
A1) Ricavi delle vendite e delle prestazioni
A2) Variazioni delle rimanenze di prodotti in corso di lavorazione, semilavorati e finiti
A3) Variazioni dei lavori in corso su ordinazione
A4) Incrementi di immobilizzazioni per lavori interni
<b>Valore della produzione caratteristica</b>
B6) Costi per materie prime, sussidiarie, di consumo e di merci
B11) Variazioni delle rimanenze di materie prime, sussidiarie, di consumo e merci
<b>Consumo di materie prime</b>
<b>MARGINE SULLE MATERIE PRIME</b>
B7) Costi per servizi
B8) Costi per godimento di beni di terzi
<b>Altri costi esterni di produzione</b>
<b>VALORE AGGIUNTO</b>
B9) Costi per il personale
<b>Costi per il personale</b>
<b>MARGINE OPERATIVO LORDO (MOL) - EBITDA</b>
B10) Ammortamenti e svalutazioni
B12) Accantonamenti per rischi
B13) Altri accantonamenti
<b>Ammortamenti, svalutazioni, accantonamenti per rischi ed altri accantonamenti</b>
<b>RISULTATO DELLA GESTIONE CARATTERISTICA</b>
A5) Altri ricavi e proventi
B14) Oneri diversi di gestione
<b>Saldo delle gestioni accessorie</b>
<b>DIFFERENZA TRA VALORE E COSTI DELLA PRODUZIONE – REDDITO OPERATIVO (RO) - EBIT</b>
C15) Proventi da partecipazioni, con separata indicazioni di quelli relativi a imprese controllate e collegate
C16) Altri proventi finanziari
C17) Interessi e altri oneri finanziari ...
17 bis) Utili e perdite su cambi
<b>Totale proventi e oneri finanziari - Saldo della gestione finanziaria (SF)</b>
D18) Rivalutazioni
D19) Svalutazioni
<b>Totale rettifiche di valore di attività finanziarie</b>
E20) Proventi, con separata indicazione delle plusvalenze da alienazione
E21) Oneri, con separata indicazione delle minusvalenze da alienazione
<b>Totale delle partite straordinarie</b>
<b>RISULTATO PRIMA DELLE IMPOSTE</b>
Imposte sul reddito dell'esercizio, correnti, differite e anticipate
<b>UTILE (O PERDITA) DELL'ESERCIZIO</b>

Fonte: Pavarani, 2002, e nostre elaborazioni

Il primo margine reddituale intermedio evidenziato nella riclassificazione a valore aggiunto è il margine sulla materia prima, qualificato come differenza tra valore della produzione e consumo di materie prime, inclusa la variazione delle rimanenze di magazzino. Dal margine sulla materia, sommati algebricamente i costi per servizi ed i costi per godimento di beni di terzi, si ottiene il valore aggiunto (quale margine reddituale intermedio generato dall'impresa per effetto del processo di trasformazione, al netto dei costi esterni di produzione).

Si perviene poi al margine operativo lordo (MOL), definito anche EBITDA in terminologia anglosassone, che quantifica la quota di valore della produzione disponibile per la remunerazione degli investimenti effettuati in impresa attraverso ammortamenti, interessi passivi, generazione, ed eventuale distribuzione, di utile. Sommando algebricamente a EBITDA ammortamenti, svalutazioni ed accantonamenti per rischi si ottiene il risultato della gestione tipica; si tratta di un margine reddituale intermedio che esprime la ricchezza generata dall'impresa mediante le operazioni tipiche della gestione d'impresa. Attraverso la somma algebrica del risultato della gestione tipica e del risultato delle gestioni accessorie si perviene al reddito operativo, definito in terminologia anglosassone EBIT.

La riclassificazione a valore aggiunto analizza poi gli esiti economici relativi alle scelte di finanziamento, in termini di costi sostenuti per l'utilizzo del capitale di terzi e proventi per l'impiego, in attività finanziarie, delle risorse liquide a disposizione dell'impresa. Questi esiti sono sintetizzati nel saldo della gestione finanziaria, data dalla somma algebrica di proventi finanziari, di oneri finanziari, di utili e perdite su cambi.

Sono poi considerate le rettifiche di valore di attività finanziarie, quali rivalutazioni e svalutazioni, ed è considerata la gestione straordinaria, come somma algebrica di componenti positivi e negativi di reddito. Per somma algebrica del reddito operativo, del saldo della gestione finanziaria, delle rettifiche di valore di attività finanziarie e delle partite straordinarie si perviene alla quantificazione del risultato prima delle imposte.

Sommando algebricamente al risultato ante imposte gli oneri relativi alle imposte sul reddito dell'esercizio di competenza è calcolato, infine, l'utile (o la perdita) d'esercizio, cioè il profitto per la remunerazione degli apporti di capitale effettuati dal soggetto economico dell'impresa, quale portatore di capitale di rischio.

Nell'ambito della riclassificazione del conto economico secondo la metodologia a valore aggiunto, i margini reddituali intermedi EBITDA ed EBIT sono margini utilizzabili nella valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa.

Tra i margini considerati, l'EBITDA, calcolato sommando algebricamente al valore aggiunto il costo per il personale ed il costo degli accantonamenti, approssima il livello di liquidità generato dalla gestione corrente, per non considerazione di componenti negativi di reddito non monetari, cioè ammortamenti, svalutazioni ed accantonamenti per rischi. Si tratta quindi di un margine reddituale intermedio che, in assenza di quantificazione diretta dei flussi finanziari generati per effetto della gestione, ne approssima il livello attraverso una metodologia indiretta di quantificazione. Inoltre l'EBIT, quale reddito operativo, rappresenta il risultato



economico intermedio che evidenzia la capacità dell'impresa di remunerare gli investimenti attraverso la gestione corrente, come somma algebrica del risultato della gestione tipica e delle gestioni accessorie. Si tratta, in complesso, di margini reddituali intermedi che, comparati con i dati di costo del debito, servizio del debito ed indebitamento residuo, esprimono la sostenibilità del ciclo d'impresa per effetto, rispettivamente, della liquidità generata dalla gestione, approssimata da EBITDA, e per effetto dell'esito reddituale della gestione corrente, cioè EBIT.

### 3. GLI INDICI DI SOSTENIBILITÀ DEL CICLO D'IMPRESA

L'analisi di sostenibilità del ciclo d'impresa è finalizzata alla determinazione della capacità dell'impresa, e del progetto di investimento, di permanere nel tempo. Si tratta di un tipo di analisi che integra gli aspetti di analisi reddituale e patrimoniale, in quanto esprime l'attitudine dell'impresa a sviluppare, con continuità, il ciclo aziendale. L'analisi si sviluppa in particolare attraverso indici che pongono in rapporto valori economici e valori patrimoniali, con la comune finalità di un approfondimento sulla sostenibilità del ciclo aziendale. In primo luogo, per quanto riguarda la valutazione di sostenibilità del ciclo aziendale, sono calcolati indici finalizzati alla valutazione della capacità della gestione d'impresa di fare fronte al costo dell'indebitamento e restituire il debito contratto<sup>2</sup>.

Un primo indice di sostenibilità ( $S_1 - S_{OF}^{EBITDA}$ ) esprime la capacità dell'impresa di far fronte al costo dell'indebitamento finanziario oneroso (OF) mediante la creazione di liquidità per effetto della gestione (EBITDA). Si noti come l'indice, che pone in rapporto il margine operativo lordo (MOL o EBITDA in terminologia anglosassone), ed oneri finanziari (OF), esprima un rapporto tra un margine reddituale intermedio, quale EBITDA, che, pur essendo margine reddituale, approssima la creazione di liquidità per effetto della gestione d'impresa. L'indice, esposto in valore assoluto, esprime la capacità dell'impresa di far fronte, mediante creazione di reddito e, per traslato, di liquidità, al costo dell'indebitamento. La formulazione dell'indice è la seguente:

$$(3) \quad S_1 - S_{OF}^{EBITDA} = \left| \frac{EBITDA}{OF} \right|$$

L'indice, che esprime la capacità di sostenere il costo dell'indebitamento con l'esito reddituale della gestione operativa al netto di ammortamenti e svalutazioni, può variare da un valore minimo pari a zero (per assenza di EBITDA) ad un valore massimo che tende ad infinito. Solo nel caso in cui EBITDA sia maggiore rispetto agli oneri finanziari (valore quindi superiore ad uno dell'indice) l'impresa avrà

---

<sup>2</sup> Si noti come gli indici elencati nel corso della presente sezione del lavoro non hanno uno specifico appellativo in letteratura e sono stati quindi numerati progressivamente; la numerazione ha quindi solo significato ordinatorio nell'ambito del lavoro; segue alla numerazione, la qualificazione dell'indice.

possibilità di pagare il costo del debito oneroso (dovendo, in ogni caso, riservare liquidità per la copertura degli ulteriori componenti negativi di reddito, operativi, per ammortamenti e svalutazioni, e non operativi, e per l'eventuale remunerazione del patrimonio netto). Quindi, il valore soglia dell'indice, fissato ad uno, pare decisamente restrittivo (sul tema, tra gli altri, Pavarani, 2002) e sono auspicabili valori dell'indice superiori all'unità per la copertura delle ulteriori quote di componenti negativi di reddito. Si noti, altresì, come l'indice perda significato in caso di EBITDA negativo; si tratta di una situazione espressiva della crisi d'impresa nella componente economico industriale di produzione del reddito.

L'indice può essere espresso anche come rapporto tra EBITDA ed il saldo della gestione finanziaria (SF), secondo la formulazione seguente:

$$(4) \quad S_2 - S_{SF}^{EBITDA} = \left| \frac{EBITDA}{SF} \right|$$

Analoghe considerazioni valgono per l'indice ( $S_2 - S_{SF}^{EBITDA}$ ), in tema di valori che questo può assumere, come esposto per l'indice precedente ( $S_1 - S_{OF}^{EBITDA}$ ). Si noti, tuttavia, che in considerazione della valenza dell'indice, al fine di esprimere la capacità di sostenere il costo del debito, si considera, per ipotesi, che il saldo della gestione finanziaria (SF) esprima un saldo netto negativo, per prevalenza dei componenti negativi di reddito finanziario (quali oneri finanziari e perdite su cambi), rispetto ai componenti positivi di reddito finanziario (quali proventi finanziari e utili su cambi). Non si considera la situazione in cui il saldo della gestione finanziaria (SF) assuma segno positivo, situazione nella quale non avrebbe significato l'analisi di sostenibilità del costo del debito, per saldo della gestione finanziaria (SF) positivo e, quindi, di per sé già sostenibile.

È possibile inoltre, al fine di analizzare la capacità di rimborso del debito finanziario contratto, considerare il rapporto tra EBITDA ed il servizio del debito (DS 1) come segue:

$$(5) \quad S_3 - S_{DS1}^{EBITDA} = \left| \frac{EBITDA}{K + I} \right| = \left| \frac{EBITDA}{DS1} \right|$$

L'indice esprime la capacità dell'impresa di servire il debito contratto, con servizio del debito dato dalla quota capitale del debito (K) e dalla quota interessi (I). Solo nel caso in cui l'indice esposto nella (5) abbia valore assoluto superiore all'unità l'impresa, o il progetto di investimento, è in grado di far fronte al debito contratto per il finanziamento degli investimenti, generando flussi reddituali (e, per approssimazione dell'EBITDA, flussi finanziari) superiori rispetto al servizio del debito. Nel caso in cui l'indice abbia valore inferiore all'unità si rileverà una situazione in cui non si ha disponibilità di flussi sufficienti per far fronte al servizio del debito, con conseguente insostenibilità del servizio del debito.

Al fine dell'approfondimento della capacità dell'impresa di rimborsare l'indebitamento contratto si considera il rapporto tra EBITDA e debito finanziario residuo totale (D 1), intendendo per debito finanziario residuo totale il complesso dei debiti finanziari dell'impresa, tra cui debiti bancari a breve, medio e lungo termine. L'indice esprime la quota di debito finanziario che l'impresa è in grado di rimborsare per periodo (dopo aver fatto fronte al pagamento degli oneri finanziari). L'indice assume la seguente formulazione:

$$(6) \quad S_4 - S_{D1}^{\text{EBITDA}} = \left| \frac{\text{EBITDA}}{D1} \right|$$

All'aumentare del valore dell'indice si rileva un aumento della capacità della gestione dell'impresa di generare flussi a sostegno del rimborso del debito, con vantaggio per la sostenibilità del ciclo d'impresa.

È possibile approfondire la formulazione dell'indice prevista nella (6), sempre in tema di analisi della capacità di rimborsare l'indebitamento contratto, considerando un indice espressivo della capacità di generare flussi in grado di rimborsare il debito a rimborso programmato e scadenzato nel tempo tramite piani di ammortamento, cioè l'indebitamento a medio e lungo termine contratto tramite forma tecnica di mutuo e/o finanziamento. Si considera poi il rapporto tra EBITDA e debito finanziario residuo, per mutui e finanziamenti, (D 2). L'indice esprime la quota di debito finanziario, in ammortamento programmato, che l'impresa è in grado di rimborsare per periodo (dopo aver fatto fronte al pagamento degli oneri finanziari). L'indice assume la seguente formulazione:

$$(7) \quad S_5 - S_{D2}^{\text{EBITDA}} = \left| \frac{\text{EBITDA}}{D2} \right|$$

Come visto per l'indice esposto nella (6), anche l'indice esposto nella (7), ove evidenzi un aumento di valore, esprime un aumento della capacità della gestione dell'impresa di generare flussi a sostegno del rimborso del debito, con vantaggio per la sostenibilità del ciclo d'impresa.

Per un'analisi maggiormente prudentiale della capacità dell'impresa di far fronte al costo di reperimento di capitale di terzi viene utilizzato, in rapporto con il costo dell'indebitamento, un ulteriore margine reddituale derivante dal conto economico riclassificato. Si pone in rapporto il reddito operativo (EBIT) con gli oneri finanziari, al fine di esprimere la capacità dell'impresa di coprire il costo del debito oneroso con il reddito operativo, cioè il reddito generato dalla gestione corrente (caratteristica ed extra caratteristica). L'indice permette di quantificare l'attitudine dell'impresa a sostenere il costo dell'indebitamento con l'esito reddituale derivante dalla sola gestione operativa; l'indice assume la seguente formulazione:

$$(8) \quad S_6 - S_{OF}^{\text{EBIT}} = \left| \frac{\text{EBIT}}{OF} \right|$$

L'indice, che esprime la capacità di sostenere il costo dell'indebitamento con l'esito reddituale della gestione operativa, può variare da un valore minimo pari a zero (per assenza di EBIT) ad un valore massimo che tende ad infinito. Solo nel caso in cui EBIT sia maggiore rispetto agli oneri finanziari (valore quindi superiore ad uno) l'impresa avrà possibilità di pagare il costo del debito oneroso. Come visto per l'EBITDA, si noti come l'indice perda significato in caso di EBIT negativo; in una tale situazione, infatti, l'impresa non solo non sarà in grado di far fronte agli oneri finanziari, ma rileverà una situazione di reddito negativo a livello di gestione industriale. L'indice può essere espresso anche come rapporto tra EBIT ed il saldo della gestione finanziaria (SF), secondo la formulazione seguente:

$$(9) \quad S_7 - S_{SF}^{EBIT} = \left| \frac{EBIT}{SF} \right|$$

Analoghe considerazioni valgono per l'indice ( $S_7 - S_{SF}^{EBIT}$ ), in tema di valori che questo può assumere, come esposto per l'indice precedente ( $S_6 - S_{OF}^{EBIT}$ ).

È possibile inoltre, al fine di analizzare la capacità di rimborso del debito finanziario contratto, considerare il rapporto tra EBIT ed il servizio del debito (DS 1) come segue:

$$(10) \quad S_8 - S_{DS1}^{EBIT} = \left| \frac{EBIT}{K+I} \right| = \left| \frac{EBIT}{DS1} \right|$$

L'indice esprime la capacità dell'impresa di servire il debito contratto, con servizio del debito dato dalla quota capitale del debito (K) e dalla quota interessi (I), con il reddito operativo (EBIT). Solo nel caso in cui l'indice esposto nella (10) abbia valore assoluto superiore all'unità l'impresa, o il progetto di investimento, è in grado di far fronte al debito contratto per il finanziamento dell'attività d'impresa, generando flussi reddituali derivanti dalla gestione corrente superiori rispetto al servizio del debito.

Al fine dell'approfondimento della capacità dell'impresa di rimborsare l'indebitamento contratto si considera il rapporto tra EBIT e debito finanziario residuo totale (D 1), intendendo per debito finanziario residuo totale il complesso dei debiti finanziari dell'impresa, tra cui debiti bancari a breve, medio e lungo termine. L'indice esprime la quota di debito finanziario che l'impresa è in grado di rimborsare per periodo (dopo aver fatto fronte al pagamento degli oneri finanziari). L'indice assume la seguente formulazione:

$$(11) \quad S_9 - S_{D1}^{EBIT} = \left| \frac{EBIT}{D1} \right|$$

Infine, è possibile considerare il rapporto tra EBIT e debito finanziario residuo, per mutui e finanziamenti, (D 2). L'indice assume la seguente

formulazione:

$$(12) \quad S_{10} - S_{D2}^{\text{EBIT}} = \left| \frac{\text{EBIT}}{D2} \right|$$

L'indice esprime la quota di debito finanziario, in ammortamento programmato, che l'impresa è in grado di rimborsare per periodo (dopo aver fatto fronte al pagamento degli oneri finanziari).

È interessante notare come ai fini del calcolo degli indici di sostenibilità, come sopra esposti, è sufficiente disporre dei dati relativi al conto economico riclassificato, oltre ad alcuni dati di base relativi al livello di indebitamento dell'impresa, e dei piani di ammortamento del debito finanziario contratto. In questo modo, pur in assenza di dati di dettaglio patrimoniale, è possibile pervenire alla quantificazione della sostenibilità del ciclo d'impresa, anche in situazioni d'impresa per le quali non si dispone delle situazioni patrimoniali analitiche.

#### **4. ANALISI DEI DATI ECONOMICI DEL CASO D'IMPRESA ANALIZZATO**

L'impresa agraria analizzata, ed alla quale sono applicati gli indici di sostenibilità del ciclo d'impresa esposti nel paragrafo 3 del lavoro, è attiva nel comparto della zootecnica bovina da latte con produzione biologica. L'analisi dei dati dell'impresa ha riguardato i dati relativi agli anni 2006 e 2007; l'analisi è stata condotta sui dati resi disponibili dall'impresa e, tra questi, sono stati resi disponibili i dati economici di dettaglio, le sintesi dei dati dell'indebitamento finanziario e dei piani di ammortamento dei mutui e finanziamenti contratti dall'impresa. Non è disponibile la situazione patrimoniale di dettaglio.

L'impresa, a conduzione familiare con salariati in stalla, è localizzata nell'Appennino parmense, in zona collinare; la superficie aziendale è di 45,30 ha, parte in proprietà e parte in affitto. La mandria bovina è di 141 capi, di cui 81 vacche da latte. Il latte di produzione aziendale, pari a 682.200 litri nel 2007 e a 698.624 litri nel 2006, è stato trasformato in formaggio Parmigiano-Reggiano DOP nel caseificio aziendale a conduzione diretta; la produzione è stata di 1.280 forme di Parmigiano-Reggiano DOP nel 2007 e di 1.331 forme nel 2006. La produzione dell'impresa ha riguardato altresì burro, caciocotte, caci, ricotta e panna, con produzione sempre ottenuta per lavorazione diretta nel caseificio aziendale. Ai fini della differenziazione dell'indirizzo commerciale, ed al fine di ridurre la lunghezza della catena commerciale, mediante accesso diretto al mercato al consumo finale, l'impresa ha effettuato l'apertura di un punto vendita, a conduzione diretta, nel quale sono poste in vendita le produzioni lattiero/casearie effettuate nell'impresa, oltre ad altre produzioni alimentari per le quali l'impresa stessa effettua attività di commercializzazione, quali prodotti della salumeria locale, prodotti del comparto pastario, conserve vegetali, prodotti della pasticceria tipica e altre produzioni minori.

L'analisi dei dati economici dell'impresa è stata effettuata tramite redazione

del conto economico riclassificato, con riclassificazione a valore aggiunto. È stato possibile, in questo modo, pervenire non solo alla quantificazione del risultato d'esercizio determinato dalla gestione dell'impresa, ma pervenire, altresì, alla quantificazione del risultato reddituale per aggregati reddituali intermedi, tra cui EBITDA ed EBIT, anche al fine della successiva valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa, da effettuare tramite calcolo dei relativi indici di sostenibilità del ciclo d'impresa. Dall'analisi emerge come, a fronte di un valore della produzione in crescita dal 2006 al 2007, il risultato reddituale dell'impresa abbia fatto registrare una contrazione e si collochi, in ogni caso, su valori modesti, tanto in assoluto quanto in percentuale sul valore della produzione. Il risultato d'esercizio è infatti pari, rispettivamente per anno, al 3,16% ed a 1,62% del valore della produzione. A fronte di un esito reddituale modesto, ma in ogni caso positivo, è opportuno procedere ad un approfondimento in termini di elementi di genesi del risultato reddituale. Dai dati, esposti in tabella 2, emerge come i margini reddituali intermedi mostrino una forte contrazione di EBITDA, in calo da 20,72% a 11,37% del valore della produzione nel biennio. Il dato di contrazione del margine reddituale è determinato, in gran parte, da un forte incremento dei costi di acquisto delle materie prime, la cui incidenza è salita, nel periodo considerato, dal 31,69% al 40,56% del valore della produzione; in particolare, i dati di dettaglio della contabilità dell'impresa evidenziano un forte incremento di costo relativamente all'alimentazione della mandria bovina, a seguito dell'aumento di costo delle materie prime acquisite esternamente all'impresa per alimentazione, in particolare fieno e mangimi, tra cui farina di mais, nuclei proteici, orzo e soia. Il reddito operativo (EBIT) mostra anch'esso una contrazione, passando da 21,76% a 17,41% del valore della produzione nel biennio considerato; la contrazione dell'EBIT, meno accentuata rispetto ad EBITDA, è da ascrivere ad un contenimento di talune voci di costo per oneri diversi e per ammortamenti; questi risparmi di costo, uniti ad un lieve incremento degli "altri ricavi e proventi", classe A5) del conto economico civilistico qui riclassificato, ha consentito un parziale recupero della dinamica reddituale in termini di EBIT rispetto agli esiti reddituali in termini di EBITDA, come detto in forte regresso nel periodo considerato.

**Tab. 2 –Conto economico riclassificato a valore aggiunto del caso d'impresa analizzato**

CONTO ECONOMICO RICLASSIFICATO A VALORE AGGIUNTO	Anno 2007	Anno 2007	Anno 2006	Anno 2006
	€	%	€	%
A1 Ricavi delle vendite e delle prestazioni	625.515	101,49%	376.537	66,46%
A2 Variazioni delle rimanenze di prodotti in corso di lavorazione, semilavorati e finiti	(9.190)	-1,49%	190.039	33,54%
A3 Variazioni dei lavori in corso su ordinazione				
A4 Incrementi di immobilizzazioni per lavori interni				
<b>Valore della produzione caratteristica</b>	<b>616.325</b>	<b>100,00%</b>	<b>566.576</b>	<b>100,00%</b>
B6) Costi per materie prime, sussidiarie, di consumo e di merci	(249.982)	-40,56%	(179.542)	-31,69%
B11) Variazioni delle rimanenze di materie prime, sussidiarie, di consumo e merci				
<b>Consumo di materie prime</b>	<b>(249.982)</b>	<b>-40,56%</b>	<b>(179.542)</b>	<b>-31,69%</b>
<b>MARGINE SULLE MATERIE PRIME</b>	<b>366.343</b>	<b>59,44%</b>	<b>387.034</b>	<b>68,31%</b>
B7) Costi per servizi	(187.923)	-30,49%	(171.827)	-30,33%
B8) Costi per godimento di beni di terzi				
<b>Altri costi esterni di produzione</b>	<b>(187.923)</b>	<b>-30,49%</b>	<b>(171.827)</b>	<b>-30,33%</b>
<b>VALORE AGGIUNTO</b>	<b>178.420</b>	<b>28,95%</b>	<b>215.207</b>	<b>37,98%</b>
B9) Costi per il personale	(108.335)	-17,58%	(97.830)	-17,27%
<b>Costi per il personale</b>	<b>(108.335)</b>	<b>-17,58%</b>	<b>(97.830)</b>	<b>-17,27%</b>
<b>MARGINE OPERATIVO LORDO (MOL) - EBITDA</b>	<b>70.085</b>	<b>11,37%</b>	<b>117.377</b>	<b>20,72%</b>
B10) Ammortamenti e svalutazioni	(32.502)	-5,27%	(35.967)	-6,35%
B12) Accantonamenti per rischi				
B13) Altri accantonamenti				
<b>Ammortamenti, svalutazioni, accantonamenti per rischi ed altri accantonamenti</b>	<b>(32.502)</b>	<b>-5,27%</b>	<b>(35.967)</b>	<b>-6,35%</b>
<b>RISULTATO DELLA GESTIONE CARATTERISTICA</b>	<b>37.583</b>	<b>6,10%</b>	<b>81.410</b>	<b>14,37%</b>
A5) Altri ricavi e proventi	96.548	15,67%	82.098	14,49%
B14) Oneri diversi di gestione	(26.802)	-4,35%	(40.232)	-7,10%
<b>Saldo delle gestioni accessorie</b>	<b>69.746</b>	<b>11,32%</b>	<b>41.866</b>	<b>7,39%</b>
<b>DIFFERENZA TRA VALORE E COSTI DELLA PRODUZIONE - REDDITO OPERATIVO (RO) - EBIT</b>	<b>107.329</b>	<b>17,41%</b>	<b>123.276</b>	<b>21,76%</b>
C15) Proventi da partecipazioni, con separata indicazione di quelli relativi a imprese controllate e collegate				
C16) Altri proventi finanziari				
C17) Interessi e altri oneri finanziari ...	(97.341)	-15,79%	(105.362)	-18,60%
17 bis) Utili e perdite su cambi				
<b>Totale proventi e oneri finanziari - Saldo della gestione finanziaria (SF)</b>	<b>(97.341)</b>	<b>-15,79%</b>	<b>(105.362)</b>	<b>-18,60%</b>
D18) Rivalutazioni				
D19) Svalutazioni				
<b>Totale rettifiche di valore di attività finanziarie</b>				
E20) Proventi, con separata indicazione delle plusvalenze da alienazione				
E21) Oneri, con separata indicazione delle minusvalenze da alienazione				
<b>Totale delle partite straordinarie</b>				
<b>RISULTATO PRIMA DELLE IMPOSTE</b>	<b>9.988</b>	<b>1,62%</b>	<b>17.914</b>	<b>3,16%</b>
Imposte sul reddito dell'esercizio, correnti, differite e anticipate				
<b>UTILE (O PERDITA) DELL'ESERCIZIO</b>	<b>9.988</b>	<b>1,62%</b>	<b>17.914</b>	<b>3,16%</b>

Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali

Si evidenzia, inoltre, un forte peso degli oneri finanziari a deprimere l'esito reddituale della gestione; l'analisi del conto economico riclassificato evidenzia, infatti, oneri finanziari con incidenza del 18,70% e del 15,69%, rispettivamente, rilevati nel biennio 2006 e 2007. Un tale livello di costo del debito è stato determinato da un livello di indebitamento finanziario elevato, assestato intorno ai 2 milioni di Euro (come esposto in dettaglio nella successiva sezione di analisi), e da tassi passivi sul debito elevati, a fronte di scelte di finanziamento non opportune per forma tecnica (quali ricorso al debito a breve per il finanziamento di disallineamenti permanenti di cassa), ed a fronte di sconfinamenti sulle linee di credito, che hanno determinato l'applicazione di tassi di interesse punitivi per mora e per massimo scoperto. In tale situazione, il costo del debito ha inciso in modo negativo sulla redditività dell'impresa; infatti, a fronte dell'assenza di componenti di rivalutazione e straordinari, il saldo negativo della gestione finanziaria, per effetto del costo del debito, ha eroso quasi integralmente i già modesti esiti reddituali evidenziati da EBITDA ed EBIT, ponendo il risultato d'esercizio su un livello di modesta percentuale in rapporto al valore della produzione generata dall'impresa. Dall'analisi si rileva come la redditività dell'impresa, in presenza di investimenti elevati in ammodernamento delle strutture (quali stalla, caseificio, ufficio e punto vendita dell'impresa), abbia fatto segnare un esito modesto a seguito dell'elevato ricorso al capitale di terzi a titolo di finanziamento che ha inciso negativamente sulla

redditività dell'impresa per elevato costo del debito. In particolare nell'esercizio 2007 si è rilevata la contrazione dei margini reddituali già a livello di gestione operativa corrente a seguito, in primo luogo, dell' incremento dei costi di produzione delle materie prime per alimentazione zootecnica.

## 5. L'ANALISI DELLA SOSTENIBILITÀ DEL CICLO D'IMPRESA DEL CASO D'IMPRESA ANALIZZATO

Al fine della valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa del caso d'impresa analizzato è necessario, in via preliminare, considerare quali siano i valori rilevanti, dal punto di vista economico e patrimoniale, per la quantificazione degli indici di sostenibilità dell'impresa. Relativamente ai dati economici rilevanti, questi possono essere estrapolati dal conto economico riclassificato a valore aggiunto, come esposto in tabella 2 del presente lavoro.

**Tab. 3 – Dettaglio dei dati economici di base per la valutazione di sostenibilità del caso d'impresa analizzato**

	Anno 2007 €	Anno 2006 €
Margine Operativo Lordo (MOL) - EBITDA	70.085	117.377
Reddito Operativo (RO) - EBIT	107.329	123.276
Oneri finanziari (OF)	-97.341	-105.362
Saldo della gestione finanziaria (SF)	-97.341	-105.362

*Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali*

Assumono rilievo, e sono esposti in tabella 3, i valori di EBITDA ed EBIT, come detto, quali margini reddituali intermedi, ed i valori di costo del debito (oneri finanziari, OF) e di saldo della gestione finanziaria (SF). Si noti come, per assenza di proventi finanziari e per assenza di utili e perdite su cambi, si abbia equivalenza tra oneri finanziari e saldo della gestione finanziaria nel caso d'impresa considerato. Sia oneri finanziari che saldo della gestione finanziaria assumono valore negativo, quali componenti negativi di reddito, e per prevalenza dei componenti negativi di reddito, rispettivamente.

Al fine della valutazione di sostenibilità è altresì necessario proporre un approfondimento sui dati patrimoniali necessari per il calcolo degli indici. A tal fine è opportuno ricordare come, in assenza di dettagli di stato patrimoniale, si abbia ugualmente la necessità di disporre di informazioni di tipo patrimoniale relative al livello di indebitamento finanziario contratto dall'impresa per la realizzazione degli investimenti, oltre ad informazioni relative ai piani di ammortamento del debito contratto, per le necessità di calcolo degli indici di sostenibilità. Queste informazioni, rese disponibili dall'impresa oggetto di studio, sono esposte in tabella 4 ed esprimono la situazione del servizio del debito, la situazione debitoria dal punto di vista del debito finanziario totale e relativo al solo debito finanziario a medio e lungo termine in ammortamento per mutui e finanziamenti, relativamente al biennio 2006 e 2007.



I dati della tabella 4 evidenziano un aumento del servizio del debito da 111.241 Euro del 2006 a 131.759 Euro del 2007, ad esprimere un aumento delle necessità di generazione di flussi di copertura del servizio del debito nel biennio considerato al fine della sostenibilità del ciclo d'impresa. Relativamente al debito finanziario, residuo totale e residuo per mutui e finanziamenti, rispettivamente indici D 1 e D 2 della tabella 4, si evidenzia una riduzione nel corso del biennio, per utilizzo dei flussi di gestione in rimborso del debito, in ossequio ai piani di ammortamenti dei mutui e finanziamenti contratti dall'impresa.

**Tab. 4 – Dettaglio dei dati patrimoniali di base per la valutazione di sostenibilità del caso d'impresa analizzato**

	Anno 2007 €	Anno 2006 €
Servizio del debito finanziario (mutui e finanziamenti) - quota capitale	-88.759	-68.241
Servizio del debito finanziario (mutui e finanziamenti) - quota interessi	-43.000	-43.000
<b>DS 1 - Servizio del debito finanziario (mutui e finanziamenti)</b>	<b>-131.759</b>	<b>-111.241</b>
<b>D 1 - Debito finanziario residuo (totale debito finanziario)</b>	<b>-1.896.917</b>	<b>-2.033.531</b>
<b>D 2 - Debito finanziario residuo (mutui e finanziamenti)</b>	<b>-1.031.000</b>	<b>-1.119.759</b>

*Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali*

Al fine della valutazione di sostenibilità del caso d'impresa analizzato sono stati calcolati gli indici di sostenibilità, analizzati nel paragrafo 3 del presente lavoro, ed esposti nella tabella 5. Il rapporto tra EBITDA ed OF, e tra EBITDA e SF, indici  $S_1$  ed  $S_2$ , che assume il medesimo valore per coincidenza, nel caso d'impresa analizzato, tra OF e SF, evidenzia una critica contrazione nel biennio considerato; infatti, l'indice, pari a 1,114 nel 2006, ad esprimere una modesta capacità di copertura del costo del debito, per valori dell'indice su livelli di poco superiori all'unità, mostra una contrazione sotto il valore unitario soglia nel corso del 2007, con valore pari a 0,720; un tale valore dell'indice evidenzia la non capacità dell'impresa a far fronte al costo del debito con i flussi reddituali generati dall'EBITDA. Si rileva infatti, dall'analisi del conto economico riclassificato, esposto in tabella 2, che solo il saldo delle gestioni accessorie, positivo, consente all'impresa di pervenire ad un risultato reddituale positivo, pur su livelli modesti, a fronte di un costo del debito superiore, in valore assoluto, rispetto ad EBITDA. Il dato evidenzia, in ogni caso, una insostenibilità accentuata del ciclo di gestione dell'impresa nel caso analizzato, per la compresenza di esiti reddituali non soddisfacenti, segnalati dal modesto valore di EBITDA, cui si accompagna un costo del debito tale (OF e SF) da erodere completamente il già modesto margine reddituale espresso da EBITDA, come detto.

Analogo esito si evidenzia dal calcolo dell'indice che pone in rapporto EBITDA ed il servizio del debito (DS 1), indice  $S_3$ , sempre esposto in tabella 5; l'indice, che assume un valore pari a 1,055 nel corso dell'anno 2006, di poco superiore all'unità, evidenzia un drastico calo nel corso del 2007, con valore pari a

0,532, evidenziando la progressiva incapacità del ciclo reddituale a far fronte al servizio del debito contratto (quota capitale e quota interessi dei mutui e finanziamenti bancari, quali fonti di capitale di terzi, di finanziamento, a titolo oneroso esplicito in ammortamento). Il dato evidenzia quindi l'incapacità del ciclo gestionale dell'impresa analizzata a far fronte al debito contratto per effettuare gli investimenti. Si ha, cioè, una situazione in cui gli investimenti di miglioramento realizzati dal soggetto imprenditoriale titolare dell'impresa non hanno generato un esito reddituale sufficiente a far fronte al servizio del debito contratto. Quindi, la riduzione del debito finanziario rilevata esprime il solo parziale rispetto dei piani di ammortamento pattiziamente stabiliti con i soggetti finanziatori (istituti di credito), con conseguente messa in mora dell'impresa e applicazione di interessi moratori maggiorati rispetto al tasso passivo ordinario applicato su finanziamenti e mutui, pattiziamente stabilito, ad ulteriore detrimento della dinamica reddituale dell'impresa analizzata.

**Tab. 5 – Indici di sostenibilità del caso d'impresa analizzato**

	Anno 2007	Anno 2006
S <sub>1</sub>   EBITDA / OF	0,720	1,114
S <sub>2</sub>   EBITDA / SF	0,720	1,114
S <sub>3</sub>   EBITDA / DS 1	0,532	1,055
S <sub>4</sub>   EBITDA / D 1	0,037	0,058
S <sub>5</sub>   EBITDA / D 2	0,068	0,105
S <sub>6</sub>   EBIT / OF	1,103	1,170
S <sub>7</sub>   EBIT / SF	1,103	1,170
S <sub>8</sub>   EBIT / DS 1	0,815	1,108
S <sub>9</sub>   EBIT / D 1	0,057	0,061
S <sub>10</sub>   EBIT / D 2	0,104	0,110

*Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali*

Analizzando, sempre in analisi correlata ad EBITDA, la capacità dell'impresa di restituire il debito finanziario contratto per il finanziamento degli investimenti, indici di rapporto tra EBITDA e D 1, ed EBITDA D 2, S<sub>4</sub> ed S<sub>5</sub> rispettivamente, si evidenzia una modestissima capacità dell'impresa analizzata di restituire il debito contratto. L'impresa è infatti in grado di rimborsare, contando su un flusso reddituale dato dall'EBITDA, solo il 5,8%, nell'anno 2006, del debito finanziario totale contratto, dato che scende al 3,7% nel corso dell'anno 2007. Analogamente, l'impresa è in grado di rimborsare, contando su un flusso reddituale dato, anche in questo caso, dall'EBITDA, il 10,5%, nell'anno 2006, del debito finanziario contratto per mutui e finanziamenti bancari, dato che scende al 6,8% nel corso dell'anno 2007. Si noti come entrambi i citati indici non considerino l'aggravio di interessi passivi sull'EBITDA e, quindi, la capacità reale di rimborso del debito risulta ulteriormente ridotta. A tal fine potrebbe essere applicabile una formulazione, non frequente, che preveda il calcolo degli indici S<sub>4</sub> ed S<sub>5</sub> considerando, al numeratore,

EBITDA al netto del flusso negativo generato dagli oneri finanziari; questo permetterebbe di disporre di un valore reddituale fortemente approssimante un flusso finanziario unlevered, ad eccezione del servizio del debito in quota capitale, da porre a confronto, al numeratore, con il servizio del debito in sola quota capitale, al denominatore, per debito residuo, sia esso il totale del debito finanziario o il solo debito finanziario residuo per mutui e finanziamenti contratti dall'impresa.

Per un approfondimento in tema di sostenibilità del ciclo di gestione d'impresa in rapporto al reddito operativo, sono stati calcolati, relativamente al caso d'impresa, gli indici di sostenibilità, analizzati nel paragrafo 2 del presente lavoro, ed esposti nella tabella 5, anche relativamente all'EBIT. Tra questi, il rapporto tra EBIT ed OF, e tra EBIT e SF, indici  $S_6$  ed  $S_7$ , assumono il medesimo valore per coincidenza, nel caso d'impresa analizzato, tra OF e SF; entrambi gli indici assumono un valore di poco superiore al valore soglia unitario, pari a 1,170 nel 2007 e a 1,103 nel 2006. Si evidenzia una modestissima capacità della gestione reddituale corrente di far fronte al costo del debito; si evidenzia, anzi, il rilievo dell'impatto delle gestioni accessorie sulla redditività operativa quale momento gestionale positivo che risulta determinante nel pur modesto livello di sostenibilità del ciclo d'impresa. Analogamente modesto esito si evidenzia dal calcolo dell'indice che pone in rapporto EBIT ed il servizio del debito (DS 1), sempre esposto in tabella 5, qualificato con  $S_8$ . L'indice, che assume un valore pari a 1,108 nel corso dell'anno 2006, anche in questo caso di poco superiore all'unità, evidenzia un calo nel corso del 2007, con valore pari a 0,815, esprimendo l'incapacità del ciclo reddituale a far fronte al servizio del debito contratto (quota capitale e quota interessi dei mutui e finanziamenti bancari, quali fonti di capitale di terzi, di finanziamento, a titolo oneroso esplicito in ammortamento), come evidenziato anche dall'indice omologo calcolato con EBITDA al numeratore, precedentemente commentato e qualificato con  $S_3$ . Analizzando inoltre, sempre in analisi correlata ad EBIT, la capacità dell'impresa di restituire il debito finanziario contratto per il finanziamento del ciclo d'impresa, indici di rapporto tra EBIT e D 1, ed EBIT e D 2,  $S_9$  ed  $S_{10}$  rispettivamente, anche in rapporto all'EBIT, si evidenzia una modestissima capacità dell'impresa analizzata di restituire il debito contratto. L'impresa è infatti in grado di rimborsare, contando su un flusso reddituale dato dall'EBITDA, solo il 6,1%, nell'anno 2006, del debito finanziario totale contratto, dato che scende al 5,1% nel corso dell'anno 2007. Analogamente, l'impresa è in grado di rimborsare, contando su un flusso reddituale dato, anche in questo caso, dall'EBITDA, l'11,0%, nell'anno 2006, del debito finanziario contratto per mutui e finanziamenti bancari, dato che scende al 10,4% nel corso dell'anno 2007. Si noti come entrambi i citati indici non considerino l'aggravio di interessi passivi sull'EBIT e, analogamente rispetto a quanto detto per EBITDA, la capacità reale di rimborso del debito risulta ulteriormente ridotta, vi è la possibilità di applicare una formulazione, non frequente, che preveda il calcolo degli indici  $S_9$  ed  $S_{10}$  considerando, al numeratore, EBIT, come detto per EBITDA, al netto del flusso negativo generato dagli oneri finanziari, anche in questo caso al fine di disporre di un valore reddituale fortemente approssimante un flusso finanziario unlevered.

## 6. CONCLUSIONI

La valutazione di sostenibilità del ciclo di gestione d'impresa affianca le valutazioni di convenienza condotte attraverso indici di valutazione finanziaria e attraverso indici di bilancio finalizzati alla quantificazione della redditività d'impresa, secondo un approccio economico alla valutazione. La valutazione di sostenibilità assume un rilievo particolare nelle situazioni d'impresa caratterizzate da elevati investimenti, e da elevata intensità di capitale, e prevalente ricorso al capitale di terzi a titolo oneroso, per il finanziamento dell'attività d'impresa. Tale situazione caratterizza sovente le imprese agrarie, in primo luogo per caratterizzazione in intensità di capitale, e, secondariamente, per frequente importante accesso al capitale di terzi a titolo oneroso per il finanziamento degli investimenti. In tale ambito, l'analisi si è soffermata sul caso di un'impresa agraria attiva nel comparto della zootecnica bovina da latte per la produzione, in caseificio aziendale, di formaggio Parmigiano-Reggiano DOP, emerge che l'impresa, pur evidenziando un esito reddituale netto positivo, pur modesto, denuncia una insostenibilità del ciclo d'impresa. Gli investimenti effettuati, per l'ammodernamento delle strutture dell'impresa, sono stati finanziati, nel caso analizzato, con ricorso al capitale di terzi a titolo oneroso reperito presso il sistema del credito, anche grazie a elevati valori fondiari concessi a garanzia dall'impresa a favore dei finanziatori con privilegio ipotecario. L'elevato livello di indebitamento, unito al costo del debito elevato per tasso di interesse passivo applicato, hanno determinato, nel caso d'impresa analizzato, una quasi integrale erosione dell'esito reddituale di gestione per effetto degli oneri finanziari, la cui incidenza è stata del 18,60% e del 15,79% sul valore della produzione, nel biennio 2006 e 2007, rispettivamente, quale periodo oggetto di analisi. Gli indici di sostenibilità sono stati calcolati secondo una metodologia di calcolo che ne consente l'applicazione anche a situazioni d'impresa per le quali si dispone del dato economico di gestione e dei soli dati di debito finanziario ed ammortamento dei mutui e finanziamenti in essere; in questo modo è possibile la valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa anche per quelle imprese agrarie in cui, per semplificazioni concesse dal legislatore civilistico nazionale, non si provvede alla tenuta della contabilità d'impresa con finalità di quantificazione delle tavole patrimoniali attive e passive in dettaglio. Gli indici così calcolati evidenziano la difficoltà del ciclo reddituale dell'impresa di far fronte al pagamento del costo del debito, tanto in termini di EBITDA, quanto in termini di EBIT, per indici  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_5$ ,  $S_6$  rispettivamente, in particolare per il valore di  $S_1$  ed  $S_2$ , quali rapporti tra EBITDA ed oneri finanziari (OF) e tra EBITDA e saldo della gestione finanziaria (SF), rispettivamente, pari a 0,720 per il 2007, analogo per entrambi gli indici. L'insostenibilità del ciclo di gestione è evidenziata dalla difficoltà di servire il debito contratto per il finanziamento dell'attività d'impresa, indici  $S_3$  ed  $S_7$ , espressivi del rapporto tra EBITDA e servizio del debito (DS) e tra EBIT e servizio del debito (DS), rispettivamente, con valore particolarmente critico per  $S_3$  per il 2007, pari a 0,532. Modesta è anche la capacità di rimborsare il debito contratto per il finanziamento degli investimenti, come evidenziato dagli indici  $S_4$ ,  $S_5$  e  $S_9$ ,  $S_{10}$

calcolati in termini di EBITDA ed EBIT, rispettivamente, in rapporto al debito finanziario residuo totale (D 1) o al debito finanziario residuo a medio lungo termine in ammortamento (D 2). Gli indici citati,  $S_4$ ,  $S_5$  e  $S_9$ ,  $S_{10}$  evidenziano come l'impresa sia in grado di rimborsare, per anno, una quota del debito decisamente modesta, anche al di sotto del 10% annuo, pur senza considerare l'impatto degli oneri finanziari ad ulteriore detrimento della capacità di rimborso. Si evidenzia quindi, nel complesso, una situazione aziendale in cui gli investimenti effettuati, pur essendo in grado di generare una redditività netta positiva, pur modesta, sono caratterizzati da insostenibilità di pagamento del costo debito, di servizio del debito e da modesta capacità di rimborso del debito, con inevitabile deriva della gestione d'impresa verso il dissesto in assenza di futuri interventi di riassetto sulla gestione reddituale. Tali interventi devono tendere a ribaltare l'insostenibilità del ciclo d'impresa con azioni di riassetto volte alla generazione di crescenti flussi reddituali, superiori in valore assoluto a costo del debito, al servizio del debito e maggiormente incidenti sulla capacità di restituzione del debito contratto. In alternativa, l'azione di riassetto potrà riguardare, se possibile, la ridefinizione del ricorso al capitale di terzi di finanziamento, per costo del debito, mediante ricontrattazione con il sistema bancario dei tassi passivi e/o delle forme tecniche di finanziamento, per riduzione del costo del debito, o per apporto di capitale, con riduzione del peso del capitale di terzi a titolo oneroso sul totale delle fonti di finanziamento dell'impresa. Tale ipotesi potrebbe realizzarsi anche mediante apporto di ulteriore capitale da parte del soggetto imprenditoriale, con necessità di considerare, in questo caso, tuttavia, il costo opportunità connesso all'apporto di capitale proprio da parte dei soci, anche valutando la remunerazione, modesta, che il capitale proprio, di rischio, ottiene nel caso d'impresa analizzato, dato anche il connesso profilo di rischio alla specifica situazione d'impresa. Si consideri come per la quantificazione di sostenibilità del ciclo d'impresa possa essere utile integrare le analisi mediante calcolo di indici di rotazione del capitale e di durata del ciclo commerciale; peraltro, dette analisi sono effettuabili ove sia disponibile il complesso dei dati patrimoniali dell'impresa.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Alberici A. (1987), *L'analisi di bilancio per i fidi bancari*, Franco Angeli, Milano.
- 2) Albisetti R. (2000), *Finanza strutturata*, ETAS Libri, Milano.
- 3) Austin J.E. (1981), *Agro-industrial Project Analysis*, Johns Hopkins University Press, Baltimora.
- 4) Azzini L. (1982), *Economia aziendale*, Giuffrè, Milano.
- 5) Beaver W.H. (1966), "Financial Ratios as Predictors of Failure", *Journal of Accounting Research*, 4, 71-111.
- 6) Belli P., Anderson J.R., Barnum H.N., Dixon J.A., Tan J.P. (2001), *Economic Analysis of Investment Operations: Analytical Tools and Practical Applications*, World Bank, Washington D.C..
- 7) Benninga S. (2001), *Modelli finanziari*, McGraw-Hill, Milano.

- 8) Bergamin Barbato M., (a cura di), (1974), *Indici di bilancio e flussi finanziari*, ETAS Libri, Milano.
- 9) Bonazzi G., Iotti M. (2006), “Analisi per indici nell’impresa agraria”, *Annali Facoltà Medicina Veterinaria di Parma*, Anno XXV, 2005, Università degli Studi di Parma, Parma.
- 10) Bonazzi G., Iotti M. (2007), “La valutazione dei progetti di investimento: un’applicazione al comparto della lavorazione delle carni”, *Annali Facoltà Medicina Veterinaria di Parma*, Anno XXVI, 2006, Università degli Studi di Parma, Parma.
- 11) Bonazzi G., Iotti M. (2008), “La valutazione degli investimenti: un approfondimento attraverso l’analisi Life Cycle Cost (LCC) nell’impresa agraria”, *Annali Facoltà Medicina Veterinaria di Parma*, Anno XXVII, 2007, Università degli Studi di Parma, Parma.
- 12) Brealey R.A., Myers S.C., Sandri S. (2003), *Principi di finanza aziendale*, McGraw-Hill, Milano.
- 13) Brugger G. (1980), *L’analisi della dinamica finanziaria d’impresa*, Giuffrè, Milano.
- 14) Bubbio A. (1984), *Il sistema degli indici di bilancio e i flussi finanziari*, UNICOPLI, Milano.
- 15) Ceccacci G., Rigato C., Camanzi P. (2008), *Basilea 2 per le piccole e microimprese*, Edizioni FAG, Milano.
- 16) Fanni M. (2004), *Manuale di finanza dell’impresa*, Giuffrè, Milano.
- 17) Gittinger J.P. (1982), *Economic Analysis of Agricultural Projects*, John Hopkins University Press, Baltimore.
- 18) Mella P. (2001), *Indici di bilancio*, Il Sole 24 Ore, Milano.
- 19) Onida P. (1987), *Economia d’azienda*, UTET, Torino.
- 20) Pavarani E. (a cura di), (2002), *Analisi finanziaria*, McGraw-Hill, Milano.
- 21) Pavarani E. (a cura di), (2006), *L’equilibrio finanziario, Vol. I*, McGraw-Hill, Milano.
- 22) Pavarani E. (a cura di), (2006), *Pianificazione finanziaria, Vol. II*, McGraw-Hill, Milano.
- 23) Poddighe F. (2004), *Analisi di bilancio*, CEDAM, Padova.
- 24) Sciarelli S. (2004), *Fondamenti di economia e gestione delle imprese*, CEDAM, Padova.
- 25) Shireves R.E., Wachowicz J.M. (2000), *Free Cash Flow (FCF), Economic Value Added (EVA<sup>TM</sup>), and Net Present Value (NPV): A Reconciliation of Variations of Discounted-Cash-Flow (DCF) Valuation*, Tennessee University Press, Knoxville.
- 26) Yescombe E.R. (2002), *Principles of Project Financing*, Elsevier Academic Press, London.
- 27) Zappa G. (1950), *Il reddito d’impresa*, Giuffrè, Milano.

# **L'ANALISI DI SOSTENIBILITA' DEL CICLO DI GESTIONE D'IMPRESA: UN APPROFONDIMENTO SULLA DEFINIZIONE E SULL'IMPIEGO DEI FLUSSI FINANZIARI IN UN'IMPRESA DELLA MACELLAZIONE <sup>1</sup>**

## **SUSTAINABILITY ANALYSIS IN COMPANY BUSINESS CYCLE: A SURVEY ABOUT DEFINITION AND USE OF CASH FLOW APPLIED TO A SLAUGHTER FIRM**

Bonazzi Giuseppe - Iotti Mattia <sup>2</sup>

### **PAROLE CHIAVE:**

Sostenibilità dell'indebitamento, flussi finanziari, unlevered free cash flow, comparto della macellazione.

### **KEY WORDS:**

Debt sustainability, cash flows, unlevered free cash flow, slaughter industry.

### **SOMMARIO**

L'analisi di sostenibilità del ciclo di gestione d'impresa assume un rilievo particolare in situazioni d'impresa in cui, in tutto o in parte, la copertura finanziaria degli investimenti sia effettuata mediante ricorso al capitale di terzi. Al fine della effettuazione dell'analisi di sostenibilità è possibile porre in comparazione flussi reddituali (quali EBITDA ed EBIT), con valori espressivi del costo del debito, del servizio del debito e del debito residuo. Al fine di un approfondimento sull'analisi di sostenibilità finanziaria è tuttavia possibile considerare direttamente il valore di flusso finanziario generato dal ciclo di gestione, ponendo questo valore in comparazione (tramite il calcolo di indici) con i valori espressivi del costo del debito, del servizio del debito e del debito residuo. Al riguardo si utilizza l'unlevered free cash flow ( $Ufcf^+$ ) quale flusso finanziario disponibile o libero, free, per l'effettuazione di investimenti discrezionali, per il rimborso del debito finanziario e per il servizio del debito oltre che per la remunerazione del capitale proprio, di rischio, apportato dal soggetto imprenditoriale.

L'impresa analizzata, ed alla quale sono applicati gli indici di sostenibilità del ciclo d'impresa, è attiva nel comparto della macellazione, in prevalenza bovina, ed è localizzata in Italia nell'Emilia occidentale. L'analisi dell'impresa ha riguardato

---

1 Lo studio è frutto del lavoro comune dei due autori, tuttavia, in sede di stesura del testo Giuseppe Bonazzi ha redatto i paragrafi 1, 3, 4, 6 Mattia Iotti ha redatto i paragrafi 2, 5.

2 Sezione Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

i dati relativi agli anni 2005 e 2006, effettuando l'analisi sui bilanci d'esercizio comprensivi di nota integrativa. L'analisi assume interesse in quanto il comparto della macellazione, caratterizzato da investimenti di rilievo per la realizzazione degli impianti, ha fatto registrare negli ultimi anni una progressiva concentrazione che ha favorito alcune grandi imprese a livello nazionale che hanno attuato, progressivamente, una crescente concorrenza di prezzo sul servizio di macellazione. La situazione di incremento del livello di concorrenzialità sul mercato ha amplificato, per erosione dei margini reddituali, una già presente situazione di tensione finanziaria nel comparto, caratterizzato da distonia nel ciclo degli incassi e pagamenti.

All'impresa sono stati applicati indici di sostenibilità del ciclo di gestione, mettendo in rapporto il flusso finanziario generato dalla gestione (unlevered free cash flow), con valori espressivi del costo del debito (oneri finanziari e saldo della gestione finanziaria), del servizio del debito, del debito finanziario residuo totale e del debito finanziario residuo per mutui e finanziamenti.

Gli indici di sostenibilità, applicati al caso d'impresa e calcolati mediante analisi del bilancio d'esercizio, con preliminare redazione del rendiconto finanziario, evidenziano la capacità del flusso finanziario unlevered generato dall'impresa di far fronte al pagamento del costo del debito, anche se tale situazione appare, nel lungo periodo, tuttavia non sostenibile, in considerazione di una politica di dilazione dei pagamenti non attuabile costantemente, senza reazione in recupero del credito da parte dei fornitori. Al fine della quantificazione di sostenibilità è quindi possibile integrare le analisi condotte tramite indici di sostenibilità del ciclo di gestione d'impresa mediante calcolo dei differenti valori espressivi della creazione di liquidità finanziaria per effetto della gestione tra cui l'autofinanziamento potenziale e l'autofinanziamento reale.

## ABSTRACT

The sustainability analysis of the business cycle takes particular importance in situations in which business, in whole or in part, is financed using debt capital. In order to analyze the business sustainability, it is possible to compare income streams (such as EBITDA and EBIT), with values expressive of the cost of debt, debt service and outstanding debt. In order to improve the survey about financial sustainability, it is directly possible to consider cash flow values by the business cycle, having a direct comparison (by indices calculation) with the expressive values of the cost of debt, debt service and outstanding debt. In this case it is possible to use unlevered free cash flow ( $U_{fcf}^{\pm}$ ) as available cash flow (free), to achieve discretionary investments, to repay debt, to serve debt service or to have a return on equity provided by stakeholders.

In the paper are applied indices to a case study in order to analyze company business cycle sustainability; the analyzed firm works in the slaughter industry, especially in the bovine slaughter; the firm is localized in the western part of Emilia, in Italy. The analysis is based on 2005 and 2006 years data. The analysis is conducted on complete balance sheets including integrative note data. The analysis takes interest because the slaughter industry, characterized by great investment in



fixed asset, as plants, has achieved, in recent years, a high concentration level that has benefited some large national companies. These companies have gradually implemented an increasing price competition on the slaughter service. The situation of increasing competitiveness level has increased, because of a profit margins decreasing, an already tense financial situation in the industry, characterized by distonia in the cycle of cash receipts and payments.

In the paper, some indices are applied in order to analyze management cycle sustainability, comparing the cash flow generated by the company business (unlevered free cash flow), with values expressive of debt costs (as borrowing costs and balance of financial settlement), debt service, total financial debt and outstanding debt for loans and financing.

The indices of sustainability, applied in the case study, are calculated by analysis of balance sheet, with preliminary financial statements drafting; the indices show the ability of the unlevered free cash flow generated by the firm to pay the cost of debt, even if this situation appears, in the long run, however, not sustainable in view of a policy of deferral of payments that does not always feasible, without response in recovery of credit from suppliers.

In order to quantify the business sustainability, it could be possible to integrate sustainability business cycle analysis using values able to express financial liquidity level by business management, in which cash flow and operating cash flow.

## **1. PREMESSA**

L'analisi di sostenibilità del ciclo di gestione d'impresa, cioè l'analisi volta alla quantificazione dell'attitudine dell'investimento a perdurare nel tempo, poste le scelte di finanziamento effettuate dal soggetto imprenditoriale e/o dal soggetto manageriale gestore, assume un rilievo particolare in situazioni d'impresa, intendendo l'impresa come una particolare forma di investimento (Onida, 1987) in cui, in tutto o in parte, la copertura finanziaria degli investimenti effettuati sia stata effettuata mediante capitale di terzi (cioè capitale di finanziamento a titolo esplicitamente, o implicitamente, oneroso). Al fine della effettuazione dell'analisi di sostenibilità è possibile (Brealey et al., 2003) porre in comparazione, tramite calcolo di indici, flussi reddituali quali EBITDA ed EBIT, che approssimano il livello di creazione dei flussi finanziari, con valori espressivi del costo del debito, quali oneri finanziari, saldo della gestione finanziaria e simili, del servizio del debito, dato dalla quota capitale e dalla quota interessi di finanziamenti e mutui contratti e del debito residuo dato dal debito totale, dal debito finanziario, dalla posizione finanziaria netta e simili. Al fine di un approfondimento sull'analisi di sostenibilità finanziaria è possibile esprimere direttamente il valore di flusso finanziario generato dal ciclo della gestione d'impresa e ponendo questo valore in comparazione (tramite il calcolo di indici) con i valori espressivi del costo del debito, del servizio del debito e del debito residuo, come riassunti.

L'analisi di sostenibilità del ciclo di gestione d'impresa ha quindi una possibilità di approfondimento in tema di quantificazione e impiego dei flussi finanziari espressi direttamente e non, in via mediata, per approssimazione tramite margini reddituali intermedi. Una tale analisi ha il pregio di esprimere direttamente

il livello di flusso finanziario disponibile per la determinazione di sostenibilità del ciclo di gestione, senza necessità di approssimare il livello di creazione di flussi finanziari attraverso margini reddituali che ne approssimino il livello. È tuttavia da notare come una tale analisi necessiti della disponibilità del complesso dei dati (economici, patrimoniali e finanziari) della gestione dell'impresa da sottoporre ad analisi e, a tale riguardo, diviene necessario disporre dei dati del bilancio d'esercizio dell'impresa (comprendenti ex lege stato patrimoniale, conto economico e nota integrativa) e/o dei dati di dettaglio della contabilità d'impresa raccolti, ad esempio, attraverso intervista, in particolare nelle situazioni d'impresa in cui non vi è necessità alle redazione e presentazione del bilancio d'esercizio (quali le aziende agrarie in forma individuale e associata di società di persone, le imprese individuali commerciali, le società di persone commerciali).

Un tale approfondimento in merito all'analisi per flussi finanziari ha un interesse particolare nei comparti caratterizzati da elevata intensità di capitale (con necessità quindi di elevati investimenti, di particolare interesse per l'analisi ove finanziati con capitale di finanziamento), da stati di crisi (in particolare ove la crisi sia relativa ad aspetti finanziari, quali crisi di liquidità), da fisiologicamente elevati periodi di dilazione commerciale (in incasso e/o pagamento) a dilatare il ciclo finanziario di gestione e, di conseguenza, ad amplificare la necessità di attenzione al controllo della sostenibilità finanziaria di tesoreria.

## 2. LA QUANTIFICAZIONE DEI FLUSSI FINANZIARI

La quantificazione dei flussi finanziari è il momento di avvio di un'analisi volta alla determinazione della sostenibilità del ciclo d'impresa. Ove infatti i margini reddituali intermedi solo approssimano il livello di liquidità finanziaria generata dalla gestione d'impresa, i flussi finanziari esprimono questo livello in via diretta, non mediata da approssimazioni. Al fine di questa analisi è tuttavia necessaria la completa disponibilità dei dati economici, patrimoniali e finanziari dell'impresa oggetto di analisi. In una situazione di tale disponibilità, il flusso finanziario generato dalla gestione diviene quindi l'elemento centrale da porre a confronto, tramite indici di sostenibilità, con gli aggregati di costo del debito, servizio del debito e debito residuo, al fine della valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa.

Al fine della valutazione di sostenibilità, un primo approccio qualifica (Shireves et al., 2000), quale flusso finanziario rilevante al fine della valutazione di sostenibilità, il flusso finanziario disponibile per il servizio del debito e un flusso di cassa disponibile per il servizio del debito (cioè prima del servizio dell'indebitamento, quindi unlevered), è definito unlevered free cash flow ( $Ufcf^{e}$ ) cioè free cash flow to firm o free operating cash flow<sup>1</sup>. Tale flusso di cassa è disponibile a favore dei portatori di capitale di debito (debtholders) e dei portatori di capitale di rischio, cioè il soggetto imprenditoriale detentore della proprietà dell'impresa (equityholders). È possibile il calcolo di  $Ufcf^{e}$  avendo quale aggregato

---

<sup>1</sup> Sul tema della qualificazione e quantificazione dei flussi si considerino Albisetti R., 2000 e Brealey et. al., 2003.

di partenza il reddito operativo (EBIT); in tale situazione si esprime (Shireves et al., 2000) come segue:

$$(1) \quad Ufcf^{\pm} = EBIT^{\pm} (1 - t_m^+) + DA^+ - \Delta^{\pm} I_{cf} - \Delta^{\pm} I_{cc} + T_{da}^{\pm}$$

Nella (1)  $Ebit^{\pm}$  è reddito operativo (earning before interest and tax),  $t_m^+$  esprime l'aliquota marginale d'imposta dell'impresa analizzata,  $DA^+$  esprime svalutazioni ed ammortamenti (depreciation, amortization),  $\Delta^{\pm} I_{cf}$  la variazione di investimenti in capitale fisso,  $\Delta^{\pm} I_{cc}$  la variazione di investimenti in capitale circolante,  $T_{da}^{\pm}$  le imposte differite ed anticipate (tax). La somma algebrica tra unlevered free cash flow e servizio del debito non discrezionale esprime il free cash flow to equity ( $Fcfe^{\pm}$ ) cioè il flusso finanziario disponibile per la distribuzione ai portatori di capitale di rischio (equityholders), quantificato come segue:

$$(2) \quad Fcfe^{\pm} = Ufcf^{\pm} + Cfd^{\pm}$$

Nella (2)  $Fcfe^{\pm}$  è free cash flow to equity,  $Ufcf^{\pm}$  è unlevered free cash flow e  $Cfd^{\pm}$  è cash flow utilizzato per il servizio del debito.

Una seconda metodologia di calcolo dei flussi finanziari generati dalla gestione (Shireves et al., 2000) prevede la redazione del rendiconto finanziario della gestione d'impresa, quale tavola esplicativa della creazione e dell'assorbimento di flussi finanziari, per effetto delle distinte fasi della gestione d'impresa. Al fine dell'analisi delle distinte aree di creazione dei flussi finanziari nell'ambito della gestione d'impresa, come esposto anche in forma analitica alla tabella 1, è possibile suddividere la gestione d'impresa in tre aree e cioè l'attività operativa, il capitale circolante netto e l'attività di investimento. Ogni area contribuisce come segue alla creazione dei flussi finanziari, nell'ambito della gestione, partendo dall'aggregato del risultato d'esercizio, cioè profitto o reddito netto, quindi secondo una metodologia indiretta di esposizione del rendiconto finanziario:

$$(3) \quad Cf^{\pm} = \Pi^{\pm} + |Amm^{\pm}| + |Acc^{\pm}| + |Aas^{\pm}| - \mu Sf^{\pm}$$

Nella (3)  $Cf^{\pm}$  è cash flow (flusso di capitale circolante della gestione corrente o autofinanziamento potenziale),  $\Pi^{\pm}$  esprime il profitto,  $Amm^{\pm}$  gli ammortamenti,  $Acc^{\pm}$  gli accantonamenti,  $Aas^{\pm}$  gli altri accantonamenti e le svalutazioni,  $Sf^{\pm}$  il saldo della gestione finanziaria; il cash flow esprime una prima quantificazione della liquidità finanziaria generata dalla gestione al netto delle variazioni delle voci di capitale circolante, dell'attività di investimento e dell'attività finanziaria. Al fine di quantificare l'esito finanziario della gestione è possibile ampliare l'analisi tramite considerazione della variazioni delle voci di capitale circolante netto, come segue:

$$(4) \quad Ocf^{\pm} = Cf^{\pm} + |\Delta^- I_{cc}| - |\Delta^+ I_{cc}| = Cf^{\pm} \pm \Delta^{\mu} I_{ccn}$$

Nella (4)  $OCf^{\pm}$  è operating cash flow (cioè flusso di cassa dell'attività operativa o autofinanziamento reale),  $Icc$  esprime gli investimenti in capitale circolante,  $Iccn$  gli investimenti in capitale circolante netto quale somma algebrica del capitale circolante attivo e passivo; l'operating cash flow esprime la quantificazione della liquidità finanziaria generata dalla gestione considerando anche l'assorbimento di liquidità per effetto delle variazioni delle voci di capitale circolante, dell'attività di investimento e dell'attività finanziaria. Sommato algebricamente l'esito di liquidità della gestione dell'attività di investimento, si perviene alla quantificazione dell'unlevered free cash flow, come segue:

$$(5) \quad Ufcf^{\pm} = OCf^{\pm} - \mu \Delta^{\pm} Icf$$

Nella (5)  $Ufcf^{\pm}$  è unlevered free cash flow quale flusso finanziario di disponibile o libero, free, per l'effettuazione di investimenti discrezionali, per il rimborso del debito finanziario e per il servizio del debito, per la remunerazione del capitale proprio, di rischio, apportato dal soggetto imprenditoriale mentre  $Icf$  esprime gli investimenti in capitale fisso discrezionali.  $Ufcf^{\pm}$  esprime quindi la liquidità finanziaria generata dalla gestione dell'impresa. Nel caso in cui  $Ufcf^{\pm}$  sia positivo si ha un surplus finanziario da impiegare per la copertura del saldo della gestione finanziaria, per operazioni sul patrimonio, per l'incremento delle disponibilità liquide, per la copertura dei debiti finanziari; nel caso in cui si intenda utilizzare  $Ufcf^{\pm}$  per operazioni discrezionali, è altresì possibile effettuare nuovi investimenti finanziati con  $Ufcf^{\pm}$  oppure distribuire ai soci dividendi, ove presenti reddito netto positivo o riserve disponibili. All'opposto, ove  $Ufcf^{\pm}$  sia negativo si ha un fabbisogno (deficit) finanziario. La situazione presenta un livello di potenziale criticità in quanto vi è sovente la necessità di assorbimento di ulteriore liquidità finanziaria per effetto del saldo della gestione finanziaria e, quindi, il deficit finanziario deve essere ripianato tramite reperimento di nuovo debito finanziario (ove possibile e/o conveniente), tramite apporto da parte del soggetto imprenditoriale; in alternativa l'impresa deve affrontare una operazione di ristrutturazione (turnaround) che coinvolga scelte di riassetto patrimoniale e finanziario strutturali, anche con dismissioni di investimenti strategici, ricontrattazione del debito o, eventualmente, accesso alle procedure pre fallimentari e fallimentari.

Per la quantificazione dei flussi finanziari è sovente (Pavarani, 2002, Brealey et al., 2003) utilizzata l'esposizione in forma tabellare, mediante redazione del rendiconto finanziario.

La forma tabellare, analoga per formazione e quantificazione rispetto alla forma algebrica, ha il vantaggio di esprimere sinteticamente l'esito finanziario della gestione al lettore non differendo, per contenuto, dalla formulazione algebrica.

**Tab. 1 – Rendiconto finanziario**

<b>RENDICONTO FINANZIARIO - METODO INDIRETTO</b>
<b>ATTIVITA' OPERATIVA</b>
Risultato d'esercizio
Ammortamenti
Accantonamenti
Altri accantonamenti e svalutazioni
Saldo della gestione finanziaria
<b>FLUSSO DI CAPITALE CIRCOLANTE DELLA GESTIONE CORRENTE (AUTOFINANZIAMENTO POTENZIALE - CASH FLOW)</b>
<i>Variazione dei crediti commerciali</i>
<i>Variazione dei crediti infragruppo</i>
<i>Variazione dei crediti tributari e previdenziali</i>
<i>Variazione dei crediti verso altri</i>
Variazione dei crediti non finanziari
Variazione del magazzino
Variazione delle attività finanziarie che non costituiscono immobilizzazioni
Variazione dei ratei e risconti attivi
Variazione dei fondi per rischi ed oneri
Variazione del fondo TFR
<i>Variazione dei debiti commerciali</i>
<i>Variazione dei debiti infragruppo</i>
<i>Variazione dei debiti tributari e previdenziali</i>
<i>Variazione dei debiti verso altri</i>
Variazione dei debiti non finanziari
Variazione dei ratei e risconti passivi
<b>Variazione delle voci di capitale circolante netto</b>
<b>FLUSSO DI CASSA DELL'ATTIVITA' OPERATIVA (AUTOFINANZIAMENTO REALE - OPERATING CASH FLOW)</b>
<b>ATTIVITA' DI INVESTIMENTO</b>
Investimenti e disinvestimenti in immobilizzazioni immateriali
Investimenti e disinvestimenti in immobilizzazioni materiali
Investimenti e disinvestimenti in immobilizzazioni finanziarie
<b>Flusso di cassa dell'attività di investimento</b>
<b>SURPLUS (FABBISOGNO) FINANZIARIO (UNLEVERED FREE CASH FLOW - FREE CASH FLOW TO FIRM - FREE OPERATING CASH FLOW)</b>
<b>ATTIVITA' FINANZIARIA</b>
Investimento (copertura) del fabbisogno (surplus) finanziario dell'esercizio
Saldo della gestione finanziaria
Patrimonio netto (ad eccezione utile d'esercizio)
Disponibilità liquide
Debiti finanziari
<b>COPERTURA (IMPIEGO) FABBISOGNO (SURPLUS) FINANZIARIO DELL'ESERCIZIO</b>

*Fonte: Pavarani, 2002 e nostre elaborazioni*

### 3. L'IMPIEGO DEI FLUSSI FINANZIARI

Al fine della quantificazione della capacità dell'impresa di sostenere il costo della gestione finanziaria, servire il debito (capitale e interessi dei finanziamenti e mutui in essere) e rimborsare il debito finanziario è necessaria la comparazione, tramite indici, di un flusso di cassa al netto dell'indebitamento, cioè un flusso unlevered, quale  $U_{fc}^{\pm}$ , con i valori espressivi di costo, servizio e residuo debito. Questi indici, ove sia disponibile l'aggregato di dati di base necessari per la redazione del rendiconto finanziario e, quindi, la quantificazione di  $U_{fc}^{\pm}$ , consente

la valutazione diretta della sostenibilità del ciclo d'impresa, ad integrare un approccio di comparazione che utilizzi, in luogo di  $U_{fcf}^{\pm}$ , margini reddituali intermedi, quali EBITDA ed EBIT, in comparazione con i valori citati espressivi di costo, servizio e residuo debito.

È quindi possibile esprimere indici finalizzati alla valutazione della capacità della gestione d'impresa di fare fronte, mediante creazione di flussi finanziari unlevered, al costo dell'indebitamento e restituire il debito contratto<sup>2</sup>.

Un primo indice di sostenibilità ( $S_1 - S_{OF}^{U_{fcf}}$ ) esprime la capacità dell'impresa di far fronte al costo dell'indebitamento finanziario oneroso (OF) mediante la creazione di liquidità per effetto della gestione ( $U_{fcf}^{\pm}$ ):

$$(6) \quad S_1 - S_{OF}^{U_{fcf}} = \left| \frac{U_{fcf}^{\pm}}{OF} \right|$$

L'indice, che esprime la capacità di sostenere il costo dell'indebitamento con flussi reddituali unlevered, può variare da un valore minimo pari a zero (per assenza di flusso finanziario) ad un valore massimo che tende ad infinito. Solo nel caso in cui  $U_{fcf}^{\pm}$  sia maggiore rispetto agli oneri finanziari (valore quindi superiore ad uno dell'indice) l'impresa avrà possibilità di pagare il costo del debito oneroso. Si noti, altresì, come l'indice perda significato in caso di  $U_{fcf}^{\pm}$  negativo, essendo questa una situazione in cui l'impresa non ha capacità di sostenere il costo del debito per creazione di flussi finanziari negativi già a livello unlevered.

L'indice può essere espresso anche come rapporto tra  $U_{fcf}^{\pm}$  ed il saldo della gestione finanziaria (SF), secondo la formulazione seguente:

$$(7) \quad S_2 - S_{SF}^{U_{fcf}} = \left| \frac{U_{fcf}^{\pm}}{SF} \right|$$

Analoghe considerazioni valgono per l'indice esposto nella (7), in tema di valori che questo può assumere, come esposto per l'indice precedente, esposto nella (6). Si noti, tuttavia, che in considerazione della finalità dell'indice di esprimere la capacità di sostenere il costo del debito, si considera, per ipotesi, che il saldo della gestione finanziaria (SF) esprima un saldo netto negativo, per prevalenza dei componenti negativi di reddito finanziario (quali oneri finanziari e perdite su cambi), rispetto ai componenti positivi di reddito finanziario (quali proventi finanziari e utili su cambi). Non si considera la situazione in cui il saldo della gestione finanziaria (SF) assuma segno positivo, situazione nella quale non avrebbe significato l'analisi di sostenibilità del costo del debito, per saldo della gestione finanziaria (SF) positivo e, quindi, di per se già sostenibile.

---

<sup>2</sup> Si noti come gli indici elencati nel corso della presente sezione del lavoro non hanno uno specifico appellativo in letteratura e sono stati quindi numerati progressivamente; la numerazione ha quindi solo significato ordinatorio nell'ambito del lavoro; segue alla numerazione, la qualificazione dell'indice.

È possibile inoltre, al fine di analizzare la capacità di rimborso del debito finanziario contratto, considerare il rapporto tra  $Ufcf^{\pm}$  ed il servizio del debito (DS 1) come segue:

$$(8) \quad S_3 - S_{DS1}^{Ufcf} = \left| \frac{Ufcf^{\pm}}{K + I} \right| = \left| \frac{Ufcf^{\pm}}{DS1} \right|$$

L'indice esprime la capacità dell'impresa di servire il debito contratto, con servizio del debito dato dalla quota capitale del debito (K) e dalla quota interessi (I). Solo nel caso in cui l'indice esposto nella (8) abbia valore assoluto superiore all'unità l'impresa è in grado di far fronte al debito contratto per il finanziamento degli investimenti, generando flussi finanziari ( $Ufcf^{\pm}$ ) superiori rispetto al servizio del debito. Nel caso in cui l'indice abbia valore inferiore all'unità si rileverà una situazione in cui non si ha disponibilità di flussi sufficienti per far fronte al servizio del debito, con conseguente insostenibilità del servizio del debito.

Al fine dell'approfondimento della capacità dell'impresa di rimborsare l'indebitamento contratto si considera il rapporto tra  $Ufcf^{\pm}$  e debito finanziario residuo totale (D 1), intendendo per debito finanziario residuo totale il complesso dei debiti finanziari dell'impresa, tra cui debiti bancari a breve, medio e lungo termine. L'indice esprime la quota di debito finanziario che l'impresa è in grado di rimborsare per periodo (dopo aver fatto fronte al pagamento degli oneri finanziari). L'indice assume la seguente formulazione:

$$(9) \quad S_4 - S_{D1}^{Ufcf} = \left| \frac{Ufcf^{\pm}}{D1} \right|$$

All'aumentare del valore dell'indice si rileva un aumento della capacità della gestione dell'impresa di generare flussi a sostegno del rimborso del debito, con vantaggio per la sostenibilità del ciclo d'impresa.

È possibile approfondire la formulazione dell'indice prevista nella (9), sempre in tema di analisi della capacità di rimborsare l'indebitamento contratto, considerando un indice espressivo della capacità di generare flussi in grado di rimborsare il debito a rimborso programmato e scadenziato nel tempo tramite piani di ammortamento, cioè l'indebitamento a medio e lungo termine contratto tramite forma tecnica di mutuo e/o finanziamento. Si considera dunque il rapporto tra  $Ufcf^{\pm}$  e debito finanziario residuo per mutui e finanziamenti (D 2). L'indice esprime la quota di debito finanziario, in ammortamento programmato, che l'impresa è in grado di rimborsare per periodo (dopo aver fatto fronte al pagamento degli oneri finanziari). L'indice assume la seguente formulazione:

$$(10) \quad S_5 - S_{D2}^{Ufcf} = \left| \frac{Ufcf^{\pm}}{D2} \right|$$

Come visto per l'indice esposto nella (9), anche l'indice esposto nella (10), ove evidenzi un aumento di valore, esprime un aumento della capacità della gestione dell'impresa di generare flussi a sostegno del rimborso del debito, con vantaggio per la sostenibilità del ciclo d'impresa.

È infine possibile porre a confronto, tramite indice, il flusso finanziario unlevered con la posizione finanziaria netta ( $Pfn^{\pm}$ ), intesa come somma algebrica tra debiti finanziari e disponibilità liquide, come segue:

$$(11) \quad S_6 - S_{Pfn}^{Ufcf} = \left| \frac{Ufcf^{\pm}}{Pfn^{\pm}} \right|$$

Si noti come, anche nella (11), si utilizza la formulazione in valore assoluto e, al riguardo, è da considerare come l'indice perda significato tanto nella situazione in cui  $Ufcf^{\pm}$  assume valore negativo (per impossibilità di rimborso del debito in situazione di flusso unlevered negativo) quanto nella situazione in cui  $Pfn^{\pm}$  assuma valore positivo (per non necessità di rimborso del debito a fronte di un già presente eccesso di liquidità). L'indice esposto nella (11) esprime la quota percentuale di debito (posizione finanziaria netta) che l'impresa è in grado di rimborsare per anno, per effetto della gestione, tenendo quindi in considerazione le giacenze attive di liquidità (disponibilità liquide) presenti, quali riserva di liquidità.

#### 4. ANALISI DEI DATI ECONOMICI, PATRIMONIALI E FINANZIARI NEL CASO D'IMPRESA CONSIDERATO

L'impresa analizzata, ed alla quale sono applicati gli indici di sostenibilità del ciclo d'impresa esposti nel paragrafo 3 del lavoro, è attiva nel comparto della macellazione, in prevalenza bovina, nell'Emilia occidentale. L'impresa opera in concessione su una struttura di macellazione di proprietà pubblica sulla quale sono stati effettuati importanti investimenti di ammodernamento ed adeguamento alle norme sanitarie. L'attività dell'impresa si rivolge tanto al servizio di macellazione in se, quanto alla commercializzazione dei capi macellati, quindi con acquisto della vacca da sottoporre a macellazione.

L'analisi dei dati dell'impresa ha riguardato i dati relativi agli anni 2005 e 2006, effettuando l'analisi sui dati pubblici dei bilanci d'esercizio relativi, comprensivi di nota integrativa, come previsto ex lege, sulla base delle quali ricavare informazioni di dettaglio in merito alla composizione dei debiti e dei crediti, della posizione finanziaria netta, degli investimenti.

L'analisi assume interesse in quanto il comparto della macellazione, caratterizzato da investimenti di rilievo per la realizzazione degli impianti, ha fatto registrare negli ultimi anni una progressiva concentrazione a favore di alcune grandi imprese a livello nazionale che hanno attuato, progressivamente, una crescente concorrenza di prezzo sul servizio di macellazione. La situazione di incremento del livello di concorrenzialità sul mercato ha amplificato, per erosione dei margini reddituali, una già presente situazione di tensione finanziaria nel comparto, caratterizzato da distonia nel ciclo degli incassi e pagamenti. Infatti, le imprese del comparto, come l'impresa analizzata, sono sovente caratterizzate da tempi di incasso



dei crediti superiori rispetto ai tempi di pagamento dei debiti verso i fornitori; in acquisto, infatti, i pagamenti degli animali da sottoporre a macellazione sono sovente effettuati a pronti o con dilazione settimanale a sette giorni, raramente la dilazione è mensile. Di contro, gli incassi dei crediti verso clienti, in genere grandi imprese di commercializzazione o grande distribuzione, hanno tempi notevolmente amplificati, anche superiori a 120 giorni di dilazione di incasso. In tale contesto si analizzano gli esiti finanziari di gestione nel comparto della macellazione al fine della quantificazione della sostenibilità finanziario del ciclo di gestione nell'impresa analizzata.

Il punto di partenza dell'analisi è posto nella valutazione dei dati economici dell'impresa; a tal fine il bilancio d'esercizio dell'impresa, nella sezione del conto economico, ha avuto riclassificazione a valore aggiunto. È stato possibile, in questo modo, pervenire non solo alla quantificazione del risultato d'esercizio determinato dalla gestione dell'impresa, ma pervenire, altresì, alla quantificazione del risultato reddituale per aggregati reddituali intermedi.

**Tab. 2 – Conto economico riclassificato a valore aggiunto del caso d'impresa analizzato**

CONTO ECONOMICO RICLASSIFICATO A VALORE AGGIUNTO	Anno 2006	Anno 2006	Anno 2005	Anno 2005
	€	%	€	%
A1) Ricavi delle vendite e delle prestazioni	2.074.297	100,00%	2.728.779	100,00%
A2) Variazioni delle rimanenze di prodotti in corso di lavorazione, semilavorati e finiti				
A3) Variazioni dei lavori in corso su ordinazione				
A4) Incrementi di immobilizzazioni per lavori interni				
<b>Valore della produzione caratteristica</b>	<b>2.074.297</b>	<b>100,00%</b>	<b>2.728.779</b>	<b>100,00%</b>
B6) Costi per materie prime, sussidiarie, di consumo e di merci	(58.976)	-2,84%	(802.529)	-29,41%
B11) Variazioni delle rimanenze di materie prime, sussidiarie, di consumo e merci	8.197	0,40%	(1.260)	-0,05%
<b>Consumo di materie prime</b>	<b>(50.779)</b>	<b>-2,45%</b>	<b>(803.789)</b>	<b>-29,46%</b>
<b>MARGINE SULLE MATERIE PRIME</b>	<b>2.023.518</b>	<b>97,55%</b>	<b>1.924.990</b>	<b>70,54%</b>
B7) Costi per servizi	(1.672.827)	-80,65%	(1.282.808)	-47,01%
B8) Costi per godimento di beni di terzi	(208)	-0,01%	(150)	-0,01%
<b>Altri costi esterni di produzione</b>	<b>(1.673.035)</b>	<b>-80,66%</b>	<b>(1.282.958)</b>	<b>-47,02%</b>
<b>VALORE AGGIUNTO</b>	<b>350.483</b>	<b>16,90%</b>	<b>642.032</b>	<b>23,53%</b>
B9) Costi per il personale	(349.602)	-16,85%	(337.135)	-12,35%
<b>Costi per il personale</b>	<b>(349.602)</b>	<b>-16,85%</b>	<b>(337.135)</b>	<b>-12,35%</b>
<b>MARGINE OPERATIVO LORDO (MOL) - EBITDA</b>	<b>881</b>	<b>0,04%</b>	<b>304.897</b>	<b>11,17%</b>
B10) Ammortamenti e svalutazioni	(167.637)	-8,08%	(112.187)	-4,11%
B12) Accantonamenti per rischi				
B13) Altri accantonamenti				
<b>Ammortamenti, svalutazioni, accantonamenti per rischi ed altri accantonamenti</b>	<b>(167.637)</b>	<b>-8,08%</b>	<b>(112.187)</b>	<b>-4,11%</b>
<b>RISULTATO DELLA GESTIONE CARATTERISTICA</b>	<b>(166.756)</b>	<b>-8,04%</b>	<b>192.710</b>	<b>7,06%</b>
A5) Altri ricavi e proventi	140.410	6,77%		
B14) Oneri diversi di gestione	(49.914)	-2,41%	(47.796)	-1,75%
<b>Saldo delle gestioni accessorie</b>	<b>90.496</b>	<b>4,36%</b>	<b>(47.796)</b>	<b>-1,75%</b>
<b>DIFFERENZA TRA VALORE E COSTI DELLA PRODUZIONE - REDDITO OPERATIVO (RO) - EBIT</b>	<b>(76.260)</b>	<b>-3,68%</b>	<b>144.914</b>	<b>5,31%</b>
C15) Proventi da partecipazioni, con separata indicazione di quelli relativi a imprese controllate e collegate				
C16) Altri proventi finanziari	2.738	0,13%	293	0,01%
C17) Interessi e altri oneri finanziari ...	(96.946)	-4,67%	(48.827)	-1,79%
I7 bis) Utili e perdite su cambi				
<b>Totale proventi e oneri finanziari - Saldo della gestione finanziaria (SF)</b>	<b>(94.208)</b>	<b>-4,54%</b>	<b>(48.534)</b>	<b>-1,78%</b>
D18) Rivalutazioni				
D19) Svalutazioni				
<b>Totale rettifiche di valore di attività finanziarie</b>				
E20) Proventi, con separata indicazione delle plusvalenze da alienazione	45.000	2,17%	6.246	0,23%
E21) Oneri, con separata indicazione delle minusvalenze da alienazione	(51.375)	-2,48%	(12.497)	-0,46%
<b>Totale delle partite straordinarie</b>	<b>(6.375)</b>	<b>-0,31%</b>	<b>(6.251)</b>	<b>-0,23%</b>
<b>RISULTATO PRIMA DELLE IMPOSTE</b>	<b>(176.843)</b>	<b>-8,53%</b>	<b>90.129</b>	<b>3,30%</b>
Imposte sul reddito dell'esercizio, correnti, differite e anticipate	(13.375)	-0,64%	(22.476)	-0,82%
<b>UTILE (O PERDITA) DELL'ESERCIZIO</b>	<b>(190.218)</b>	<b>-9,17%</b>	<b>67.653</b>	<b>2,48%</b>

Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali

Dall'analisi emerge una decisa contrazione del valore della produzione caratteristica nel biennio considerato. A fronte della contrazione del valore della produzione si ha una netta diminuzione dei costi di acquisto delle materie prime, in primo luogo animali da sottoporre a macellazione, a fronte di un cambiamento della strategia dell'impresa che prevede, nell'anno 2006, la sostituzione della

macellazione in contro proprio (acquisto dell'animale, macellazione e successiva commercializzazione) con la macellazione in conto terzi (solo servizio di macellazione, in prevalenza). Di contro, i costi per servizi presentano un aumento in contro tendenza rispetto alla diminuzione del valore della produzione, a fronte dell'esternalizzazione parziale del servizio di manodopera connesso all'attività di macellazione svolta dall'impresa. Il cambio di indirizzo strategico di produzione non determina, tuttavia, un miglioramento degli esiti reddituali della gestione, come evidenziato dalla contrazione del valore aggiunto in valore assoluto e, soprattutto, con una contrazione più che proporzionale del valore aggiunto rispetto al valore della produzione, con valore aggiunto al 16,90% del valore della produzione nel 2006 rispetto al 23,53% del 2005.

La rigidità della struttura dell'impresa è evidenziata dalla sostanziale stabilità del costo del personale nel biennio (pur in una fase di contrazione del valore della produzione); detta rigidità contribuisce a determinare un esito reddituale intermedio (EBITDA) sostanzialmente nullo per il 2006 ed in forte contrazione rispetto al 2005 (11,17% il relativo rapporto tra EBITDA e valore della produzione). Anche il saldo della gestione finanziaria, nel corso del 2006, fa segnare un netto peggioramento in termini di esito reddituale rispetto all'anno precedente; infatti, il saldo della gestione finanziaria passa da un'incidenza, negativa, di 1,78% sul valore della produzione a 4,54% sul valore della produzione, sempre nel biennio considerato. Complessivamente, l'esito reddituale dell'esercizio 2006 evidenzia una perdita (reddito netto negativo) per 190.218 Euro, pari al 9,17% del valore della produzione, con segno negativo, in deciso regresso rispetto all'esercizio 2005 in cui si rileva un utile di esercizio, pur modesto, per 67.653 Euro, pari al 2,48% del valore della produzione.

**Tab. 3 – Stato patrimoniale riclassificato a liquidità ed esigibilità del caso d'impresa analizzato**

STATO PATRIMONIALE RICLASSIFICATO A LIQUIDITA' ED ESIGIBILITA'	Anno 2006		Anno 2005	
	€	%	€	%
<b>ATTIVO (IMPIEGHI / INVESTIMENTI)</b>				
Liquidità finanziarie immediate	229.466	8,68%	21.398	0,97%
Crediti commerciali entro 12 mesi	761.725	28,81%	655.312	28,72%
Crediti infragruppo entro 12 mesi	0	0,00%	0	0,00%
Crediti tributari e previdenziali entro 12 mesi	4.800	0,18%	0	0,00%
Crediti verso altri entro 12 mesi	92.022	3,48%	70.000	3,18%
Crediti non finanziari entro 12 mesi	858.547	32,47%	725.312	32,90%
Ratei e risconti attivi	2.670	0,10%	3.287	0,15%
Liquidità differite	861.217	32,57%	728.599	33,05%
Rimanenze di magazzino	8.407	0,32%	210	0,01%
<b>ATTIVO A BREVE</b>	<b>1.099.090</b>	<b>41,57%</b>	<b>750.207</b>	<b>34,03%</b>
Immobilizzazioni immateriali	1.399.604	52,94%	1.315.892	59,69%
Immobilizzazioni materiali	142.368	5,38%	135.595	6,15%
Immobilizzazioni finanziarie	2.913	0,11%	2.913	0,13%
Crediti immobilizzati	0	0,00%	0	0,00%
<b>ATTIVO IMMOBILIZZATO</b>	<b>1.544.885</b>	<b>58,43%</b>	<b>1.454.400</b>	<b>65,97%</b>
<b>TOTALE ATTIVO</b>	<b>2.643.975</b>	<b>100,00%</b>	<b>2.204.607</b>	<b>100,00%</b>
<b>PASSIVO E PATRIMONIO NETTO (FONTI DI FINANZIAMENTO)</b>				
Passività finanziarie immediate	624.029	23,60%	415.398	18,84%
Debiti commerciali entro 12 mesi	1.011.527	38,26%	683.336	31,45%
Debiti infragruppo entro 12 mesi	-	0,00%	-	0,00%
Debiti tributari e previdenziali entro 12 mesi	439.152	16,61%	313.440	14,22%
Debiti verso altri entro 12 mesi	137.634	5,21%	56.342	2,56%
Debiti non finanziari entro 12 mesi	1.588.313	60,07%	1.063.118	48,22%
Ratei e risconti passivi	57.577	2,18%	33.610	1,52%
Passività differite	1.645.890	62,25%	1.096.728	49,75%
<b>PASSIVO A BREVE</b>	<b>2.269.919</b>	<b>85,85%</b>	<b>1.512.126</b>	<b>68,59%</b>
Passività finanziarie consolidate	346.892	13,12%	482.458	21,88%
Debiti commerciali oltre 12 mesi	-	0,00%	-	0,00%
Debiti infragruppo oltre 12 mesi	-	0,00%	-	0,00%
Debiti tributari e previdenziali oltre 12 mesi	-	0,00%	-	0,00%
Debiti verso altri oltre 12 mesi	-	0,00%	-	0,00%
Debiti non finanziari oltre 12 mesi	-	0,00%	-	0,00%
Fondi per rischi ed oneri	2.000	0,08%	2.000	0,09%
Trattamento di fine rapporto lavoro subordinato	29.085	1,10%	21.726	0,99%
<b>PASSIVO CONSOLIDATO</b>	<b>377.977</b>	<b>14,30%</b>	<b>506.184</b>	<b>22,96%</b>
<b>MEZZI DI TERZI</b>	<b>2.647.896</b>	<b>100,15%</b>	<b>2.018.310</b>	<b>91,55%</b>
<b>PATRIMONIO NETTO</b>	<b>- 3.921</b>	<b>-0,15%</b>	<b>186.297</b>	<b>8,45%</b>
<b>TOTALE PASSIVO E PATRIMONIO NETTO</b>	<b>2.643.975</b>	<b>100,00%</b>	<b>2.204.607</b>	<b>100,00%</b>

Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali

A fronte di un esito reddituale modesto, è di interesse analizzare in sintesi la situazione patrimoniale dell'impresa analizzata, anche quale base dati rilevante ed esplicativa della successivamente analizzata dinamica finanziaria. In primo luogo si evidenzia un incremento degli investimenti, da 2,205 milioni di Euro circa a 2,644 milioni di Euro circa, pur in presenza di una situazione di contrazione del valore della produzione. Accentuato appare, tra gli investimenti, l'aumento dei crediti commerciali (pur in una situazione di contrazione del fatturato) e l'investimento in attività immobilizzate, in particolare immobilizzazioni immateriali espressive di manutenzioni straordinarie su beni di terzi (impianti e strutture in concessione alla società di macellazione). Da notare anche un evidente aumento della liquidità finanziaria disponibile rilevata a fine esercizio 2006. Tra le fonti di finanziamento dell'impresa vi è un significativo aumento delle passività finanziarie immediate, e dei debiti non finanziari tra cui, in particolare, i debiti commerciali di fornitura in scadenza entro 12 mesi. Significativa è, infine, la totale erosione del patrimonio netto per effetto dell'esito negativo di gestione rilevato nel corso del 2006.

Analizzati i dati economici e patrimoniali del caso d'impresa è necessario un approfondimento ai dati della gestione finanziaria, esposti in forma tabellare quale rendiconto finanziario alla tabella 4.

**Tab. 4 – Rendiconto finanziario (metodo indiretto) del caso d'impresa analizzato**

<b>RENDICONTO FINANZIARIO - METODO INDIRETTO</b>	<b>Anno 2006</b>
	<b>€</b>
<b>ATTIVITA' OPERATIVA</b>	
Risultato d'esercizio	(190.218)
Ammortamenti	127.637
Accantonamenti	0
Altri accantonamenti e svalutazioni	50.228
Saldo della gestione finanziaria	94.208
<b>FLUSSO DI CAPITALE CIRCOLANTE DELLA GESTIONE CORRENTE (AUTOFINANZIAMENTO POTENZIALE - CASH FLOW)</b>	<b>81.855</b>
<i>Variazione dei crediti commerciali</i>	<i>(146.413)</i>
<i>Variazione dei crediti infragruppo</i>	<i>0</i>
<i>Variazione dei crediti tributari e previdenziali</i>	<i>(4.800)</i>
<i>Variazione dei crediti verso altri</i>	<i>(22.022)</i>
<i>Variazione dei crediti non finanziari</i>	<i>(173.235)</i>
<i>Variazione del magazzino</i>	<i>(8.197)</i>
<i>Variazione delle attività finanziarie che non costituiscono immobilizzazioni</i>	<i>0</i>
<i>Variazione dei ratei e risconti attivi</i>	<i>617</i>
<i>Variazione dei fondi per rischi ed oneri</i>	<i>0</i>
<i>Variazione del fondo TFR</i>	<i>(2.869)</i>
<i>Variazione dei debiti commerciali</i>	<i>318.191</i>
<i>Variazione dei debiti infragruppo</i>	<i>0</i>
<i>Variazione dei debiti tributari e previdenziali</i>	<i>125.712</i>
<i>Variazione dei debiti verso altri</i>	<i>81.292</i>
<i>Variazione dei debiti non finanziari</i>	<i>525.195</i>
<i>Variazione dei ratei e risconti passivi</i>	<i>23.967</i>
<b>Variazione delle voci di capitale circolante netto</b>	<b>365.478</b>
<b>FLUSSO DI CASSA DELL'ATTIVITA' OPERATIVA (AUTOFINANZIAMENTO REALE - OPERATING CASH FLOW)</b>	<b>447.333</b>
<b>ATTIVITA' DI INVESTIMENTO</b>	
Investimenti e disinvestimenti in immobilizzazioni immateriali	(190.770)
Investimenti e disinvestimenti in immobilizzazioni materiali	(27.352)
Investimenti e disinvestimenti in immobilizzazioni finanziarie	0
<b>Flusso di cassa dell'attività di investimento</b>	<b>(218.122)</b>
<b>SURPLUS (FABBISOGNO) FINANZIARIO (UNLEVERED FREE CASH FLOW - FREE CASH FLOW TO FIRM - FREE OPERATING CASH FLOW)</b>	<b>229.211</b>
<b>ATTIVITA' FINANZIARIA</b>	
<b>Investimento (copertura) del fabbisogno (surplus) finanziario dell'esercizio</b>	
Saldo della gestione finanziaria	(94.208)
Patrimonio netto (ad eccezione utile d'esercizio)	0
Disponibilità liquide	(208.068)
Debiti finanziari	73.065
<b>COPERTURA (IMPIEGO) FABBISOGNO (SURPLUS) FINANZIARIO DELL'ESERCIZIO</b>	<b>(229.211)</b>

*Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali*

I dati evidenziano, per il 2006, un modesto autofinanziamento potenziale, per 82mila Euro circa, dunque decisamente insufficiente, in sé, per la copertura delle esigenze di gestione finanziaria dell'impresa (in primo luogo per il pagamento del saldo della gestione finanziaria). Interessante appare, di contro, l'esito delle variazioni delle voci di capitale circolante netto. Questo saldo di gestione della finanza dell'impresa, intermedio, evidenzia segno positivo per circa 365mila Euro, ad evidenziare una notevole creazione di liquidità nell'ambito della dinamica del capitale circolante. Si evidenzia, infatti, pur a fronte di un dilatarsi del credito commerciale, un più che proporzionale incremento dei debiti non finanziari, di fornitura in particolare; il dato evidenzia la capacità di traslare, nel corso del 2006, l'aumento dei crediti commerciali su un più che proporzionale incremento dei debiti commerciali di fornitura. In sostanza, l'impresa analizzata, a fronte di difficoltà di incasso, ha dilatato i tempi di pagamento in modo più che proporzionale creando liquidità finanziaria disponibile (autofinanziamento reale) per effetto della

dilatazione del ciclo del capitale circolante. Sul punto è tuttavia da notare come una tale strategia possa, da un lato, determinare azioni di recupero forzoso dei crediti da parte dei fornitori (con rischio di azioni esecutive di recupero dei crediti o, peggio, azioni volte alla dichiarazione di fallimento), e possa determinare, dall'altro, un aumento dei costi di fornitura, per addebito dei costi impliciti, finanziari, connessi alla dilazione di pagamento forzosamente, o pattizamente, concessa. Tale strategia dilatoria determina un autofinanziamento reale pari a 447mila Euro circa, decisamente superiore all'autofinanziamento potenziale, proprio per variazione positiva, per 365mila Euro circa, della variazione di capitale circolante con creazione di liquidità.

A fronte di una attività di investimento che assorbe liquidità finanziaria per 218mila Euro circa, l'unlevered free cash flow, quale misura del surplus finanziario, evidenzia un valore positivo, quindi con creazione di liquidità, per circa 229mila Euro, in controtendenza decisa rispetto al dato reddituale, che evidenzia una perdita, nello stesso anno, per circa 190mila Euro. L'utilizzo di tale liquidità finanziaria è per 94mila Euro circa destinata a copertura del saldo della gestione finanziaria, per 208mila Euro circa a creazione di disponibilità liquide, con 73mila Euro circa di aumento del debito finanziario; da notare la non coerenza di una scelta gestionale che privilegi l'accesso a nuovo debito finanziario (per 73mila Euro) a fronte di una disponibilità liquida crescente, e fortemente assorbente l'esito finanziario, positivo, della gestione.

## 5. LA SOSTENIBILITÀ FINANZIARIA NEL CASO D'IMPRESA CONSIDERATO

Al fine della valutazione di sostenibilità del ciclo d'impresa del caso d'impresa analizzato è necessario, in via preliminare, considerare quali siano i valori rilevanti, dal punto di vista economico e patrimoniale, per la quantificazione degli indici di sostenibilità dell'impresa. Relativamente ai dati economici rilevanti, questi possono essere estrapolati dal conto economico riclassificato a valore aggiunto, come esposto in tabella 2 del presente lavoro.

**Tab. 5 – Dettaglio dei dati finanziari di base per la valutazione di sostenibilità del caso d'impresa analizzato**

	Anno 2006 €
Flusso di capitale circolante della gestione corrente (Cf)	81.855
Flusso di cassa dell'attività operativa (OCf)	447.333
Surplus (fabbisogno) finanziario (Ufcf)	229.211
Oneri finanziari (OF)	-96.946
Saldo della gestione finanziaria (SF)	-94.208

*Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali*

Assumono rilievo, e sono esposti in tabella 4, i valori di cash flow (Cf<sup>±</sup>), operating cash flow (OCf<sup>±</sup>) ed unlevered free cash flow (Ufcf<sup>±</sup>) quali margini

finanziari espressivi di creazione di liquidità, ed i valori di costo del debito oneri finanziari, (OF) e di saldo della gestione finanziaria (SF). Si noti come, per presenza di proventi finanziari e per assenza di utili e perdite su cambi, si abbia non equivalenza tra oneri finanziari e saldo della gestione finanziaria nel caso d'impresa considerato. I valori di flusso finanziario citati esprimono valore positivo con creazione di liquidità finanziaria per effetto della gestione, mentre oneri finanziari e saldo della gestione finanziaria assumono valore negativo, quali componenti negativi di reddito anche per la prevalenza dei componenti negativi di reddito.

Al fine della valutazione di sostenibilità è altresì necessario proporre un approfondimento sui dati patrimoniali necessari per il calcolo degli indici. A tal fine è opportuno ricordare come, in assenza di dettagli di stato patrimoniale, si abbia ugualmente la necessità di disporre di informazioni di tipo patrimoniale relative al livello di indebitamento finanziario contratto dall'impresa per la realizzazione degli investimenti, oltre ad informazioni relative ai piani di ammortamento del debito contratto, per le necessità di calcolo degli indici di sostenibilità. Queste informazioni, presenti nella nota integrativa, sono espone in tabella 4 ed esprimono la situazione del servizio del debito, la situazione debitoria dal punto di vista del debito finanziario totale e relativo al solo debito finanziario a medio e lungo termine in ammortamento per mutui e finanziamenti, relativamente al biennio 2006 e 2007.

**Tab. 6 – Dettaglio dei dati patrimoniali di base per la valutazione di sostenibilità del caso d'impresa analizzato**

	Anno 2006 €
Servizio del debito finanziario (mutui e finanziamenti) - quota capitale	-135.566
Servizio del debito finanziario (mutui e finanziamenti) - quota interessi	-43.120
<b>DS 1 - Servizio del debito finanziario (mutui e finanziamenti)</b>	<b>-178.686</b>
<b>D 1 - Debito finanziario residuo (totale debito finanziario)</b>	<b>-970.921</b>
<b>D 2 - Debito finanziario residuo (mutui e finanziamenti)</b>	<b>-529.916</b>
<b>Pfn - Posizione finanziaria netta</b>	<b>-741.455</b>

*Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali*

I dati della tabella 6 evidenziano un servizio del debito (DS 1) per 178.686 Euro nel 2006. Relativamente al debito finanziario, totale e residuo rispettivamente, indici D 1 e D 2 della tabella 6, si evidenzia, un valore di 970.921 Euro e 529.916 Euro. La posizione finanziaria netta, quindi inclusiva delle giacenze attive in cassa o presso banche quale disponibilità liquida, è pari a 741.455. Tutti i valori esposti in tabella 6, e citati, hanno segno negativo ad esprimere la posizione debitoria che questi esprimono.

Al fine della valutazione di sostenibilità del caso d'impresa analizzato sono stati calcolati gli indici di sostenibilità, analizzati nel paragrafo 3 del presente lavoro, ed esposti nella tabella 7.

**Tab. 7 – Indici di sostenibilità del caso d'impresa analizzato**

	Anno 2007
S <sub>1</sub>   Ufcf / OF	2,364
S <sub>2</sub>   Ufcf / SF	2,433
S <sub>3</sub>   Ufcf / DS 1	1,283
S <sub>4</sub>   Ufcf / D 1	0,236
S <sub>5</sub>   Ufcf / D 2	0,433
S <sub>6</sub>   Ufcf / Pfn	0,309

Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali

Il rapporto tra  $Ufcf^{\pm}$  ed OF, e tra  $Ufcf^{\pm}$  e SF, indici S<sub>1</sub> ed S<sub>2</sub>, evidenzia un adeguato livello di copertura degli oneri finanziari, con indici entrambi superiori al valore soglia unitario, pari rispettivamente a 2,364 e 2,433 nel 2006, ad esprimere la capacità di copertura del costo del debito. Analogo esito si evidenzia dal calcolo dell'indice che pone in rapporto  $Ufcf^{\pm}$  ed il servizio del debito (DS 1), indice S<sub>3</sub>, sempre esposto in tabella 7; l'indice, che assume un valore pari a 1,283 nel corso dell'anno 2006, di poco superiore all'unità, evidenzia la capacità del ciclo finanziario a far fronte al servizio del debito contratto (quota capitale e quota interessi dei mutui e finanziamenti bancari, quali fonti di capitale di terzi, di finanziamento, a titolo oneroso esplicito in ammortamento). L'indice S<sub>3</sub> presenta valore inferiore rispetto ad S<sub>1</sub> ed S<sub>2</sub> per presenza, nel denominatore dell'indice, della quota capitale in rimborso, quale quota capitale del servizio del debito. Analizzando, sempre in analisi correlata ad  $Ufcf^{\pm}$ , la capacità dell'impresa di restituire il debito finanziario contratto per il finanziamento degli investimenti, indici di rapporto tra  $Ufcf^{\pm}$  e D 1, ed EBITDA D 2, S<sub>4</sub> ed S<sub>5</sub> rispettivamente, si evidenzia la capacità dell'impresa analizzata di restituire progressivamente il debito contratto. L'impresa è infatti in grado di rimborsare, contando su un flusso finanziario dato da  $Ufcf^{\pm}$ , il 23,6%, nell'anno 2006, del debito finanziario totale contratto. Analogamente, l'impresa è in grado di rimborsare, contando su un flusso finanziario dato, anche in questo caso da  $Ufcf^{\pm}$ , il 43,4%, nell'anno 2006, del debito finanziario contratto per mutui e finanziamenti bancari. Si noti come entrambi i citati indici non considerino l'aggravio di interessi passivi su  $Ufcf^{\pm}$  e, quindi, la capacità reale di rimborso del debito risulta ulteriormente ridotta (a tal fine potrebbe essere applicabile una formulazione, non frequente, che preveda il calcolo degli indici S<sub>4</sub> ed S<sub>5</sub> considerando, al numeratore,  $Ufcf^{\pm}$  al netto del flusso negativo generato dagli oneri finanziari, al fine di disporre di un valore reddituale fortemente approssimante un flusso finanziario unlevered, ad eccezione del servizio del debito in quota capitale, da porre a confronto, al numeratore, con il servizio del debito in sola quota capitale, al denominatore, per debito residuo, sia esso il totale del debito finanziario o il solo debito finanziario residuo per mutui e finanziamenti contratti dall'impresa). Infine, il rapporto tra  $Ufcf^{\pm}$  e posizione finanziaria netta, dato da S<sub>6</sub>, evidenzia come, nel corso del 2006, l'impresa sia in grado di rimborsare il 30,9% circa della posizione finanziaria netta stessa per effetto della creazione di flussi finanziari unlevered

(anche in questo caso è da notare come il flusso unlevered non consideri il peso del costo del debito che diminuirebbe ulteriormente la capacità di rimborso della posizione finanziaria netta).

## 6. CONCLUSIONI

La valutazione di sostenibilità del ciclo di gestione d'impresa integra le valutazioni di convenienza condotte attraverso indici di valutazione finanziaria e attraverso indici di bilancio sul tema della capacità dell'impresa di far fronte al costo del debito, al servizio del debito ed al rimborso del debito contratto. La valutazione di sostenibilità assume un rilievo particolare nelle situazioni d'impresa caratterizzate da elevati investimenti, e da elevata intensità di capitale, e prevalente ricorso al capitale di terzi a titolo oneroso, per il finanziamento dell'attività d'impresa. Inoltre, ove si rilevino crisi di comparto, per peggioramento degli esiti reddituali di gestione o per appesantimento della dinamica finanziaria, ad esempio connessa al ciclo degli incassi e pagamenti, l'analisi di sostenibilità diviene uno strumento essenziale, in affiancamento all'analisi reddituale, per valutare la capacità dell'impresa di permanere nel tempo, superando crisi di liquidità generate dal momento reddituale, o finanziario, sfavorevole a livello di comparto. Tale situazione ha caratterizzato, negli ultimi anni, le imprese del comparto della macellazione, in primo luogo per caratterizzazione in intensità di capitale, e, secondariamente, per frequente importante accesso al capitale di terzi a titolo oneroso per il finanziamento degli investimenti. Inoltre, data la crisi di mercato, e di liquidità che ha interessato il comparto, in particolare connessa al disallineamento del ciclo degli incassi rispetto al ciclo dei pagamenti, l'analisi di sostenibilità assume rilievo particolare nell'analisi di efficienza delle imprese del comparto. In tale ambito, l'analisi si è soffermata sul caso di un'impresa, in forma di società di capitali, attiva nel comparto della macellazione, in prevalenza bovina, operante nell'Emilia occidentale.

Dalle analisi condotte emerge che l'impresa, pur evidenziando un esito reddituale negativo evidenzia la sostenibilità del ciclo d'impresa a fronte di una dilatazione del ciclo del capitale circolante netto; tale situazione, pur permettendo all'impresa di reperire risorse finanziarie mediante posticipazione delle scadenze di pagamento, determina il rischio di azioni di recupero forzoso dei crediti da parte dei fornitori, in particolare nel caso di ulteriore procrastinarsi delle scadenze di pagamento.

Gli indici di sostenibilità, applicati al caso d'impresa e calcolati mediante analisi del bilancio d'esercizio, con preliminare redazione del rendiconto finanziario, evidenziano la capacità del flusso finanziario unlevered generato dall'impresa di far fronte al pagamento del costo del debito; gli indici  $S_1$  ed  $S_2$ , espressivi del rapporto tra unlevered free cash flow e oneri finanziari e saldo della gestione finanziaria, rispettivamente, assumono rispettivamente valore pari a 2,364 e 2,433 per il 2006. La sostenibilità del ciclo di gestione è evidenziata dalla possibilità, pur non ampia, di servire il debito contratto per il finanziamento dell'attività d'impresa; l'indice  $S_3$ , espressivo del rapporto tra unlevered free cash flow e servizio del debito, ha valore lievemente al di sopra della soglia unitaria nel 2006 e pari a 1,283. Si rileva la capacità dell'impresa di rimborsare il debito contratto per il finanziamento degli



investimenti, come evidenziato dagli indici  $S_4$  (rapporto tra unlevered free cash flow e debito finanziario totale residuo),  $S_5$  (rapporto tra unlevered free cash flow e debito finanziario residuo per mutui e finanziamenti) ed  $S_6$  (rapporto unlevered free cash flow e posizione finanziaria netta), con valori pari, rispettivamente, a 0,236, 0,433 e 0,309. Si evidenzia quindi, nel complesso, una situazione aziendale in cui il ciclo d'impresa, pur in una situazione di elevati investimenti effettuati, aumento della concorrenzialità sui prezzi del servizio di macellazione e dilazione del ciclo di incasso dei crediti, pur non essendo in grado di generare una redditività netta positiva, si caratterizza da attuale sostenibilità di pagamento del costo debito, di servizio del debito e da capacità di rimborso del debito; tale situazione appare, nel lungo periodo, non sostenibile, in considerazione di una politica di dilazione dei pagamenti non attuabile costantemente senza reazione in recupero del credito da parte dei fornitori e con non condivisibile accantonamento di quote di liquidità finanziaria a fine esercizio in cassa o su conti correnti bancari, come emergente dal dato di bilancio, a fronte di un ragionevole miglior impiego di dette somme per la riduzione del debito oneroso o per azioni di rientro parziale dell'esposizione debitoria di fornitura notevolmente ampliata nel corso dell'anno 2006. Al fine della valutazione di questi aspetti della sostenibilità del ciclo d'impresa è quindi possibile integrare le analisi condotte tramite indici di sostenibilità del ciclo di gestione d'impresa analizzando in dettaglio i differenti valori espressivi della creazione di liquidità finanziaria per effetto della gestione, tra cui l'autofinanziamento potenziale e l'autofinanziamento reale.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Alberici A. (1987), *L'analisi di bilancio per i fidi bancari*, Franco Angeli, Milano.
- 2) Albiseti R. (2000), *Finanza strutturata*, ETAS Libri, Milano.
- 3) Austin J.E. (1981), *Agro-industrial Project Analysis*, Johns Hopkins University Press, Baltimora.
- 4) Azzini L. (1982), *Economia aziendale*, Giuffrè, Milano.
- 5) Beaver W.H. (1966), "Financial Ratios as Predictors of Failure", *Journal of Accounting Research*, 4, 71-111.
- 6) Belli P., Anderson J.R., Barnum H.N., Dixon J.A., Tan J.P. (2001), *Economic Analysis of Investment Operations: Analytical Tools and Practical Applications*, World Bank, Washington D.C..
- 7) Benninga S. (2001), *Modelli finanziari*, McGraw-Hill, Milano.
- 8) Bergamin Barbato M., (a cura di), (1974), *Indici di bilancio e flussi finanziari*, ETAS Libri, Milano.
- 9) Bonazzi G., Iotti M. (2006), "Analisi per indici nell'impresa agraria", *Annali Facoltà Medicina Veterinaria di Parma*, Anno XXV, 2005, Università degli Studi di Parma, Parma.
- 10) Bonazzi G., Iotti M. (2007), "La valutazione dei progetti di investimento: un'applicazione al comparto della lavorazione delle carni", *Annali Facoltà Medicina Veterinaria di Parma*, Anno XXVI, 2006, Università degli Studi di Parma, Parma.

- 11) Bonazzi G., Iotti M. (2008), “La valutazione degli investimenti: un approfondimento attraverso l’analisi Life Cycle Cost (LCC) nell’impresa agraria”, *Annali Facoltà Medicina Veterinaria di Parma*, Anno XXVII, 2007, Università degli Studi di Parma, Parma.
- 12) Brealey R.A., Myers S.C., Sandri S. (2003), *Principi di finanza aziendale*, McGraw-Hill, Milano.
- 13) Brugger G. (1980), *L’analisi della dinamica finanziaria d’impresa*, Giuffrè, Milano.
- 14) Bubbio A. (1984), *Il sistema degli indici di bilancio e i flussi finanziari*, UNICOPLI, Milano.
- 15) Ceccacci G., Rigato C., Camanzi P. (2008), *Basilea 2 per le piccole e microimprese*, Edizioni FAG, Milano.
- 16) Fanni M. (2004), *Manuale di finanza dell’impresa*, Giuffrè, Milano.
- 17) Gittinger J.P. (1982), *Economic Analysis of Agricultural Projects*, John Hopkins University Press, Baltimore.
- 18) Mella P. (2001), *Indici di bilancio*, Il Sole 24 Ore, Milano.
- 19) Onida P. (1987), *Economia d’azienda*, UTET, Torino.
- 20) Pavarani E. (a cura di), (2002), *Analisi finanziaria*, McGraw-Hill, Milano.
- 21) Pavarani E. (a cura di), (2006), *L’equilibrio finanziario, Vol. I*, McGraw-Hill, Milano.
- 22) Pavarani E. (a cura di), (2006), *Pianificazione finanziaria, Vol. II*, McGraw-Hill, Milano.
- 23) Poddighe F. (2004), *Analisi di bilancio*, CEDAM, Padova.
- 24) Sciarelli S. (2004), *Fondamenti di economia e gestione delle imprese*, CEDAM, Padova.
- 25) Shireves R.E., Wachowicz J.M. (2000), *Free Cash Flow (FCF), Economic Value Added (EVA<sup>TM</sup>), and Net Present Value (NPV): A Reconciliation of Variations of Discounted-Cash-Flow (DCF) Valuation*, Tennessee University Press, Knoxville.
- 26) Yescombe E.R. (2002), *Principles of Project Financing*, Elsevier Academic Press, London.
- 27) Zappa G. (1950), *Il reddito d’impresa*, Giuffrè, Milano.

## **RUOLO DELLA MULTIFUNZIONALITA' SUL BUDGET DELL'AZIENDA AGRICOLA: UN CONTRIBUTO SPERIMENTALE<sup>1</sup>**

## **THE ROLE OF MULTIFUNCTIONALITY ON THE BUDGET OF THE FARM BUSINESS: AN EXPERIMENTAL CONTRIBUTION**

Ferri G.<sup>2</sup>

### **PAROLE CHIAVE:**

aziende zootecniche, strategie d'impresa, multifunzionalità, budget

### **KEY WORDS:**

livestock farm businesses, business strategies, multifunctionality, budget

### **RIASSUNTO**

La multifunzionalità rappresenta una delle chiavi strategiche di valorizzazione e sviluppo del settore agricolo nel prossimo futuro. Il settore primario, secondo l'Unione europea, non è più considerato per la sola funzione di produzioni di derrate alimentari, ma assume nuove importanti funzioni nella tutela e conservazione dell'ambiente e del territorio.

Ai fini della ricerca si è individuato un gruppo di aziende sulle quali effettuare l'analisi economica per la determinazione del reddito netto aziendale, suddiviso a sua volta in due sottogruppi: uno relativo alle aziende convenzionali e l'altro riferito alle aziende multifunzionali. Al primo sottogruppo appartengono le aziende che svolgono l'attività primaria tradizionale con l'ottenimento di derrate alimentari. Nel secondo sottogruppo abbiamo inserito le unità produttive che svolgono, oltre alla produzione primaria, le attività connesse che possono essere esercitate dall'imprenditore agricolo, così come riconosciuto dal D.L. n. 228 del 18 maggio 2001.

L'indagine mostra che dal punto di vista strutturale le aziende convenzionali sono maggiormente orientate all'intensificazione produttiva, mentre quelle multifunzionali favoriscono l'occupazione. L'esame dei dati economici evidenzia che il Reddito netto medio per ettaro SAU e per addetto familiare è superiore nelle aziende multifunzionali rispetto a quelle convenzionali.

Altro elemento importante che viene messo in luce è che i contributi comunitari incidono per più del 40% sul Reddito netto sia per le aziende multifunzionali

1 Lavoro eseguito con il finanziamento FIL (ex quota 60%).

2 Sezione Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

li che convenzionali, rappresentando un elemento fondamentale per il budget delle aziende agricole.

Si conferma pertanto che la multifunzionalità rappresenta una strategia vincente per migliorare il reddito delle aziende, in una fase congiunturale sfavorevole alle produzioni primarie tradizionali.

## **ABSTRACT**

Multifunctionality is one of the strategic keys to the upgrading and development of the farming sector in the near future. According to the European Union, the primary sector is no longer considered solely for its foodstuff producing function, but assumes new valuable functions in the protection and conservation of the environment and the territory.

For the purposes of the research, a group of farms was selected and an economic analysis was carried out on them with a view to determining the net corporate income, subdivided into two further sub-groups: one for conventional farm businesses and the other for multifunctional ones. The first sub-group consists of farms carrying out a traditional primary activity leading to the production of foodstuffs. The second group, on the other hand, consists of farms which, in addition to primary production, also carry out the connected activities which the agricultural entrepreneur is entitled to perform, as per Legislative Decree no. 228 of 18 May 2001.

The investigation demonstrates that from the structural standpoint the conventional farms are more production-intensive while multifunctional ones are more employment-intensive. An examination of the economic data shows that the mean net Revenue per hectare of UUA and per family worker is greater in multifunctional farm businesses than in conventional ones.

Another important element that emerged is that community contributions account for more than 40% of the net Income both for the multifunctional farms and for the conventional ones, representing a fundamental element for the budget of the farm businesses.

It is therefore confirmed that multifunctionality represents a winning strategy to improve the farm revenues, during this unfavourable economic trend for traditional primary production.

## **1. INTRODUZIONE**

La multifunzionalità dell'agricoltura rappresenta una delle chiavi strategiche di valorizzazione e sviluppo del settore. A livello nazionale l'Istat rileva le attività multifunzionali come quelle attività diverse da quelle prettamente agricole di coltivazione e allevamento ma ad esse connesse e svolte comunque mediante utilizzo di risorse dell'azienda o di suoi prodotti. Secondo l'Unione europea, il termine multifunzionalità illustra "il nesso fondamentale tra agricoltura sostenibile, sicurezza alimentare, equilibrio territoriale, conservazione del paesaggio e dell'ambiente, nonché garanzia dell'approvvigionamento alimentare" (1). Il settore primario non è più considerato per la sola funzione di produzioni di derrate alimentari, ma assume nuove

importanti funzioni nella tutela e conservazione dell'ambiente. Questo nuovo ruolo del mondo agricolo generato dalle indicazioni della politica agricola comunitaria (Pac) già a partire dagli anni 80, viene riconosciuto a livello di legislazione nazionale attraverso il D.L. n. 228/2001 che dà una nuova configurazione giuridica e funzionale all'impresa agraria e amplia il numero di attività che possono essere svolte dal settore agricolo (10).

In effetti, la politica agricola comunitaria ha cercato di incentivare l'ampio spettro di funzioni secondarie dell'agricoltura attraverso gli strumenti ricadenti sia nel primo che nel secondo pilastro della Pac. Anche nella più recente proposta di riforma, conosciuta come Health Check, la multifunzionalità in qualche modo fa da sfondo, pur non essendo mai esplicitamente nominata, al processo di diversificazione dei prodotti e dei redditi in agricoltura fortemente sostenuto dalla Commissione (11).

La modificazione normativa incoraggia in maniera decisa una grande apertura alle attività che possono essere attuate in ambito rurale, ma differenti dalla funzione produttiva primaria. Dall'altra parte la specializzazione produttiva ha portato ad aziende che per poter essere competitive hanno bisogno di far leva sulle cosiddette economie di scala, e quindi ampliare continuamente la base produttiva e le quantità ottenute al fine di ridurre i costi di produzione (12).

Tale evoluzione, che si è accompagnata negli anni ad un notevole calo del numero delle aziende agricole e della superficie agricola utilizzata (Sau), soprattutto nelle aree montane del nostro Appennino, rende difficile il permanere di attività agricole in aree marginali, in quanto troppo onerose in relazione alle minori produzioni ottenute. Ciò nonostante sono sorte delle realtà aziendali anche in questi territori, in controtendenza alla logica produttivistica, che hanno saputo cogliere le occasioni messe in atto dai nuovi orientamenti della politica agricola comunitaria e della legislazione nazionale. L'aiuto compensativo è stato spostato dapprima sull'ettaro coltivato, poi con l'ultima riforma della Pac (2003) è andato a beneficio diretto del produttore diventando un diritto nominativo e liberando lo stesso dal vincolo della produzione di determinate coltivazioni, lasciandogli la possibilità di scegliere quella più conveniente sul mercato.

Parallelamente sono stati introdotti degli aiuti per favorire la cosiddetta riforestazione con impianti di siepi o piante in montagna, ma anche in pianura. Dunque chi ha saputo cogliere le nuove opportunità che venivano prospettate a livello comunitario e nazionale ha iniziato ad affiancare alla produzione agricola tradizionale altre attività: dall'agriturismo, alla trasformazione di prodotti in azienda (formaggi, salumi, conserve vegetali, ecc), alla creazione di spacci aziendali, alla partecipazione ai mercati locali, ecc.

Con l'ultima verifica intermedia della Pac, l'Health Check, la Commissione europea ha presentato una serie di proposte giuridiche per la modifica dei regolamenti in vigore ed in particolare:

- il regime dei pagamenti diretti (regolamento Ce n. 1782/2003);
- gli strumenti di mercato (regolamento Ce n. 1234/2007);
- la politica di sviluppo rurale (regolamento Ce n. 1698/2005)

Le modifiche dovrebbero portare all'abolizione degli strumenti di mercato, (salvo alcune rare eccezioni), all'eliminazione del set-aside e del regime delle quote latte

per arrivare ad una più completa liberalizzazione del mercato (2).

Il 20 novembre del 2008, dopo gli incontri bilaterali tra Commissione e stati membri, è stato siglato il compromesso sulle proposte di variazione dei regolamenti che dovrebbero essere approvati al più presto dal Consiglio europeo (8).

## 2. LE STRATEGIE DELLE IMPRESE CONVENZIONALI E MULTIFUNZIONALI

L'Istat nel 2007 ha rilevato 1,7 milioni di aziende agricole con una superficie media di 12,7 ettari di Sau. Il confronto con i dati del censimento generale dell'agricoltura del 2000 evidenzia un calo del 22 % delle unità produttive e del 2,4 % della Sau, ed un conseguente aumento delle dimensioni medie aziendali del 25% (6).

Anche nel settore specifico della produzione di latte bovino si assiste ad un'analogha crescita dimensionale degli allevamenti nel periodo considerato.

**Tabella 1:** Evoluzione della zootecnia da latte in Italia (1990-2007).

Anno	Vacche da latte (milioni)	Allevamenti da latte (n)	Capi per allevamento (n)
1990	2.642	206.368	12,8
2000	1.772	79.806	22,2
2003	1.714	65.525	26,2
2005	1.691	59.234	28,6
2007	1.702	60.627	28,1
Var% 2007/2005	0,7	2,4	1,7
Var% 2007/2000	-3,9	-24,0	26,5

Fonte: Istat, *IV e V Censimento generale Agricoltura e indagini annuali strutture*

Questo andamento evidentemente è dovuto al calo del prezzo del latte che ha costretto i produttori a lavorare ancor più intensamente sul controllo e sulla riduzione dei costi, modernizzando le strutture e aumentando considerevolmente la dimensione aziendale, per potersi avvalere delle necessarie economie di scala.

Parallelamente all'evoluzione delle aziende zootecniche da latte che puntano sull'incremento delle mandrie e delle rese produttive per affrontare il futuro, vi è un'altro gruppo di imprese che, oltre a credere nelle economie di dimensione, ha investito sullo sviluppo della propria produzione trasformando e vendendo i prodotti in azienda e offrendo nuovi servizi come agriturismo o fattorie didattiche: si tratta delle realtà cosiddette multifunzionali.

L'evoluzione delle aziende che possono dirsi multifunzionali è stata notevole in Italia; se consideriamo ad esempio le imprese che svolgono agriturismo, queste sono passate da circa 6.000 nel 1985 a 16.765 del 2006.

Anche la produzione biologica ha avuto un ruolo molto importante e riconosciuto nella valorizzazione dell'agricoltura come produttrice di esternalità positive

per l'intera collettività. Si tratta di produzioni ottenute senza l'utilizzo di prodotti chimici di sintesi (concimi, prodotti fitosanitari), ma utilizzando esclusivamente prodotti naturali. Questa modalità di produrre riconosciuta da due regolamenti comunitari (regolamenti Ce n. 834/2007 che ha sostituito il regolamento Ce n. 2092/1991, e n. 1804/1999) ha visto la superficie quintuplicare in Italia in 11 anni, passando dai circa 200.000 ettari del 1995 a 1.147.459 ettari del 2006.

Tra i benefici attesi dal settore agricolo vi è anche la realizzazione di prodotti di qualità, riconosciuti a livello comunitario dai regolamenti Ce n. 510/2006 e n. 509/2006 con la Denominazione di Origine Protetta (Dop), la Indicazione Geografica Protetta (Igp) e la Specialità Tradizionale Garantita (Stg). Si tratta di certificazioni volontarie attraverso le quali il produttore mira a garantire al consumatore determinate caratteristiche relativamente all'origine e alla trasformazione dei propri prodotti. Nel 2007 le denominazioni di origine in Italia sono arrivate al considerevole numero di 172. La maggior parte di queste sono rappresentate da produzioni vegetali, oli extra vergine di oliva, formaggi e salumi (4).

Si delineano dunque due diverse comportamenti delle aziende al mutare delle condizioni economiche. Le imprese convenzionali hanno continuato la produzione dei beni agricoli primari intensificando la produttività ed ampliando le proprie dimensioni. Le realtà multifunzionali hanno diversificato i beni prodotti per rispondere alle mutate richieste del mercato, e hanno cercato il rapporto diretto col consumatore attraverso nuove forme di commercializzazione: la vendita diretta in azienda, la partecipazione a fiere e mercati, la partecipazione ai Farmer Market, la vendita con rappresentanti, ecc.(3).

### **3. L'INDAGINE AZIENDALE**

#### **3.1 Premessa**

Per poter verificare gli effetti prodotti dall'introduzione della multifunzionalità sulle aziende agricole si è individuato un gruppo di aziende zootecniche sulle quali effettuare l'analisi economica. All'interno del gruppo sono stati individuati due sottogruppi, quello delle aziende convenzionali e quello delle aziende multifunzionali, che saranno posti a confronto tra loro per valutare i risultati economici generati dalle diverse scelte aziendali.

L'individuazione delle aziende è avvenuta avendo cura di prendere in esame realtà produttive di dimensioni e potenzialità tali da poter affrontare le sfide future e i cambiamenti proposti dalla nuova Pac. Le aziende del gruppo sono state individuate all'interno del territorio della regione Emilia-Romagna. In particolare ci siamo limitati ad analizzare aziende collocate in due province limitrofe, Parma e Reggio Emilia. Le aziende sono state selezionate tra quelle il cui indirizzo produttivo prevalente è la produzione di latte per la trasformazione in Parmigiano-Reggiano, produzione rappresentativa della realtà zootecnica di queste due province. Solo un'azienda tra quelle individuate produce latte destinato, dopo la trasformazione industriale, al consumo diretto.

All'interno del Comprensorio di produzione del Parmigiano-Reggiano la

maggior parte degli allevamenti sono dediti alla produzione di latte da destinare alla caseificazione e solo il 2% producono latte alimentare. E' evidente anche che nel Comprensorio di produzione del Parmigiano-Reggiano sono presenti l'87,4% degli allevamenti bovini che producono latte per la caseificazione in Emilia Romagna (7).

**Tabella 2:** Allevamenti bovini presenti all'interno del Comprensorio del CFPR (escluso Mantova) nel 2003 e loro indirizzo produttivo

Indirizzo produttivo	Allevamenti		% su totale E-R	Capi		% su totale E-R
	(n)	%		(n)	%	
Latte per caseificazione	4.870	66,4	87,4	371.429	81,5	84,1
Latte alimentare	145	2,0	33,3	20.089	4,4	44,6
Da carne	2.320	31,6	40,9	63.965	14,0	37,6
Totale	7.335	100,0	62,8	455.483	100,0	69,4

Fonte: nostra elaborazione su dati CRPA

E' in atto comunque una profonda trasformazione, non evidente a livello generale in quanto la produzione di Parmigiano-Reggiano rimane abbastanza costante, testimoniata dal calo del numero degli allevamenti già descritto al quale corrisponde un aumento notevole del numero di capi medi per azienda, passato dal 1998 al 2003 da 54 a 76 per le aziende che producono Parmigiano-Reggiano, e da 107 a 138 per quelle che destinano il latte al consumo.

### 3.2 I casi aziendali di studio

Le aziende individuate sono 12 e sono tutte, eccetto una, a stabulazione libera. Questa tipologia di allevamento ha consentito negli anni la crescita del numero di animali presenti nei singoli allevamenti e, grazie ad una migliore e più corretta gestione delle bovine, ha determinato risparmi in termini di manodopera ed una maggiore produttività.

Dunque la scelta di analizzare aziende dotate di allevamento a stabulazione libera è giustificata dal fatto di voler considerare le aziende che hanno attuato un processo evolutivo in sintonia con le esigenze di aumento della mandria per la riduzione dei costi fissi con l'applicazione delle economie di scala.

L'azienda che produce latte alimentare rappresenta un tipo di produzione sempre presente nella realtà locale e che in periodi diversi (a seconda degli alterni momenti di mercato del settore di produzione del Parmigiano-Reggiano) ha rappresentato una alternativa produttiva importante.

Relativamente alla struttura di trasformazione del latte sono state scelte sei aziende che conferiscono latte a caseifici cooperativi, quattro che sono dotate di caseificio aziendale mentre una fa trasformare il suo latte in conto lavorazione. La tipologia di lavorazione in caseificio aziendale si è diffusa in questi anni soprattutto



nelle aziende che si sono ampliate e hanno raggiunto dimensioni abbastanza grandi da sostenere i costi della trasformazione in proprio del latte.

Il caseificio sociale, pur vivendo un momento di crisi legato alla chiusura degli allevamenti piccoli o condotti da imprenditori anziani, rappresenta ancora la maggior parte delle strutture di trasformazione del Parmigiano-Reggiano con circa il 70% delle strutture di trasformazione.

Le aziende analizzate sono state suddivise in due sottogruppi: le aziende multifunzionali e le aziende convenzionali.

### *3.2.1 Le aziende multifunzionali*

Si tratta di 5 imprese che attuano la trasformazione dei prodotti primari, fanno la vendita delle proprie produzioni cercando modalità alternative ai soliti canali di vendita all'ingrosso, hanno creato punti vendita in azienda, partecipano ai mercati locali, assegnano incarichi di vendita delle proprie produzioni a rappresentanti, prendono personalmente accordi con negozi e ristoratori della zona. Appartengono a questo gruppo anche le aziende che fanno agricoltura biologica, agriturismo o attività di formazione (fattorie didattiche).

Sono tutte aziende che producono Parmigiano-Reggiano (ed altri formaggi e latticini) in caseifici propri o in conto lavorazione presso strutture di terzi. Possono dunque disporre pienamente del formaggio di propria produzione, e di conseguenza hanno trovato forme di commercializzazione più remunerative, dalla vendita diretta in azienda a quella via web.

Per differenziare ulteriormente la propria identità aziendale, e quindi incrementare il valore della propria produzione, 4 delle aziende producono secondo il disciplinare biologico arrivando alla produzione e vendita di prodotti lattiero caseari certificati (Parmigiano-Reggiano, formaggi vaccini freschi, ricotta, burro ecc). Una di queste aziende si distingue anche per l'attività di industria agraria, relativa ai prodotti vegetali, con la produzione di pasta e farina biologiche ottenute dalla trasformazione del grano di produzione aziendale (effettuata presso un pastificio ed un mulino locali). Queste produzioni sono vendute insieme al Parmigiano-Reggiano presso lo spaccio dell'azienda, dove l'offerta per il consumatore è completata dal miele e dalle produzioni orticole di stagione. Inoltre l'azienda è dedicata anche all'attività formativa e aderisce al programma di fattorie didattiche della provincia di Reggio Emilia. Un'altra di queste aziende che praticano agricoltura biologica ha invece recentemente aperto uno spazio agriturismo ed offre alloggio e ristorazione ai propri clienti-consumatori.

### *3.2.2 Le aziende convenzionali*

A questo gruppo appartengono le aziende che svolgono attività primaria tradizionale con l'ottenimento di derrate alimentari. Si tratta di 7 aziende che hanno in comune l'indirizzo zootecnico per la produzione di latte. Tra queste troviamo l'unica realtà dell'intero gruppo che non produce per la trasformazione in Parmigiano-Reggiano, ma per l'industria del latte alimentare. Le altre sei aziende conferiscono latte a

caseifici cooperativi per la trasformazione in formaggio Parmigiano-Reggiano, assumendosi anche in questo caso gli oneri ed i rischi della caseificazione. La sostanziale differenza con le aziende multifunzionali sta nel fatto che queste non possono disporre a proprio piacimento del formaggio ottenuto, in quanto è la cooperativa stessa con i suoi organi di governo, il consiglio di amministrazione ed il presidente, che decide le strategie da adottare per la vendita della produzione. Nessuno dei caseifici cui sono associate le aziende considerate attua una politica di vendita innovativa, affidandosi totalmente a grossisti.

### **3. 3 Le caratteristiche strutturali delle aziende**

La Superficie agricola utile (Sau) media delle aziende considerate supera i 90 ettari, ed è di gran lunga superiore alla dimensione media regionale, pari a 10,5 ettari di Sau, e provinciale, pari a 12,6 ettari di Sau (registrate dal censimento del 2000) (5). Le rilevazioni sulla struttura e sulla produzione delle aziende agricole condotte dall'Istat nel 2007 mostrano che le dimensioni medie aziendali sono aumentate e hanno raggiunto per l'Emilia Romagna i 12,9 ettari di Sau, estensione comunque ancora molto inferiore a quella delle aziende da noi considerate (6).

Il titolo di possesso più comune delle aziende del gruppo è quello misto con terreni sia di proprietà che in affitto. In questi anni l'incidenza dei terreni in affitto è andata aumentando notevolmente soprattutto per le aziende zootecniche in espansione, principalmente per due motivi: da una parte l'aumento notevole della dimensione della mandria richiede la produzione di un maggior quantitativo di foraggio (che non può farsi esclusivamente attraverso l'acquisto, in quanto il disciplinare di produzione del Parmigiano-Reggiano prevede che almeno il 50 % dei foraggi che costituiscono la razione sia di provenienza aziendale); in secondo luogo la normativa comunitaria pone dei limiti precisi relativamente al numero di capi allevabili per ettaro e agli effluenti prodotti.

Il ricorso all'affitto è maggiore per le aziende multifunzionali, che hanno in affitto circa il 60% dei terreni che coltivano, rispetto a quelle convenzionali per le quali i terreni affittati sono poco più del 56%.

Le imprese del gruppo considerato sono per lo più lavoratrici e capitalistico-lavoratrici. La ragione sociale è di solito intestata a persone fisiche o società semplici (formate dai componenti del nucleo familiare, moglie, figli); trattasi comunque di realtà dove l'imprenditore e la sua famiglia sono i protagonisti delle decisioni e delle strategie aziendali. Un'azienda è costituita sotto forma di società cooperativa.

**Tabella 3:** Confronto tra i dati strutturali delle aziende multifunzionali e convenzionali

Descrizione	U.M.	Multifunzionali	Convenzionali	Differenza
Aziende	n	5	7	
Sau/azienda	ha	103,7	87,6	16,1
Sat in proprietà/Sat	%	40	43,7	-3,7
Sauf/Sau	%	84,6	81	3,6
Ulu/azienda	n	5,2	3,7	1,5
Ulu/Sauf	n	2,8	2,5	0,3
Sau/Ulu	ha	19,9	23,7	-3,8
Sau/Ulu/Sauf	ha	36,5	35,6	0,9
Ulu/Sauf/Ulu	%	54,4	66,4	-12
Ugb/Sauf	n	1,8	2,1	-0,3
Ugb/Sauf/Sauf	n	2,1	2,5	-0,4
Ugb/azienda	n	187,5	180,4	7,1
Ugb/Ulu	n	35,9	48,7	-12,8
Upl/Ulu	n	26,1	33,7	-7,6
Upl/Ugb	%	72,8	69,1	3,7

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

L'impiego di manodopera avviene per lo più per la cura dei bovini, ma vi sono anche figure coinvolte nella coltivazione dei campi e, nelle aziende nelle quali è presente il caseificio aziendale, personale addetto alle operazioni di caseificazione del latte. Il confronto tra le aziende multifunzionali e convenzionali mostra che le prime hanno 5,2 Ulu per azienda contro le 3,7 di quelle convenzionali. Si evidenzia anche che è maggiore l'incidenza del lavoro familiare nelle aziende convenzionali; dunque le aziende multifunzionali sono fonte di maggiore occupazione di manodopera.

Il grado di attività, cioè il rapporto tra la Sau e le unità lavoratrici, è più elevato nelle aziende tradizionali rispetto a quelle multifunzionali. Dunque le prime hanno cercato di ridurre il carico di lavoro per ridurre i costi di produzione. Le seconde invece hanno aumentato l'occupazione per incrementare il valore aggiunto dei prodotti aziendali durante le fasi di realizzazione e vendita.

Passando ad analizzare il riparto colturale delle aziende analizzate, emerge la specializzazione produttiva zootecnica con 935 ettari su 1131 ettari di Sau destinati a produrre foraggi per i bovini (82,7%).

La consistenza media degli allevamenti considerati è pari a 183,3 Unità di Grosso Bestiame (Ugb) per azienda e 2,4 Ugb per ettaro di Sau foraggera. Questo indica la presenza di un numero notevole di bovini per azienda, ma anche una notevole intensificazione produttiva degli allevamenti considerati, che avviene evidentemente anche con un maggior ricorso agli alimenti extraziendali, sia mangimi che foraggi acquistati, in quanto il carico di bestiame allevabile con la produzione di un ettaro di

foraggiere è circa 1,5 Ugb (9). Risulta evidente la necessità di far ricorso al mercato per integrare la razione degli animali allevati.

**Tabella 4:** Consistenza degli allevamenti (2007)

Aziende	Ugb	Ugb/ Sauf	Ugb/ Ulu	Upl	Upl/ Sauf	Upl/ Ulu	% Upl/ Ugb
<b>Multifunzionali</b>							
Totale	937,4			682,5			
Media	187,5	2,14	35,9	136,5	1,6	26,1	72,8
<b>Convenzionali</b>							
Totale	1.262,5			873,0			
Media	180,4	2,54	48,7	124,7	1,8	33,7	69,1
<b>Tot. aziende gruppo</b>	<b>2.199,9</b>			<b>1.555,5</b>			
<b>Media</b>	<b>183,3</b>	<b>2,35</b>	<b>42,3</b>	<b>129,6</b>	<b>1,7</b>	<b>29,9</b>	<b>70,7</b>

*Fonte: nostre elaborazioni su dati aziendali*

Dal confronto tra aziende convenzionali e multifunzionali emerge che la consistenza dei capi grossi bovini per ettaro a colture foraggiere e per unità lavoratrice è maggiore nelle aziende convenzionali rispetto a quelle multifunzionali, a testimonianza di una maggior spinta verso l'intensificazione produttiva delle prime.

### 3.4 Analisi economica

L'analisi economica è stata effettuata mediante la realizzazione dei bilanci economici relativi all'annata 2007. A tal fine sono stati redatti gli inventari di inizio e fine anno e raccolti tutti i fatti amministrativi accaduti nelle singole aziende. Successivamente si è potuto procedere alla elaborazione della contabilità in partita doppia, fino alla determinazione del reddito netto aziendale.

#### 3.4.1 La produzione aziendale

L'analisi economica comincia con l'analisi della 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. L'andamento economico dell'anno considerato è fortemente influenzato dalle basse quotazioni del Parmigiano-Reggiano che si ripercuotono sul prezzo del latte. Basti pensare che il prezzo di riferimento, stabilito dalle commissioni provinciali sulla base delle vendite di Parmigiano-Reggiano registrate nel corso dell'anno, si aggira intorno ai 40 euro per 100 kg di latte, paragonabile al compenso ricevuto dai produttori nel 1993.

**Tabella 5:** Produzione lorda vendibile (Euro, 2007)

Aziende	Sau	Plv	Plv/Sau	Plv/Ulu
<b>Multifunzionali</b>				
Media	103,7	598.064	5.765	114.572
<b>Convenzionali</b>				
Media	87,6	557.026	6.359	150.548
<b>Totale aziende</b>	<b>1.131,9</b>	<b>6.889.501</b>		
<b>Media</b>	<b>94,3</b>	<b>574.125</b>	<b>6.087</b>	<b>132.490</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

La Plv media per ettaro di superficie coltivata risulta pari a 6.087 euro. Tale valore risulta più elevato nelle aziende convenzionali rispetto a quelle multifunzionali a dimostrazione della maggior spinta verso l'intensificazione produttiva. Anche la Plv per unità lavoratrice è maggiore nelle aziende convenzionali (150 mila euro), rispetto alle multifunzionali (114 mila euro).

**Tabella 6:** Composizione della Plv (Euro, 2007)

Aziende	Plv	Vegetale	Latte	Carne	Pac	Altri ricavi
<b>Multifunzionali</b>						
Totale	2.990.319	67.441	2.411.782	130.364	264.983	115.749
% su Plv	100,0	2,3	80,6	4,3	8,9	3,9
<b>Convenzionali</b>						
Totale	3.899.182	465.223	3.029.191	118.998	271.649	14.121
% su Plv	100,0	11,9	77,7	3,0	7,0	0,4
<b>Tot. aziende</b>	<b>6.889.501</b>	<b>532.664</b>	<b>5.440.973</b>	<b>249.362</b>	<b>536.632</b>	<b>129.870</b>
<b>% su Plv</b>	<b>100,0</b>	<b>7,7</b>	<b>79,0</b>	<b>3,6</b>	<b>7,8</b>	<b>1,9</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

Trattandosi di aziende a indirizzo zootecnico, le componenti della Plv sono principalmente quelle di origine animale ed in particolare il latte, seguono le produzioni vegetali e gli altri introiti.

#### *Le produzioni delle aziende multifunzionali*

Come già osservato durante la trattazione della struttura delle aziende, le

produzioni realizzate dalle aziende multifunzionali sono il Parmigiano-Reggiano e altri prodotti lattiero caseari. Alcune aziende producono anche altri prodotti vegetali o offrono servizi, come agriturismo e fattorie didattiche. Contabilmente si sono tenute separate le due produzioni animali, il latte e i suoi derivati e la carne, le produzioni vegetali primarie (grano, mais ecc) e i prodotti vegetali trasformati che abbiamo raggruppato nel capitolo delle industrie agrarie (farina, pasta). Il latte ed i derivati sono stati considerati insieme, anche se il formaggio farebbe anch'esso parte delle industrie agrarie, ma le aziende non hanno una contabilità separata e quindi le vendite di tutti i prodotti lattiero caseari sono contabilizzate in comune.

### *Le produzioni delle aziende convenzionali*

Passando in rassegna le produzioni delle aziende convenzionali queste, come per le aziende multifunzionali, sono costituite principalmente dal latte destinato alla trasformazione in formaggio Parmigiano-Reggiano o alla commercializzazione, nel caso dell'azienda che produce latte alimentare. Le altre produzioni aziendali sono rappresentate dalle colture vendibili (grano, mais, barbabietola da zucchero ecc.) mentre rispetto alle aziende multifunzionali non ci sono i prodotti trasformati delle industrie agrarie.

#### *3.4.1.1 Le produzioni vegetali*

Le produzioni foraggere, trovandoci nel caso di aziende zootecniche, vengono reimpiegate per l'alimentazione del bestiame e quindi il loro valore non viene computato nel calcolo della produzione, che evidentemente si limita alle sole produzioni vendibili. Si tratta per lo più della produzione di cereali autunno-vernini, grano in particolare, che vengono coltivati per consentire una corretta rotazione in alternanza alle produzioni foraggere. Minore è l'importanza dell'investimento in colture da rinnovo (mais, sorgo, barbabietola da zucchero, pomodoro da industria, ecc.), che abbiamo visto essere pari al 7,3% della Sau.

Analizzando i dati produttivi emerge però una diversa composizione della Plv e le colture da rinnovo diventano la componente più importante rappresentando l'80,4% della Plv vegetale della aziende considerate. Questo ad effetto soprattutto della presenza di due aziende che coltivano anche pomodoro; una in particolare, che abbiamo definito bipolare, che ha più di 1/3 della propria superficie aziendale destinata a questa coltura e da sola produce circa il 70% della Plv da colture vendibili di tutte le aziende considerate.

#### *3.4.1.2 Le Produzioni animali*

Spostando ora la nostra attenzione sulle produzioni animali delle aziende analizzate si osserva che queste rappresentano in media l'82,6% della Plv aziendale. Solo per l'azienda che produce pomodoro questa percentuale si abbassa vicino al 50% e di conseguenza fa abbassare la media del sottogruppo delle aziende convenzionali. La forte propensione verso la produzione di latte, oltre ad aver emarginato le

colture vendibili a favore di quelle foraggere, ha prodotto un altro effetto, quello della contrazione dell'importanza economica della produzione di carne che vediamo pari al 3,6% della produzione totale, per effetto di una rimonta esclusivamente finalizzata alla produzione di latte e del calo dei prezzi delle bovine a fine carriera e dei vitelli balotti.

Il confronto tra i due sottogruppi mostra che le aziende multifunzionali hanno nella media una Plv animale per ettaro di Sau foraggera inferiore alle convenzionali, a conferma di una minore intensificazione produttiva. Evidentemente le aziende convenzionali per ottenere un maggiore risultato in termini di produzione animale per ettaro di superficie foraggera utilizzano quantità superiori di foraggi e mangimi extraziendali. La Plv animale per capo grosso bovino invece è maggiore nelle aziende multifunzionali.

**Tabella 7:** Produzione degli allevamenti (Euro, 2007)

Aziende	Plv animale	Plv anim./ Plv (%)	Plv anim./ Sauf	Plv anim./ Ugb	Latte/ Upl (Kg)	Latte/Plv anim. (%)
<b>Multifunzionali</b>						
Totale	2.542.146					
Media	508.429	85,0	5.795	2.712	6.525	94,9
<b>Convenzionali</b>						
Totale	3.148.189					
Media	449.741	80,7	6.336	2.494	8.214	96,2
<b>Tot. aziende</b>	<b>5.690.335</b>					
<b>Media</b>	<b>474.195</b>	<b>82,6</b>	<b>6.082</b>	<b>2.587</b>	<b>7.473</b>	<b>95,6</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

La produttività media per vacca, calcolata dividendo la produzione complessiva per il numero di bovine presenti in stalla, risulta essere pari a 7.470 chilogrammi di latte. Si tratta di un valore importante vicino a quello della media regionale pari, nel 2007, a 8.247 chilogrammi. Infatti le aziende in questi anni hanno investito molto sia sul miglioramento genetico che sulle tecniche di alimentazione delle bovine. Ad abbassare la media sono in particolare 3 delle aziende biologiche del sottogruppo delle multifunzionali; 2 di queste sono collocate in territorio montano. Inoltre una di queste alleva bovine di razza Bruna, mentre un'altra, quella collocata in provincia di Reggio Emilia, ha selezionato e alleva la razza Reggiana. Queste 2 razze pur producendo un latte qualitativamente migliore della vacca frisona, presente in tutti gli altri allevamenti, forniscono produzioni fisiche inferiori. Così la media produttiva delle aziende multifunzionali (6.525 chilogrammi) diventa notevolmente più bassa di quella delle convenzionali (8.214 chilogrammi) che sarebbe in linea col dato regio-

nale appena citato.

Altro elemento che influisce sulla produzione animale, è il prezzo, quello del latte in particolare, che è strettamente correlato a quello del Parmigiano-Reggiano. Le aziende multifunzionali hanno cercato di superare le difficoltà di mercato ampliando la propria produzione ottenendo formaggi freschi e ricotta oltre al Parmigiano-Reggiano. Peraltro hanno cercato di differenziare, per quanto possibile, anche questo formaggio producendolo secondo i canoni dell'agricoltura biologica o con il latte qualitativamente migliore delle razze Bruna e Reggiana. Hanno inoltre sviluppato anche la fase commerciale, vero punto dolente della produzione della Dop Parmigiano-Reggiano. I dati economici sembrano premiare gli sforzi fatti, perché le aziende multifunzionali, pur avendo una produttività più bassa per capo lattifero possono vantare una Plv animale per Ugb allevato superiore a quella delle aziende convenzionali.

### *3.4.1.3 Altri ricavi*

Le produzioni vegetali ed animali non esauriscono il valore della Plv, nella quale sono compresi anche ricavi che possono derivare da:

- servizi svolti con le proprie macchine su aziende di terzi;
- variazioni di valore delle scorte di magazzino;
- affitti di parte dell'azienda;
- affitto del diritto di produrre latte per la quota non prodotta in azienda;
- maggiori realizzi derivanti dalla vendita di prodotti realizzati l'anno precedente;
- i contributi della Pac erogati dall'Unione europea;
- ricavi derivanti da attività connesse all'agricoltura (agriturismo e fattorie didattiche);
- i ricavi derivanti dalla vendita delle produzioni vegetali trasformate (industrie agrarie).

Dal confronto tra i 2 sottogruppi di aziende individuati si osserva che l'incidenza di questi ricavi sulla Plv è maggiore nelle aziende multifunzionali.

### *3.4.2 I costi espliciti*

Tra i costi espliciti troviamo le spese di reintegrazione e i compensi. Le prime sono relative all'acquisto dei capitali circolanti e alle quote d'uso dei capitali fissi. I secondi sono gli oneri che l'imprenditore deve pagare per i fattori di produzione acquisiti da terzi e utilizzati in azienda. Nelle spese di reintegrazione rientrano anche le spese extraziendali sostenute per prestazioni professionali e servizi erogati all'azienda da parte di terzi. In questa categoria si fanno rientrare anche le imposte ed i contributi.

Si evidenzia che l'importo totale dei costi espliciti è pari in media per le aziende considerate all'81,5% della Plv. Il confronto tra le aziende dei due sottogruppi mostra un'incidenza maggiore di queste spese per le realtà convenzionali, con una differenza pari a quasi 5 punti percentuali sulla Plv. Anche la spesa per ettaro di superficie coltivabile risulta minore nelle aziende multifunzionali.



Passando ora ad analizzare più in dettaglio alcune componenti specifiche delle spese di reintegrazione abbiamo soffermato la nostra attenzione sulle spese relative all'allevamento e sulle quote d'ammortamento.

**Tabella 8:** I costi espliciti (Euro, 2007)

Aziende	Spese di reint.	Spese extraz.	Compensi	Totale costi espliciti	Sulla Plv (%)	Per ettaro Sau
<b>Multifunzionali</b>						
Totale	1.801.251	123.879	433.318	2.358.448		
Media	360.250	24.776	86.664	471.690	78,9	4.547
<b>Convenzionali</b>						
Totale	2.402.739	187.702	668.611	3.259.052		
Media	343.248	26.815	95.516	465.579	83,6	5.316
<b>Tot. aziende</b>	<b>4.203.989</b>	<b>311.581</b>	<b>1.101.929</b>	<b>5.617.499</b>		
<b>Media</b>	<b>350.332</b>	<b>25.965</b>	<b>91.827</b>	<b>468.125</b>	<b>81,5</b>	<b>4.963</b>

*Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali*

L'analisi delle componenti di spesa relative agli allevamenti è quella che più interessa l'indagine da noi condotta che ha riguardato aziende zootecniche. Il confronto tra i due sottogruppi mostra che queste sono più elevate per le aziende convenzionali (33,4% rispetto al 27,3% delle multifunzionali)

Le quote di ammortamento riguardano i fabbricati, i miglioramenti fondiari e le macchine. In media, per le aziende analizzate, tali voci sono state nel 2007 pari a circa 70.000 euro. In particolare per le aziende multifunzionali la loro entità è più del doppio rispetto alle convenzionali ed è pari, mediamente, a 101.260 euro. Questo a conferma della strategia di sviluppo di queste aziende che hanno investito per la realizzazione di spazi e attrezzature per la trasformazione e la vendita dei propri prodotti.

### 3.4.3 Il prodotto netto

Il prodotto netto (Pn), ottenuto sottraendo dalla Plv le spese di reintegrazione ed extraziendali, corrisponde alla ricchezza prodotta nel ciclo di produzione e serve a compensare i fattori produttivi impiegati in azienda (terra, capitale e lavoro).

Il confronto tra aziende multifunzionali e convenzionali in termini di prodotto netto per ettaro di superficie utile mostra valori analoghi, mentre il prodotto netto per unità lavoratrice è più elevato nelle aziende convenzionali (50.531 euro contro i 40.812 euro delle multifunzionali).

**Tabella 9:** Prodotto netto (Euro, 2007)

Aziende	PN	Per ettaro Sau	Per Ulu	Sulla Plv (%)
<b>Multifunzionali</b>				
Totale	1.065.190			
Media	213.038	2.054	40.812	35,6
<b>Convenzionali</b>				
Totale	1.308.741			
Media	186.963	2.135	50.531	33,6
<b>Totale aziende</b>	<b>2.373.931</b>			
<b>Media</b>	<b>197.828</b>	<b>2.097</b>	<b>45.653</b>	<b>34,5</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

#### 3.4.4 I compensi

Per arrivare al risultato finale dell'impresa, il reddito netto, occorre sottrarre al prodotto netto, appena determinato, i compensi spettanti ai prestatori dei fattori produttivi esterni: i salari pagati ai lavoratori, l'affitto corrisposto ai proprietari dei terreni, gli interessi saldati a chi ha prestato i capitali.

L'incidenza dei salari è maggiore nelle aziende multifunzionali (10,5% sulla Plv) che come già si è scritto fanno maggior uso di manodopera dipendente per svolgere le operazioni di caseificio oltre che quelle di stalla.

La spesa sostenuta per i terreni presi in affitto ammonta in media a 26.000 euro per azienda, anche se risulta sbilanciata nel confronto tra i due sottogruppi, e le aziende convenzionali spendono in media quasi il doppio rispetto a quelle multifunzionali. Infatti il prezzo medio pagato dalle aziende convenzionali per un ettaro di terreno preso in affitto è pari a 650 euro rispetto ai 261 euro pagati dalle imprese multifunzionali. Tale disparità si spiega con la presenza nel primo sottogruppo dell'azienda che fa pomodoro che incide notevolmente sulla media considerata sia perché tutto il suo corpo fondiario compresi i fabbricati sono presi in affitto, ed anche perché è noto che per i terreni destinati alla semina del pomodoro gli imprenditori sono disposti a corrispondere canoni più elevati. Per contro nell'altro sottogruppo sono presenti 2 aziende collocate in territorio montano che affittano grandi estensioni di terreno a prezzi modesti. Tutto questo si riflette anche sull'incidenza dell'affitto sulla Plv che è pari in media al 6% per le aziende convenzionali ed al 2,8% per quelle multifunzionali.

**Tabella 10:** Compensi (Euro, 2007)

Aziende	Salari	Sulla Plv (%)	Affitti	Sulla Plv (%)	Interessi	Sulla Plv (%)
<b>Multifunzion.</b>						
Totale	315.292		84.868		33.158	
Media	63.058	10,5	16.974	2,8	6.632	1,1
<b>Convenzionali</b>						
Totale	292.604		233.545		142.462	
Media	41.801	7,5	33.364	6,0	20.352	3,7
<b>Totale aziende</b>	<b>607.896</b>		<b>318.413</b>		<b>175.620</b>	
<b>Media</b>	<b>50.658</b>	<b>8,8</b>	<b>26.534</b>	<b>4,6</b>	<b>14.635</b>	<b>2,5</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

Da ultimo, gli interessi pagati per i capitali presi a prestito sono stati mediamente 14.635 euro per azienda corrispondenti al 2,5% della Plv. La loro incidenza è maggiore di circa 3 volte nelle aziende convenzionali, nelle quali evidentemente è maggiore il ricorso al credito.

### 3.4.5 Il reddito netto

Il reddito netto è ciò che resta all'imprenditore dopo aver sottratto dal prodotto netto i compensi per i fattori di produzione esterni. Esso comprende il tornaconto, compenso che spetta all'imprenditore per aver coordinato i fattori produttivi ed essersi assunto i rischi tecnici ed economici della produzione, e le remunerazioni che gli spettano per aver messo nel ciclo produttivo parte o tutti i fattori (la sua terra, i capitali propri, il suo lavoro). Rappresenta il reddito spendibile dall'imprenditore che potrà essere in parte reinvestito in azienda, ed in parte destinato ai consumi familiari. Occorre però premettere che il gruppo di aziende non è sempre paragonabile in quanto sono presenti imprese con apporto diverso di fattori di produzione da parte dell'imprenditore, e quindi anche i redditi netti non sono omogenei. Ciò nonostante è utile un confronto tra le aziende, tenuto conto dei limiti appena indicati.

Dai risultati emerge che il reddito netto è più elevato nelle aziende multifunzionali sia in termini assoluti che in termini percentuali sulla produzione lorda. La sua consistenza per unità di superficie è pari a 1.218 euro per le imprese del primo sottogruppo e 1.044 euro per quelle convenzionali. Anche nel confronto per unità lavoratrice familiare le aziende multifunzionali risultano avere un reddito netto più elevato, 44.498 euro per Uluf rispetto ai 36.166 euro realizzati dai lavoratori familiari delle convenzionali.

**Tabella 11:** Reddito netto (Euro, 2007)

Aziende	Reddito netto	Sulla Plv (%)	Per ettaro Sau	Per Uluf
<b>Multifunzionali</b>				
Totale	631.872			
Media	126.374	21,1	1.218	44.498
<b>Convenzionali</b>				
Totale	640.130			
Media	91.447	16,4	1.044	36.166
<b>Totale aziende</b>	<b>1.272.002</b>			
<b>Media</b>	<b>106000</b>	<b>18,5</b>	<b>1.124</b>	<b>39.875</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

**Tabella 12:** Contributi comunitari percepiti dalle aziende (Euro, 2007)

Aziende	Pac	Pac/Sau	Pac/Sauf	Su Rn (%)
<b>Multifunzionali</b>				
Totale	264.983			
Media	52.997	511	604	41,9
<b>Convenzionali</b>				
Totale	271.649			
Media	38.807	443	547	42,4
<b>Totale aziende</b>	<b>536.632</b>			
<b>Media</b>	<b>44.719</b>	<b>474</b>	<b>574</b>	<b>42,2</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

E' interessante analizzare l'incidenza dei contributi comunitari sul reddito netto. Il confronto tra i due sottogruppi di aziende mostra che le multifunzionali percepiscono mediamente quasi 53.000 euro di premi comunitari a fronte dei 38.800 euro percepiti da quelle convenzionali, ed anche il contributo percepito per ettaro di Sau risulta essere più elevato nelle prime. I contributi comunitari rappresentano comunque più del 40% del Rn sia per le aziende multifunzionali che convenzionali.

#### 4. ALCUNE VALUTAZIONI DI CONFRONTO

L'indagine aziendale ha messo in evidenza che le imprese dei 2 sottogruppi individuati hanno adottato comportamenti differenti di fronte alle mutate condizioni economiche ed ai nuovi scenari proposti dalla politica agricola comunitaria.

Le aziende convenzionali hanno continuato a credere nella intensificazione

produttiva, puntando sull'aumento dimensionale dell'azienda e della mandria. L'analisi infatti ha mostrato la maggiore produttività delle bovine allevate, nel confronto con le aziende multifunzionali, e come conseguenza i maggiori importi della Plv per ettaro di Sau e della Plv animale riferita alle superfici foraggere.

Anche la produzione lorda per unità di lavoro è favorevole a queste imprese che, come mostrano i dati strutturali, hanno un impiego di lavoro per unità di superficie coltivata inferiore alle altre; infatti hanno cercato di ridurre al minimo l'utilizzo di lavoro dipendente, considerato il fattore produttivo da limitare per conseguire i necessari risparmi e quindi massimizzare i profitti.

Queste aziende però hanno tenuto in poco conto le indicazioni fornite dalla Pac che, attraverso il disaccoppiamento e la redistribuzione degli aiuti sul capitolo dello sviluppo rurale, intende promuovere quelle imprese che abbiano saputo innovare le proprie produzioni e i servizi offerti. Si sono limitate ad osservare passivamente le basse quotazioni del prezzo di vendita del Parmigiano-Reggiano, vedendo così vanificati gli sforzi produttivi realizzati. Peraltro hanno potuto beneficiare del contributo sulla produzione del latte introdotto dall'Ue, che è stato una vera e propria rendita per le aziende produttrici di latte per Parmigiano-Reggiano, ma che dovrebbe terminare a partire dal 2013, lasciando forti dubbi sul futuro produttivo di queste aziende. Infatti gli aiuti comunitari hanno rappresentato mediamente più del 40% del loro reddito netto.

L'intensificazione produttiva ha generato anche maggiori costi espliciti riferiti alla superficie coltivata che sono risultati superiori a quelli delle aziende multifunzionali.

Le aziende da noi classificate come multifunzionali hanno adottato strategie diverse da quelle del gruppo appena esaminato, diversificando la produzione e offrendo nuovi beni e nuovi servizi. Inoltre hanno fatto scelte che hanno coinciso con un'agricoltura sostenibile, puntando sull'agricoltura biologica che limita l'utilizzo dei mezzi di produzione (concimi chimici, antiparassitari, diserbanti, farmaci, ecc). Il risultato è una produttività per Upl inferiore, determinata anche dalla scelta di allevare razze bovine meno produttive, ma più vocate alla produzione di Parmigiano-Reggiano: la Reggiana e la Bruna.

Parallelamente queste aziende hanno investito sulla differenziazione dei prodotti aziendali. Quasi tutte infatti hanno riportato la trasformazione del latte in azienda ottenendo, oltre al Parmigiano-Reggiano, formaggi freschi e ricotta da offrire al consumatore negli spacci aziendali. La strategia innovativa non si è limitata al solo processo produttivo e di trasformazione, ma ha riguardato anche le forme di commercializzazione messe in atto da queste aziende con la realizzazione di negozi aziendali, con la partecipazione a fiere e mercati locali, con la vendita a ristoratori o piccoli esercizi alimentari della zona.

Le innovazioni introdotte hanno consentito di vendere direttamente in toto o in parte al consumatore finale le proprie produzioni realizzando un buon prodotto lordo; ciò è confermato dalla Plv animale per capo lattifero che è risultata superiore rispetto a quella delle aziende convenzionali. La produzione e la vendita di prodotti con maggior valore aggiunto ha giustificato l'utilizzo di un maggior numero di Ulu non familiari.

Il tipo di agricoltura meno intensiva praticata ha consentito anche di avere costi espliciti per ettaro di Sau più contenuti. Gli ammortamenti, invece, risultano superiori per effetto degli investimenti che la strategia attuata ha richiesto (costruzione del caseificio, attrezzature, spaccio aziendale, ecc).

## 5. CONCLUSIONI

Il lavoro svolto ha permesso di verificare che l'introduzione della multifunzionalità per le aziende che hanno saputo innovarsi ha consentito di cogliere risultati economici importanti. Emerge che la strada imboccata è più rispondente alle mutate esigenze del consumatore e dell'intera collettività. Infatti la modalità produttiva meno intensiva è stata uno strumento di richiamo per i consumatori ed ha rappresentato una esternalità positiva per l'intera collettività. Anche i premi comunitari sono stati maggiori per le aziende multifunzionali rappresentando un contributo importante nella fase di avvio e sviluppo della strategia intrapresa.

L'analisi strutturale ha mostrato che le aziende convenzionali sono più intensive e hanno un maggior carico di bovini per ettaro di Sau. Il lavoro è maggiore nelle aziende multifunzionali che hanno anche più Unità di lavoro non familiari, di conseguenza un carico di Sau per Ulu inferiore, ed anche il carico di Ugb per Ulu è inferiore.

L'analisi economica evidenzia che le aziende multifunzionali grazie alle strategie di differenziazione della produzione, di offerta di servizi (agriturismo, fattorie didattiche) e di commercializzazione dei propri prodotti, hanno ottenuto risultati migliori, e soprattutto hanno saputo meglio sfruttare le leve offerte dalla nuova politica comunitaria. Infatti le scelte fatte sono più rispondenti a quanto auspicato dall'Ue, che ha cercato di incentivare lo sviluppo delle funzioni secondarie dell'agricoltura attraverso strumenti ricadenti sia nel primo che nel secondo pilastro della Pac (8). La pratica di un'agricoltura sostenibile come quella biologica ha consentito alle imprese multifunzionali di poter beneficiare degli aiuti agroambientali, che sommandosi a quelli relativi alla produzione di latte hanno portato ad un aiuto per ettaro di Sau superiore a quello delle concorrenti convenzionali.

Inoltre queste aziende avendo investito sulla diversificazione dei prodotti e sul miglioramento della commercializzazione sembrano essere più preparate negli anni a venire nei quali i finanziamenti comunitari sono destinati a diminuire notevolmente.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) COMMISSIONE CE (1991). Comunicazione della Commissione al Consiglio – “Evoluzione e futuro della Pac”, Com /91/100 def., Bruxelles.
- 2) DE FILIPPIS F. (2008). L'Health Check e il nuovo processo di riforma della Pac. L'Health Check della Pac, Edizioni Tellus, Roma.
- 3) HENKE R., PIERANGELI F., CORONAS M.G. (2008). Specializzazione e differenziazione dell'agricoltura - Agriregionieuropa anno 4, n. 15.
- 4) INEA (2008). L'agricoltura italiana conta 2008, INEA, Roma.

- 5) ISTAT (2004). V° Censimento Generale dell'Agricoltura, 2000, ISTAT, Roma.
- 6) ISTAT (2008). Struttura e produzioni delle aziende agricole, 2007, ISTAT, Roma.
- 7) MONTANARI C., DE ROEST K. (2006). I cambiamenti strutturali dei caseifici del comprensorio del Parmigiano-Reggiano dal 1993 al 2005, CRPA S.p.A., Reggio Emilia.
- 8) ROSARIA M., D'ANDREA P. (2008). Finestra sulla Pac n.11 - Agriregionieuropa anno 4, n.14.
- 9) SALGHETTI A. (2000) Evoluzione e prospettive delle aziende agricole parmensi tra secondo e terzo millennio, Laserprint, Parma.
- 10) SALGHETTI A., FERRI G. (2006). Nuove opportunità di reddito per l'imprenditore agricolo. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma, XXVI, 359-379.
- 11) SOTTE F. (2008). Chiuso l'Health Check, apriamo una riflessione - Agriregionieuropa anno 4, n.15.
- 12) VELASQUEZ B. E., PIERANGELI F (2004). L'approccio alla multifunzionalità in ambito europeo in Inea - Verso il riconoscimento di un'agricoltura multifunzionale. Edizioni scientifiche Italiane, Napoli.





## **COSTO DI PRODUZIONE DEL LATTE: ALCUNI CONFRONTI TRA PARMIGIANO-REGGIANO E GRANA PADANO<sup>1</sup>**

## **THE COST OF MILK PRODUCTION: SOME COMPARISONS BETWEEN PARMIGIANO-REGGIANO AND GRANA PADANO CHEESE**

Salgheti A., Ferri G.<sup>2</sup>, Gilberti F.<sup>3</sup>

### **PAROLE CHIAVE:**

Costo di produzione, latte, Parmigiano-Reggiano, Grana Padano

### **KEY WORDS:**

Cost of production, milk, Parmigiano-Reggiano, Grana Padano

### **RIASSUNTO**

Il contenimento del costo di produzione è l'obiettivo prioritario dell'imprenditore agricolo, tenuto conto dello scarso potere contrattuale del settore primario per incidere sulle variazioni del prezzo.

L'indagine è rivolta ad individuare il costo di produzione del latte nei comprensori dei grana DOP, sulla base di analisi economiche di aziende zootecniche dei due territori. I risultati hanno confermato che produrre latte per Parmigiano-Reggiano è più oneroso rispetto a quello per il Grana Padano.

E' stato altresì accertato che nell'attuale congiuntura mercantile la forbice prezzi/costi porta ad un profitto negativo nella produzione del latte per entrambi i formaggi DOP. In particolare, la forbice risulta più allargata per il Grana Padano rispetto al Parmigiano-Reggiano, a motivo dei minori prezzi di mercato del latte nel primo caso. Il latte per Parmigiano-Reggiano riesce così a recuperare competitività su quello del Grana Padano, nonostante i maggiori costi di produzione.

### **ABSTRACT**

Containing the cost of production is the key aim of the agricultural entrepreneur, given the low bargaining power of the primary sector in influencing prices.

1 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 Andrea Salghetti ha redatto i paragrafi 1 e 7; Giovanni Ferri i paragrafi 2 e 3; mentre Fabio Gilberti ha redatto i paragrafi 4, 5 e 6.

2 Sezione di Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

3 Laureato in Tecnologie delle Produzioni Animali e Sicurezza degli Alimenti.

The investigation aims to assess the cost of the production of milk in the PDO districts of parmesan cheese, on the basis of economic analyses of the livestock farms of the two territories. The results confirmed that the production of milk for Parmigiano-Reggiano cheese is more cost-intensive than that for Grana Padano cheese.

It also emerged that in the current market situation, the price/cost squeeze lead to a negative profit in the production of milk for both PDO cheeses. In particular, the squeeze is wider for Grana Padano than for Parmigiano-Reggiano, due to the lower market prices of milk in the former case. The milk for Parmigiano-Reggiano thus manages to recover competitiveness over that of Grana Padano, notwithstanding the higher production costs.

## **1. PREMESSA**

L'allevatore si trova ad affrontare oggi la rincorsa tra prezzi e costi. Recentemente si è assistito infatti ad un lieve aumento del prezzo del latte pagato alla stalla, ma quest'ultimo è stato subito eroso dal rincaro delle materie prime, come cereali e semi oleosi. Lo stesso rincaro del petrolio ha portato ad avere costi insostenibili, basti pensare che le nostre aziende agricole dipendono pienamente da energie quali petrolio ed elettricità, pertanto sono aumentati i costi per le sementi, i concimi, i mangimi per gli animali. Aumentano i costi per le varie lavorazioni, per la trasformazione e per il trasporto. Tutto questo si ripercuote sul settore zootecnico, ormai in affanno da diversi anni.

Più recentemente i prezzi delle materie prime si sono ridotti, ma anche il prezzo del latte ne ha risentito e gli accordi tra allevatori e industria sul prezzo del latte hanno subito una fase di stallo.

Grana Padano e Parmigiano-Reggiano sono formaggi simili, si discostano per quanto riguarda il disciplinare di produzione che nel Parmigiano è più restrittivo. La grande differenza sta nel fatto che nel Grana Padano è consentito l'uso di insilati, alimenti molto energetici, che permettono di alimentare gli animali con un minor costo. Pertanto le lattifere nel comprensorio del Grana Padano sono più produttive e molte aziende attuano economie di scala.

È quindi importante approfondire gli aspetti strutturali ed economici delle due produzioni per individuare i punti deboli e quelli forti di ciascuna scelta e confrontare i risultati economici che sono stati individuati dai bilanci aziendali di allevamenti dediti alla produzione di latte per Grana Padano e Parmigiano-Reggiano.

È la forbice tra prezzo e costo che può mettere in evidenza la strategia più conveniente tra le due scelte. I confronti tra le due realtà produttive chiariranno meglio le prospettive future che i due formaggi DOP si troveranno ad affrontare in un mercato dinamico rivolto alla globalizzazione.

## **2. I COMPRESORI DEI GRANA DOP**

### **2.1 Il comprensorio del formaggio Grana Padano**

Il Consorzio per la tutela del Formaggio Grana Padano, che oggi riunisce oltre 200 caseifici, stagionatori e commercianti di formaggio Grana Padano, venne

costituito nel 1954. La zona di produzione interessa in tutto 5 regioni e 32 province situate nella Pianura Padana, dal Piemonte al Veneto, comprendendo anche la Provincia di Trento e alcune aree dell'Emilia Romagna. Gli allevamenti che producono Grana Padano devono essere collocati nel comprensorio di produzione.

**Tabella 1:** Latte lavorato a Grana Padano nel 2007 (dati per regione rimodulati secondo la provenienza del latte)

PROVINCIA	LATTE LAVORATO (t)	
BG	31.096,98	
BS	483.959,36	
CR	368.671,96	
LO	44.204,69	
MN	628.862,22	
PV	22.935,29	
- BS	-3.135,517	
- MN	-77.067,596	
		<b>LOMBARDIA 1.499.527,39</b>
PD	63.064,84	
RO	7.627,07	
VI	152.041,09	
VR	95.051,16	
+ BS	3.135,517	
+ MN	77.067,596	
+ TN	11.145,808	
		<b>VENETO 409.133,08</b>
PC	271.844,29	
		<b>EMILIA-ROM. 271.844,29</b>
CN	34.874,08	
		<b>PIEMONTE 34.874,08</b>
TN	66.349,91	
- TN	-11.145,808	
		<b>TRENTINO 55.204,10</b>
<b>TOT.</b>	<b>2.270.582,94</b>	<b>2.270.582,94</b>

conferenti veneti hanno conferito latte a caseifici trentini bresciani e mantovani

conferenti veneti hanno conferito latte a caseifici trentini bresciani e mantovani

conferenti veneti hanno conferito latte a caseifici trentini bresciani e mantovani

Fonte: Consorzio del formaggio Grana Padano

Dai dati si evince che la regione in cui si produce più latte è la Lombardia, con 1,5 milioni di tonnellate di latte lavorato. Al secondo posto troviamo il Veneto con 409 mila tonnellate lavorate, poi ancora l'Emilia-Romagna con 272 mila tonnellate, infine il Trentino e il Piemonte con 55 mila e 35 mila tonnellate rispettivamente (5, 10).

Nel 2007 il comprensorio del Grana Padano comprendeva 165 caseifici produttori di formaggio, con prevalenza in forma cooperativa (88) ed i rimanenti caseifici privati (77).

Sempre nel 2007 la produzione è stata di 4.271.513 forme, con un calo dell'1,96% rispetto al 2006; dal 2005 al 2007 la produzione è diminuita di circa 150 mila forme, il calo più significativo è avvenuto a livello di industria, mentre la produzione delle cooperative è rimasta pressoché invariata.

La produzione nel 2007 è avvenuta per il 41,96% nei caseifici industriali e per il 58,04% in caseifici cooperativi, che hanno aumentato (+1,43%) la loro incidenza sul totale del latte prodotto rispetto all'anno precedente.

Le 5 maggiori province produttrici di latte influiscono sulla produzione totale per l'86,3%, da notare che la sola Lombardia influisce per il 71,5%, è proprio in questa regione che viene prodotta la maggior quantità di Grana Padano.

Il bilancio relativo ai consumi domestici del 2007 mostra un calo degli acquisti (-0,7%) a fronte di una complessiva stabilità dell'intero mercato dei formaggi duri (+0,2%). La quota di mercato del Grana Padano sul totale al consumo dei formaggi duri è pari al 57,5%.

Per quanto riguarda i prezzi, il Grana Padano è stato venduto nel 2007 mediamente a 9,37 euro/kg, rispetto al 2006 c'è stato un leggero calo (-0,1%).

**Tabella 2:** Numero caseifici attivi (si intendono in questo caso i siti dove si è prodotta almeno una forma nel 2007)

<b>Province</b>	<b>Totale</b>	<b>Cooperativi</b>	<b>Industriali</b>
BG	4	1	3
BS	31	9	22
CN	7	0	7
CR	11	8	3
LO	5	0	5
MN	30	24	6
PC	26	13	13
PD	4	3	1
PV	4	0	4
RO	1	1	0
TN	19	18	1
VI	12	10	2
VR	11	1	10
<b>TOTALE</b>	<b>165</b>	<b>88</b>	<b>77</b>

Fonte: Consorzio del formaggio Grana Padano

Le esportazioni di Grana Padano DOP sono in continua crescita, dal 1997 ad oggi sono aumentate del 208,6%; nel 2007 sono state esportate 1.164.487 forme, +6,2% rispetto l'anno precedente. Ciò significa, anche, che il 27,1% della produzione marchiata va sui mercati esteri.

L'Europa si conferma il mercato più importante assorbendo il 74,6% delle esportazioni di Grana Padano DOP, con un trend ancora in crescita rispetto allo stesso periodo del 2006.

## 2.2 Il comprensorio del formaggio Parmigiano-Reggiano

La zona di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano è quella costituita dai territori delle province di Parma, Reggio Emilia, Modena, Bologna (in sinistra del fiume Reno), Mantova (in destra del fiume Po). La zona di produzione e le caratteristiche del prodotto sono definite nel Disciplinare di produzione.

Il Consorzio è l'unico ed esclusivo titolare e detentore dei marchi regolarmente registrati e di quelli che andrà a registrare in futuro, che potranno essere apposti sul formaggio "Parmigiano-Reggiano" secondo le norme fissate dal Regolamento di marchiatura.

Il comprensorio del formaggio Parmigiano-Reggiano comprende 4.291 aziende agricole conferenti il latte ai caseifici, per un totale di 244.000 vacche che forniscono il latte per il Parmigiano-Reggiano e che vanno a costituire il 15% circa della produzione nazionale di latte. Il comprensorio del Parmigiano-Reggiano comprende 450 caseifici produttori di formaggio (5, 11).

**Tabella 3:** Numero caseifici e produzione (forme) per provincia

Province	Annate	Caseifici (n)	Formaggio prodotto	
			Forme (n)	Variazione (%)
Bologna	2007	10	67.697	7,04
	2006	10	63.242	
Mantova	2007	31	330.141	-0,41
	2006	33	331.732	
Modena	2007	93	600.843	-1,39
	2006	98	609.305	
Parma	2007	195	1.123.623	-0,20
	2006	203	1.125.847	
Reggio Emilia	2007	121	958.301	-0,14
	2006	122	959.606	
<b>Comprensorio</b>	2007	450	3.080.605	-0,30
	2006	466	3.089.732	

Fonte: Consorzio del Formaggio Parmigiano-Reggiano

La provincia con il maggior numero di caseifici è Parma con 195 strutture che producono l'omonimo formaggio, al secondo posto troviamo Reggio Emilia con 121 caseifici, al terzo posto Modena con 93 caseifici, Mantova ne ha 31 ed infine la provincia di Bologna con 10 stabilimenti.

Rispetto al 2006 ci sono 16 latterie in meno che producono Parmigiano Reggiano, mentre la produzione di forme è rimasta pressoché invariata, con una lieve flessione dello 0,3%, con un totale di 3 milioni e 80 mila forme prodotte. In prospettiva il numero dei caseifici è destinato a diminuire per la chiusura di quelli di piccole dimensioni che sono antieconomici.

Il bilancio relativo ai consumi domestici di Parmigiano-Reggiano nel 2007 mostra un aumento degli acquisti dello 0,9% a fronte di una complessiva stabilità dell'intero mercato dei formaggi duri (+0,2%). La quota di mercato del Parmigiano-Reggiano sul totale al consumo dei formaggi duri si è mantenuta al 31%.

A causa dell'aumento dei prezzi al consumo (+2,4%), gli acquisti di Parmigiano-Reggiano sono saliti in valore del 3,3%. Per il totale dei formaggi grana l'aumento è rimasto invece contenuto allo 0,5%, in ragione della complessiva stabilità dei prezzi alla produzione.

Per quanto riguarda le esportazioni, i dati vengono aggregati per Parmigiano-Reggiano e Grana Padano e dal 1980 ad oggi hanno avuto sempre un andamento crescente, negli ultimi 25 anni l'esportazione è cresciuta di 10 volte. Le esportazioni sono stimate dal Consorzio del Parmigiano-Reggiano pari ad una quota del 12% sulla produzione totale. Il mercato europeo rappresenta il 58% del totale della quota esportata e i maggiori paesi importatori sono la Germania, la Francia e il Regno Unito, mentre il mercato statunitense ne assorbe il 18%.

### 2.3 Valutazioni di confronto

Confrontando questi due importanti formaggi tipici italiani a Denominazione d'Origine Protetta (D.O.P.), ovvero Grana Padano e Parmigiano-Reggiano, è possibile rilevare parecchie differenze.

Dal punto di vista dell'alimentazione del bestiame la grande differenza sta nel fatto che nell'alimentazione delle vacche nel comprensorio del Parmigiano-Reggiano è vietato l'utilizzo di insilati, che invece vengono largamente impiegati nel comprensorio del Grana Padano (3).

**Tabella 4:** Prezzo medio al consumo dei formaggi duri tipici italiani (2007)

<b>Tipologia</b>	<b>Euro/Kg</b>
Parmigiano-Reggiano	13,07
Grana Padano	9,37
Altri grana	9,53
<b>Media</b>	<b>10,55</b>

Fonte: elaborazioni su dati C.R.P.A.

Dal punto di vista tecnologico i due processi di produzione sono abbastanza simili, un'importante peculiarità nel Padano sta nell'utilizzo del lisozima come conservante, inoltre si ottengono forme leggermente più piccole che permettono di poter attuare un periodo di stagionatura inferiore.

Altrettanto vero è che se da un lato abbiamo costi inferiori nella produzione del latte, dall'altro lato il Grana Padano ha un prezzo inferiore di vendita sul mercato (1).

Da notare anche la differente dimensione dei caseifici: nella zona del Parmigiano-Reggiano troviamo 450 caseifici che producono 3 milioni e 80 mila forme, nel comprensorio del Grana Padano ci sono invece 165 caseifici che producono 4 milioni e 270 mila forme. Pertanto la dimensione produttiva dei secondi è quasi tre volte quella dei primi.

Il bilancio relativo ai consumi domestici del 2007 mostra una complessiva stabilità dell'intero mercato dei formaggi duri (+0,2%). La quota di mercato del Parmigiano-Reggiano sul totale al consumo dei formaggi duri si è mantenuta al 31%, la quota del Grana Padano è pari invece al 57,5%.

### **3. COSTO DI PRODUZIONE DEL LATTE**

#### **3.1 Premessa**

L'analisi economica aziendale risulta indispensabile per conoscere l'efficienza delle diverse produzioni ottenute, al fine di attuare le conseguenti scelte imprenditoriali.

L'analisi del costo di produzione del latte parte dall'utilizzazione dei dati del bilancio economico finalizzati alla determinazione del reddito netto. Il reddito netto, comprende, oltre al tornaconto, anche i compensi ai fattori conferiti dall'imprenditore e dalla sua famiglia (2).

In questa fase si analizzerà il costo di produzione del latte delle aziende esaminate che hanno come attività principale la produzione di latte destinato alla trasformazione in Grana Padano e Parmigiano-Reggiano.

Esistono varie metodologie per la rilevazione e la rielaborazione dei dati contabili, ma la più completa è quella della contabilità analitica, in grado di differenziare la maggior parte dei costi specifici per ogni processo produttivo e di acquisire i parametri oggettivi necessari a ripartire i costi comuni. I costi di produzione si dividono in costi oggettivi (o specifici), che rappresentano le spese direttamente imputabili all'una o all'altra produzione, e costi soggettivi (o comuni), la cui suddivisione tra le diverse produzioni deve essere stimata attraverso dei parametri di riferimento.

Le difficoltà maggiori che si incontrano in questa fase sono rappresentate da:

- presenza di più produzioni all'interno della stessa azienda;
- entità della componente dei costi comuni da attribuire a specifici oggetti di misurazione;
- complessità delle misurazioni relative al costo dei fattori produttivi reimpiegati;
- l'andamento delle rese produttive del processo agricolo legate all'andamento climatico.

A causa della complessità della zootecnica spesso si ricorre ad approssimazioni, come nel caso del calcolo dei costi relativi all'alimentazione delle vacche, che possono essere attribuiti sia a fini produttivi che a fini riproduttivi.

### 3.2 Metodologia per il calcolo

Caratteristica peculiare dell'agricoltura è la difficoltà nel calcolo dei costi, soprattutto in presenza di più processi produttivi; perciò risulta importante applicare le più corrette metodologie in modo da ridurre il più possibile la componente soggettiva di calcolo (4, 9).

Il metodo di calcolo da noi applicato ha come obiettivi:

- rendere più oggettivo possibile il calcolo dei costi impliciti;
- semplificare e ridurre le operazioni di riparto dei costi;
- limitare le valutazioni soggettive nella ripartizione dei costi comuni.

Questa metodologia di calcolo verrà applicata per determinare il costo di produzione del latte di due aziende, una della provincia di Mantova, ricadente nel comprensorio del Grana Padano, l'altra della provincia di Parma, ricadente nel comprensorio del Parmigiano-Reggiano e che fanno di questa produzione la loro attività principale. Pertanto è possibile applicare la "teoria del Proni" (6), secondo cui il costo di produzione del bene principalmente prodotto dall'azienda può essere calcolato in due fasi:

- calcolo di tutti i costi aziendali nel loro complesso, indistintamente dalle produzioni ottenute;
- sottrazione dai costi totali dell'azienda del costo delle produzioni secondarie, nell'ipotesi che queste ultime siano state ottenute in un mercato di perfetta concorrenza, con profitto nullo. Pertanto il risultato ottenuto è pari al costo della produzione principale, rappresentata dal latte.

Procedendo per fasi, come prima operazione vengono rilevati i costi aziendali attingendo ai dati del bilancio economico dell'azienda e dalle rilevazioni contabili ed extracontabili.

Successivamente si aggiungono a questi costi, comprendenti le spese di reintegrazione e i compensi ai fattori produttivi acquisiti dall'esterno, i compensi ai fattori produttivi forniti dall'imprenditore e dalla sua famiglia. Quindi per la determinazione del costo aziendale è necessaria sia la componente dei costi espliciti che di quelli impliciti.

Per quanto riguarda il calcolo dei costi impliciti, i compensi ai fattori produttivi forniti dall'imprenditore sono attribuiti sulla base delle remunerazioni di mercato di beni analoghi.

### 3.3 Allevamenti sotto controllo

L'azienda presa in esame in Lombardia è specializzata nella produzione di latte, che rappresenta circa il 74% dei ricavi; è ubicata in pianura nella provincia di Mantova, si estende per 43,92 ettari, di cui 25,10 in proprietà. La forma di conduzione è di tipo familiare, con 2,6 unità lavoratrici.

Le coltivazioni praticate sono foraggere e cerealicole per l'alimentazione dei bovini; l'allevamento è costituito da una mandria di 255 bovini di cui 70 vacche in



lattazione, con una produzione secondaria di vitelloni. L'azienda conferisce il latte prodotto a un caseificio cooperativo per la trasformazione in Grana Padano.

Gli stessi calcoli sono stati applicati anche ad un'azienda da latte del parmense, che ha come principale attività la produzione di latte per Parmigiano-Reggiano, con una produzione secondaria di tipo cerealicolo.

Questa azienda è specializzata nella produzione di latte, che rappresenta oltre il 92% dei ricavi; è ubicata nella fascia della bassa pianura della provincia di Parma, si estende per 63 ettari, dei quali 14,70 in proprietà e i restanti 48,30 in affitto. La forma di conduzione è di tipo familiare, con 2,5 unità lavoratrici, in analogia con la prima azienda.

Le coltivazioni praticate sono foraggiere per l'alimentazione dei bovini e cerealicole per una corretta rotazione colturale. L'allevamento è costituito da una mandria di 153 capi di cui 82 vacche, comprese quelle in asciutta. L'azienda conferisce il latte prodotto a un caseificio sociale per la trasformazione in Parmigiano-Reggiano. Pertanto i due allevamenti hanno mandrie di analoga dimensione e tipo d'impresa che ci consentono una omogeneità di confronto dei risultati conseguiti nell'annata 2007.

#### **4. COSTO DI PRODUZIONE DEL LATTE PER GRANA PADANO**

##### **4.1 Costi espliciti**

Dal bilancio economico sono stati estratti i costi espliciti, che sono rappresentati da:

- Spese per il capitale tecnico circolante. Sono le spese sostenute per l'acquisto di capitali circolanti, costituiti da beni che hanno un solo utilizzo produttivo e alla fine di questo si esauriscono. Di questi beni fanno parte: i mangimi e foraggi, i presidi sanitari, i carburanti e lubrificanti, le lettiere, i concimi, le sementi ecc.. Queste voci vengono ricavate dal bilancio economico dell'azienda.

- Quote d'uso dei capitali tecnici fissi. Ne fanno parte le spese sostenute per l'utilizzo dei capitali tecnici fissi, o beni a fecondità ripetuta, sono quei beni che possono essere utilizzati per più cicli produttivi e durano diversi anni; ne fanno parte le quote di ammortamento, le spese di manutenzione e le assicurazioni. Le troviamo nel bilancio economico e richiedono la tenuta degli inventari.

- Spese per i servizi extra-aziendali. Sono le spese sostenute per le prestazioni professionali sanitarie (o di diversa natura), le spese di noleggio di macchine o mezzi, imposte e contributi. Queste spese vengono individuate direttamente dal bilancio economico, o attraverso la visione di fatture o cartelle esattoriali.

- Compensi ai fattori della produzione acquisiti esternamente. Sono le spese sostenute per l'affitto dei terreni non di proprietà, i salari e gli stipendi ai lavoratori dipendenti, se presenti, gli interessi ai capitali presi a prestito. I valori sono desunti dai contratti di affitto, buste paga e mutui bancari in corso.

Analizzando la tabella si nota che dei costi espliciti, oltre il 52% è costituito da spese per l'acquisto di capitale circolante, di queste le voci prevalenti sono quelle degli alimenti e lettimi (26,6%), e la voce dei carburanti e lubrificanti (8,5%).

Le quote per l'uso dei capitali tecnici fissi costituiscono il 23,9% del totale dei costi espliciti, di cui gli ammortamenti contribuiscono per ben il 22%.

Nel complesso le spese di reintegrazione occupano il 73,6% dei costi espliciti, con un valore di 193.021 euro.

Le spese extra-aziendali sono il 14,9%; tra queste i compensi per le prestazioni di professionisti incidono per il 3,4% sul totale dei costi espliciti, mentre più consistente è l'apporto delle imposte e contributi con un 8,2%.

I compensi ai fattori esterni si riferiscono ai canoni pagati per la terra in affitto e agli interessi sui mutui, mentre il lavoro è esclusivamente familiare e i relativi compensi sono inclusi nel reddito netto.

**Tabella 5:** Costi espliciti (valori in euro e in %)

<b>Descrizione</b>	<b>EURO</b>	<b>%</b>
<i>Spese Per Capitale Circolante</i>	<b>132.497</b>	<b>52,4</b>
Sementi	7.400	2,9
Concimi	14.800	5,9
Presidi Sanitari	4.000	1,6
Alimenti E Lettimi	67.197	26,6
Carburanti E Lubrificanti	21.500	8,5
Spese Varie	17.600	7,0
<i>Quote D'uso Dei Capitali Tecnici Fissi</i>	<b>60.524</b>	<b>23,9</b>
Ammortamenti	55.699	22,0
Manutenzioni	3.000	1,2
Assicurazioni	1.825	0,7
<b>Spese Di Reintegrazione</b>	<b>193.021</b>	<b>76,3</b>
<b>Spese Per Servizi Extra-Aziendali</b>	<b>37.795</b>	<b>15,0</b>
Prestazioni Di Professionisti	8.500	3,4
Noleggi	8.645	3,4
Imposte E Contributi	20.650	8,2
<b>Compensi Ai Fattori Di Produzione Esterni</b>	<b>22.074</b>	<b>8,7</b>
Affitto	15.000	5,9
Salari	0	0,0
Interessi	7.074	2,8
<b>Totale Costi Espliciti</b>	<b>252.890</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

#### **4.2 Costi impliciti**

I costi impliciti vengono calcolati in base alla quantità dei fattori conferiti dall'imprenditore. Il compenso ai fattori avviene sulla base dei prezzi di mercato per impieghi alternativi e concorrenti.

Il compenso alla terra di proprietà viene stimato in base all'affitto pagato per la terra non di proprietà, sottraendo gli oneri a carico della proprietà, che sono già stati pagati. Si calcola un compenso medio per ettaro che viene moltiplicato per la superficie di proprietà dell'azienda.

I compensi relativi ai capitali investiti, miglioramenti fondiari e capitale agrario, vengono calcolati per confronto con investimenti di uguale rischio. Per i miglioramenti fondiari è stato applicato un tasso dell'1%, mentre per il capitale agrario che comprende il bestiame, le scorte morte e il capitale di anticipazione, è stato adottato un tasso del 2%. I tassi sono comunque bassi e tengono conto del rendimento attuale del denaro sul mercato.

Viene inoltre preso in considerazione il compenso per il lavoro, poiché si utilizza esclusivamente manodopera familiare, prendendo a riferimento il mercato dei salariati.

**Tabella 6:** Costi impliciti

<b>Compensi calcolati</b>	<b>EURO</b>
Compenso per la terra in proprietà	19.829
Interessi sui miglioramenti fondiari	4.721
Interessi sul capitale agrario	11.534
Compenso per il lavoro familiare	69.000
<b>Totale</b>	<b>105.084</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

### 4.3 I costi totali dell'azienda

I costi totali dell'azienda si ottengono sommando i costi impliciti a quelli espliciti, che sono riferiti a tutti i processi produttivi realizzati nell'annata agraria.

Esaminando le componenti dei costi totali si osserva la forte prevalenza dei costi espliciti, 70,6%. In particolare le spese di reintegrazione costituiscono il 54% del costo totale, mentre i compensi sono il 35,5%; tra questi il lavoro ha la maggiore incidenza con un 19,3%.

**Tabella 7:** Costi totali dell'azienda (valori in euro e in %)

<b>Descrizione</b>	<b>Espliciti (€)</b>	<b>Impliciti (€)</b>	<b>Totale</b>	
			<b>EURO</b>	<b>%</b>
<b>Spese di reintegrazione</b>	<b>193.021</b>	-	<b>193.021</b>	<b>53,9</b>
<b>Spese per servizi extra-aziendali</b>	<b>37.795</b>	-	<b>37.795</b>	<b>10,6</b>
terra	15.000	19.829	34.829	9,7
capitali	7.074	16.255	23.329	6,5
lavoro	0	69.000	69.000	19,3
<b>Compensi</b>	<b>22.074</b>	<b>105.084</b>	<b>127.158</b>	<b>35,5</b>
<b>Costi totali</b>	<b>252.890</b>	<b>105.084</b>	<b>357.974</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

#### 4.4 Il costo delle produzioni secondarie

Nell'ipotesi di un mercato di perfetta concorrenza, applicando la teoria del Proni, il costo delle produzioni secondarie può essere equiparato al prezzo di mercato. Di conseguenza possiamo considerare i costi delle produzioni secondarie pari ai ricavi ottenuti dalla loro vendita. I dati vengono ricavati dalla contabilità aziendale, dal bilancio economico o dalle fatture di vendita. Per ottenere i dati della produzione di carne si fa riferimento all'Utile Lordo Stalla (ULS); si tratta di un bilancio parziale suddiviso in parte attiva e parte passiva, la prima è costituita dai valori finali di stalla e dai capi venduti, e nella seconda è registrato il patrimonio animale iniziale e gli acquisti di bestiame effettuati durante l'annata.

**Tabella 8:** Produzioni aziendali (valori in € e in %)

Descrizione	Euro	%
<b>Produzione principale (latte)</b>	<b>221.867</b>	<b>74,2</b>
<b>Produzioni secondarie</b>	<b>77.300</b>	<b>25,8</b>
- vegetali	0	0,0
- animali	77.300	25,8
- altre	0	0,0
<b>Totale produzioni aziendali</b>	<b>299.167</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

#### 4.5 Calcolo del costo di produzione del latte per Grana Padano

Il calcolo del costo di produzione del latte si ottiene con due semplici operazioni: si sottrae al costo totale aziendale il costo delle produzioni secondarie precedentemente determinato, il risultato ottenuto rappresenta il costo totale del latte prodotto. Questo viene poi diviso per i chilogrammi di latte prodotto durante l'anno, ottenendo così il costo unitario, che nel nostro caso risulta essere di 0,4673 €/Kg, o meglio di 46,73 €/quintale.

**Tabella 9:** Costo di produzione del latte

<b>Descrizione</b>	<b>Euro</b>
Costo aziendale	357.974
Costo delle produzioni secondarie	77.300
<b>Costo del latte</b>	<b>280.674</b>
Totale latte prodotto (kg)	600.683
<b>Costo unitario (euro/Kg)</b>	<b>0,4673</b>
<b>Costo unitario (euro/100Kg)</b>	<b>46,73</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

## **COSTO DI PRODUZIONE DEL LATTE PER PARMIGIANO-REGGIANO**

### **5.1 Costi espliciti**

Come abbiamo illustrato in precedenza, dal bilancio economico sono stati estratti i costi espliciti, che sono rappresentati da:

- spese del capitale tecnico circolante;
- quote d'uso dei capitali tecnici fissi;
- spese per i servizi extra-aziendali;
- compensi ai fattori della produzione acquisiti esternamente.

Dalla seguente tabella si nota che dei costi espliciti, il 49,7% è costituito da spese per l'acquisto di capitale circolante, di queste le voci prevalenti sono quelle degli alimenti e lettimi (29,4%), e la voce delle spese varie (10,8%).

Le quote per l'uso dei capitali tecnici fissi costituiscono il 27,3% del totale dei costi espliciti, di cui il 21,4% è rappresentato dagli ammortamenti.

La somma di queste quote con le spese per il capitale tecnico circolante rappresenta le spese di reintegrazione, che occupano il 77% dei costi espliciti, con un valore di 168.898 euro.

Le spese extraaziendali sono il 9,3%; tra queste i compensi per le prestazioni di professionisti incidono per l'1,9% sul totale dei costi espliciti, i noleggi il 2,5%, invece imposte e contributi per il 4,9%.

Infine vi sono i compensi ai fattori esterni che interessano l'affitto (11,1%) e gli interessi (2,6%). Non vi sono spese per i salariati in quanto il lavoro è fornito dalla famiglia.

**Tabella 10:** Costi espliciti (valori in euro e in %)

<b>Descrizione</b>	<b>Euro</b>	<b>%</b>
<i>Spese per capitale circolante</i>	<b>108.966</b>	<b>49,7</b>
Sementi	3.441	1,6
Concimi	3.122	1,4
Presidi sanitari	4.560	2,1
Alimenti e lettimi	64.507	29,4
Carburanti e lubrificanti	9.631	4,4
Spese varie	23.705	10,8
<i>Quote d'uso dei capitali tecnici fissi</i>	<b>59.932</b>	<b>27,3</b>
Ammortamenti	47.030	21,5
Manutenzioni	5.582	2,5
Assicurazioni	7.320	3,3
<b>Spese di reintegrazione</b>	<b>168.898</b>	<b>77,0</b>
<b>Spese per servizi extra-aziendali</b>	<b>20.282</b>	<b>9,3</b>
Prestazioni di professionisti	4.099	1,9
Noleggi	5.446	2,5
Imposte e contributi	10.737	4,9
<b>Compensi ai fattori di produzione esterni</b>	<b>30.148</b>	<b>13,7</b>
Affitto	24.342	11,1
Salari	0	0,0
Interessi	5.806	2,6
<b>Totale costi espliciti</b>	<b>219.328</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

## 5.2 Costi impliciti

I costi impliciti vengono calcolati in base alla quantità dei fattori conferiti dall'imprenditore. Il compenso ai fattori avviene sulla base dei prezzi di mercato per impieghi alternativi e concorrenti.

Il compenso alla terra di proprietà, come già detto, viene stimato in base all'affitto pagato per la terra non di proprietà, sottraendo gli oneri a carico della proprietà, che sono già stati pagati. Si calcola un compenso medio per ettaro che viene moltiplicato per la superficie di proprietà dell'azienda.

I compensi relativi ai capitali investiti, miglioramenti fondiari e capitale agrario, vengono calcolati per confronto con investimenti di uguale rischio. In analogia con quanto applicato nella prima azienda, si adotta un tasso dell'1% per i miglioramenti fondiari e del 2% per il capitale agrario.

Viene inoltre preso in considerazione il compenso per il lavoro, poiché si utilizza esclusivamente manodopera familiare, adottando gli stessi criteri di calcolo utilizzati in precedenza.

**Tabella 11:** Costi impliciti

<b>Compensi calcolati</b>	<b>Euro</b>
Compenso per la terra in proprietà	7.885
Interessi sui miglioramenti fondiari	2.550
Interessi sul capitale agrario	7.442
Compenso per il lavoro familiare	79.440
<b>Totali</b>	<b>97.317</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

### 5.3 I costi totali dell'azienda

I costi totali dell'azienda si ottengono sommando i costi impliciti ai costi espliciti, e sono riferiti a tutti i processi produttivi dell'annata agraria.

**Tabella 12:** Costi totali dell'azienda (valori in euro e in %)

<b>Descrizione</b>	<b>Espliciti (€)</b>	<b>Impliciti (€)</b>	<b>Totale</b>	
			<b>Euro</b>	<b>%</b>
<b>Spese di reintegrazione</b>	<b>189.180</b>	0	<b>189.180</b>	<b>59,7</b>
<b>Spese per servizi extra-aziendali</b>	<b>20.282</b>			<b>6,4</b>
Terra	24.342	7.885	32.227	10,2
Capitali	5.806	9.992	15.798	5,0
Lavoro	0	79.440	79.440	25,1
<b>Compensi</b>	<b>30.148</b>	<b>97.317</b>	<b>127.465</b>	<b>40,3</b>
<b>Costi totali</b>	<b>219.328</b>	<b>97.317</b>	<b>316.645</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

Confrontando le componenti dei costi totali si osserva la forte prevalenza dei costi espliciti che incidono per quasi il 70%; in particolare le spese di reintegrazione costituiscono il 59,7% del costo totale, i compensi invece rivestono il 40,3% e tra questi il lavoro ha maggiore incidenza con un 25,1%.

### 5.4 Il costo delle produzioni secondarie

Secondo la già citata teoria del Proni, nell'ipotesi di un mercato di perfetta concorrenza, il costo delle produzioni secondarie può essere equiparato al prezzo di mercato. Di conseguenza possiamo considerare i costi delle produzioni secondarie pari ai ricavi ottenuti dalla loro vendita.

Dalla tabella si nota che le produzioni secondarie rappresentano il 7,5% della

produzione lorda vendibile aziendale (PLV), perciò una percentuale relativamente bassa, che conferma la validità nell'uso della teoria del Proni.

**Tabella 13:** Produzioni aziendali (valori in euro e in %)

Descrizione	EURO	%
<b>Produzione principale (latte)</b>	<b>283.925</b>	<b>92,5</b>
<b>Produzioni secondarie</b>	<b>23.012</b>	<b>7,5</b>
- vegetali	7.910	2,6
- animali	15.102	4,9
- altre		
<b>Totale produzioni aziendali</b>	<b>306.937</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

### 5.5 Calcolo del costo di produzione del latte per Parmigiano-Reggiano

Il calcolo del costo di produzione del latte si ottiene sottraendo al costo totale aziendale il costo delle produzioni secondarie, il risultato ottenuto rappresenta il costo totale del latte. Questo viene poi diviso per i chilogrammi di latte prodotto durante l'anno, ottenendo così il costo unitario, che nel nostro caso risulta essere di euro 0,5016 €/Kg, pari a 50,16 €/quintale.

**Tabella 14:** Costi di produzione del latte per Parmigiano-Reggiano

Descrizione	Euro
Costo aziendale	316.145
Costo delle produzioni secondarie	23.012
<b>Costo del latte</b>	<b>293.133</b>
Totale latte prodotto (kg)	584.399
<b>Costo unitario (euro/Kg)</b>	<b>0,5016</b>
<b>Costo unitario (euro/100Kg)</b>	<b>50,16</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

## 6. ANALISI COMPARATIVA: LA FORBICE PREZZI/COSTI

Confrontando il costo di produzione del latte dell'azienda che produce latte per Grana Padano, con quella che produce per Parmigiano-Reggiano abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

- 46,73 €/100 Kg per il latte destinato a Grana Padano;
- 50,16 €/100 Kg per il latte destinato a Parmigiano-Reggiano.

Il costo di produzione è frutto dei risultati economici dell'azienda ed è quindi legato alle capacità imprenditoriali. Possiamo pertanto ritenere, in linea teorica,



che vi siano tanti costi di produzione quanti sono gli imprenditori. In realtà il costo di produzione assume dei valori che sono strettamente correlati ad alcune variabili, in particolare hanno una forte incidenza:

- la dimensione della mandria;
- la produttività dei capi;
- il tipo di stabulazione.

Il costo di produzione del latte diminuisce all'aumento della dimensione della mandria, grazie agli effetti positivi delle economie di scala. In questa direzione si stanno orientando anche i nostri allevamenti, anche se il livello raggiunto è ancora da migliorare. Diverse ricerche hanno dimostrato tale correlazione (3, 7, 8).

Analoga correlazione è stata ottenuta anche per quanto riguarda il costo del latte e la produttività delle vacche. Le vacche più produttive portano a ridurre il costo di produzione del latte per la legge della produttività decrescente. Gli allevatori infatti hanno operato sulla selezione alzando continuamente il livello di produttività delle lattifere (3, 7, 8).

Anche il tipo di stabulazione ha un ruolo importante nel determinare il costo di produzione del latte, con valori superiori nella stabulazione tradizionale (fissa groppa-groppa e testa-testa) e via via discendendo in quelle libere moderne. Il fattore limitante è il fabbisogno di lavoro che decresce all'ammodernamento del tipo di stabulazione.

**Tabella 15:** La forbice prezzo/costo del latte aziendale

Aziende	Formaggio	Prezzo	Costo	Differenza			
				Senza contributi pubblici		Con contributi pubblici	
				euro	%	euro	%
A	Grana Padano	36,93	46,73	-9,8	-21,0	-5,4	-12,7
B	Parmigiano Reggiano	46,00	50,16	-4,16	-8,3	-0,95	-2

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

Accanto alle variabili zootecniche indicate, si aggiungono altri fattori che possono manifestare la loro influenza sul costo di produzione del latte; basti ricordare la quota altimetrica che mette in evidenza condizioni più o meno favorevoli all'allevamento che si ripercuotono poi sui costi aziendali.

I risultati ottenuti sul costo di produzione possono essere raffrontati con i prezzi alla produzione del latte, rappresentati dal prezzo di trasformazione che i caseifici cooperativi hanno liquidato ai soci conferenti latte per Grana Padano e Parmigiano-Reggiano. Pur tenendo conto della ridotta rappresentatività dei casi indagati, si possono cogliere alcuni aspetti differenziali tra i due modi di produrre.

Secondo le nostre rilevazioni, i prezzi del latte privilegiano l'azienda del comprensorio del Parmigiano-Reggiano, mentre il costo di produzione quella del

Grana Padano. La forbice prezzo/costo vede emergere il vantaggio relativo del Parmigiano-Reggiano. Infatti a maggiori costi si contrappongono anche maggiori prezzi, tali da privilegiare nel nostro caso il processo produttivo più oneroso, perché trova adeguata compensazione nel prezzo.

In ogni caso il profitto è negativo per entrambe le tipologie di formaggio. Tenendo conto dei contributi comunitari alla produzione del latte i risultati sono meno penalizzanti per il latte destinato alla produzione in Parmigiano Reggiano, che si avvicina al pareggio Prezzo/Costo. Per il latte destinato a Grana Padano il pareggio è più lontano.

Avendo preso in esame due realtà aziendali assai simili nelle condizioni strutturali, si ritiene che le indicazioni emerse siano di particolare interesse ed attualità per valutare gli aspetti a favore e a sfavore dei due modi di produrre.

## 7. CONCLUSIONI

Le produzioni tipiche stanno ottenendo notevoli successi sul mercato nazionale e in parte anche in quello estero. Nonostante i crescenti potenziali di domanda, questi non vengono pienamente sfruttati dall'imprenditoria locale, per cui vengono saturati da prodotti qualitativamente inferiori, ma con prezzi più competitivi. In prospettiva si nota una tendenza alla perdita delle posizioni sui mercati, con ripercussioni dirette sull'agricoltura, che rappresenta il primo anello del nostro sistema agroalimentare.

In questo contesto di difficoltà economica del settore agricolo, ed in particolare di quello zootecnico, sono in corso processi di adattamento e di modernizzazione dell'agricoltura che fanno perno principalmente su:

- miglioramento delle strutture produttive;
- miglioramento delle condizioni mercantili.

A livello strutturale gli allevamenti hanno compiuto notevoli adeguamenti, soprattutto nel comprensorio del Grana Padano rispetto a quello del Parmigiano-Reggiano, con ampliamento delle mandrie e crescita di produttività dei capi, ad un ritmo decisamente inferiore rispetto ad altri paesi europei concorrenti.

Per quanto riguarda la dimensione dei caseifici è importante mettere in evidenza che il comprensorio del Parmigiano-Reggiano si trova penalizzato perché le dimensioni sono ancora troppo piccole rispetto a quelle del Grana Padano e non possono beneficiare delle economie di scala per abbattere i costi di produzione.

Sul fronte mercantile vi è ancora molto da fare poiché i produttori sono poco organizzati e dispersi nell'offerta. Ciò comporta una penalizzazione nel potere contrattuale sul mercato che si riflette sulla situazione di difficoltà che oggi attraversa il comparto lattiero-caseario.

La situazione attuale del comparto lattiero-caseario legato ai formaggi dop è particolarmente critica, considerando la persistenza delle seguenti condizioni strutturali e mercantili:

- le ridotte dimensioni degli allevamenti comportano un aggravio dei costi di produzione;
- i vincoli legati alla produzione del latte per Parmigiano-Reggiano accresco-

no ulteriormente gli oneri aziendali;

- la dimensione ridotta dei caseifici appesantisce i costi di trasformazione del latte in formaggio;

- il mercato dei formaggi duri sta attraversando da alcuni anni una situazione di crisi, con un calo persistente dei prezzi.

Se da un lato il Grana Padano riesce meglio a difendersi sui costi attuando forti economie di scala, sia negli allevamenti che nei caseifici, è altrettanto vero che non riesce a realizzare prezzi di mercato analoghi al Parmigiano-Reggiano.

Possiamo pertanto concludere che l'analisi condotta ha messo in evidenza la necessità di migliorare le strutture degli allevamenti con l'allargamento delle mandrie e l'adozione delle nuove tecnologie in grado di migliorare l'efficienza aziendale e ridurre il costo di produzione del latte. Nel contempo dovranno adeguarsi anche i caseifici con accorpamenti che puntino ad aumentare la capacità di trasformazione per ridurre i relativi costi, con maggiore attualità per il Parmigiano-Reggiano.

Sul fronte mercantile i due formaggi D.O.P. dovranno valorizzare maggiormente le loro caratteristiche di tipicità e qualità del prodotto in modo da giustificare agli occhi del consumatore i maggiori prezzi di mercato rispetto ai formaggi concorrenti attraverso un'attività di commercializzazione dei prodotti che consenta agli allevatori di tenere sotto controllo l'intera filiera produttiva sulle varie fasi:

- produzione del latte;
- trasformazione del latte in formaggio;
- stagionatura del formaggio;
- commercializzazione del formaggio.

Altrettanto importante è la tutela dei due formaggi D.O.P. anche a livello internazionale dove su dieci prodotti che vengono spacciati per italiani, solo tre sono realmente prodotti nel territorio nazionale; inoltre esistono cloni, imitazioni e marchi contraffatti, come ad esempio per il "Parmesan".

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Bartolini R. (2008): "Costi alti, prezzi in stallo ma occorra investire di più". Terra e Vita, n. 40, Edagricole.
- 2) Bregoli A. (1987): "Bilancio e contabilità nell'azienda agraria". Liviana editrice, Padova.
- 3) DE ROEST K., MENGHI A., CORRADINI E.: (2008) "Costi di produzione e di trasformazione del latte in Emilia-Romagna". C.R.P.A. Notizie, n. 8/2008. Tecnograf, Reggio Emilia, 2008.
- 4) 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.
- 5) Pieri R. e Del Bravo F. : (2007) "Il Mercato del Latte. Rapporto 2007". Franco Angeli, Milano.
- 6) PRONI G.: (1940) "Contributo allo studio del costo di produzione in agricoltura". INEA, Roma.
- 7) Salghetti A. : (1995) "La programmazione delle aziende lattifere: simulazione

su un gruppo di studio”. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma.

- 8) Salghetti A., Ferri G. : (2005) “Metodologia di calcolo del costo di produzione del latte e analisi applicativa su allevamenti convenzionali e biologici”. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma.
- 9) TOZZI I. : (1995) “Il metodo ABC per il calcolo del costo di prodotto”. Cisb, Bologna.
- 10) CFGP: (2008) “Relazione del consiglio d’amministrazione sulla situazione della società e sull’andamento della gestione a corredo del bilancio d’esercizio 2007”. Consorzio per la tutela del formaggio Grana Padano, Desenzano del Garda.
- 11) CFPR: (2008) “Relazione del Presidente del Consorzio del Parmigiano Reggiano alla Assemblea Generale dei Delegati del 19 marzo 2008”, Reggio Emilia.

## **ASPETTI TECNICI, ECONOMICI ED AMBIENTALI DELLA GESTIONE DEI REFLUI E DEI RIFIUTI NELLE AZIENDE AGRICOLE ZOOTECHNICHE<sup>1</sup>**

### **TECHNICAL, ECONOMIC AND ENVIRONMENTAL ASPECTS OF THE MANAGEMENT OF EFFLUENT AND WASTE IN LIVESTOCK FARM BUSINESSES**

Salghetti A., Ferri G., Manghi E. <sup>2</sup>, De Cao E. <sup>3</sup>

#### **PAROLE CHIAVE:**

azienda agricola, reflui, rifiuti, economia, ambiente

#### **KEY WORDS:**

farm business, effluent, waste, economy, environment

#### **RIASSUNTO**

La concentrazione degli allevamenti di tipo intensivo in aree ristrette e le produzioni zootecniche realizzate “senza terra” stanno intaccando lo stretto legame che si era andato sviluppando tra allevamento e fertilità del suolo, con una progressiva riduzione degli apporti di sostanza organica al terreno in vaste aree e un accumulo di grandi volumi di reflui e di rifiuti in aree più ristrette, che possono diventare un potenziale inquinante per l’ambiente.

La gestione dei reflui e dei rifiuti nelle aziende agricole rappresenta quindi un nuovo onere per l’imprenditore agricolo che è chiamato a rispettare le norme della Politica Agricola Comunitaria e della legislazione nazionale e regionale sul loro smaltimento e sulla salvaguardia dell’ambiente dall’inquinamento di sostanze pericolose.

Per prendere coscienza delle problematiche dello smaltimento dei reflui e dei rifiuti abbiamo svolto un’indagine in un’azienda agricola zootecnica, valutando gli aspetti economici ed organizzativi e l’onere sul bilancio economico. I risultati della ricerca hanno messo in evidenza che la corretta gestione dei reflui è nell’interesse dello stesso imprenditore agricolo, per una migliore valorizzazione della funzione fertilizzante, nella salvaguardia dell’ambiente.

---

1 Lavoro eseguito con finanziamento FIL (ex quota 60%). Lo studio è frutto del lavoro comune degli autori. Tuttavia in sede di stesura del testo Andrea Salghetti ha redatto i paragrafi 1 e 6; Giovanni Ferri il paragrafo 4; Elisa Manghi i paragrafi 2 e 3; mentre Eleonora De Cao il paragrafo 5.

2 Sezione Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

3 Laureata in Tecnologie delle Produzioni Animali e Sicurezza degli Alimenti.

Per quanto riguarda i rifiuti, l'imprenditore è tenuto a rispettare le normative vigenti per la salvaguardia della sua salute e di quella della collettività, tenuto conto che il relativo onere per lo smaltimento non incide in modo significativo sul bilancio, soprattutto se la gestione dello smaltimento è condotta in forma associata con altri imprenditori agricoli e con il supporto organizzativo di Enti pubblici.

## **ABSTRACT**

The concentration of intensive breeding farms in limited areas and the livestock production generated "without land" are damaging the close bond that was developing between breeding and soil fertility, with a progressive reduction in the input of organics substances to the land in extensive areas and an accumulation of large volumes of effluent and waste – potential pollutants for the environment – in more restricted areas.

The management of effluent and waste in farm businesses is therefore a new burden for the agricultural entrepreneur who is called upon to observe the standards laid down by the Common Agricultural Policy and by national and regional legislation with regard to their disposal and to the protection of the environment from pollution caused by hazardous substances.

To become fully aware of the problems related to the disposal of effluent and waste, we carried out an investigation in a livestock farm business, evaluating the economic and organisational aspects and the burden on the economic balance. The results of the research demonstrated that the correct management of effluent is in the interests of the farmer himself, with a view to improving the fertilizing function, for the protection of the environment.

As regards wastes, the farmer is obliged to observe the regulations in force for the protection of his own health and that of the community at large, in consideration of the fact that the relative burden for their disposal does not have a significant impact on his budget, especially if the said disposal is managed in association with other agricultural entrepreneurs and with the organisational support of Public Bodies.

## **1. INTRODUZIONE**

Lo smaltimento dei rifiuti e dei reflui nelle aziende agricole deve essere svolto nel rispetto della normativa vigente per la salvaguardia e la tutela dell'ambiente. Chi gestisce un'azienda agricola è anche un produttore di rifiuti e reflui ed è tenuto a rispettare degli obblighi riguardanti la raccolta, la cernita, il trasporto, il trattamento, nonché l'ammasso e il deposito dei medesimi sul suolo o nel suolo, le operazioni di trasformazione necessarie per il riutilizzo, il recupero o il riciclo dei medesimi. Nel caso in cui le disposizioni previste dalla normativa non vengano rispettate sono previste delle sanzioni.

Negli ultimi decenni in Italia abbiamo assistito all'aumento degli apporti dei concimi di sintesi, di pesticidi e fitofarmaci, all'aumento della meccanizzazione nelle varie fasi lavorative, ad una progressiva intensificazione delle produzioni agricole

attraverso la selezione varietale, alla concentrazione e all'incremento del carico di bestiame su zone ristrette di territorio.

La concentrazione degli allevamenti di tipo intensivo in aree localizzate e le produzioni zootecniche realizzate "senza terra" hanno comportato conseguenze negative per l'ambiente e intaccato lo stretto legame che si era andato sviluppando tra allevamento e fertilità del suolo con una progressiva riduzione degli apporti di sostanza organica al terreno in certe aree e ad un contemporaneo accumulo di grandi volumi di liquami zootecnici in altre aree che, non essendo più inseriti e commisurati alla logica e alle esigenze agronomiche aziendali, sono diventati un potenziale inquinante (8).

Sorge quindi il problema di gestire correttamente i grandi quantitativi di deiezioni, innanzitutto per le aziende senza terra e per le aziende che, pur avendo terreno su cui spandere gli effluenti, non possono smaltire le eccedenze, sia per motivi agronomici sia per vincoli ambientali.

L'allevamento zootecnico in particolare è uno dei principali responsabili dell'inquinamento diffuso, soprattutto in quelle regioni dove risulta essere elevata la concentrazione di allevamenti (bovini, suini). Secondo i dati dell'ultimo Censimento Generale dell'agricoltura italiana (5), infatti, oltre 1/3 degli allevamenti bovini nazionali è dislocato in sole 3 regioni italiane: Veneto (12,5%), Lombardia (11,4%) e Piemonte (10,8%). Tali regioni si attribuiscono, inoltre, complessivamente il 55,5% del patrimonio nazionale e con l'aggiunta del 10,3% allevato in Emilia Romagna, in pratica oltre 2/3 della consistenza nazionale di bovini risultano concentrati in 4 regioni. Discorso analogo si ha per la suinicoltura che vede concentrare in sole tre regioni il numero di capi allevati: Lombardia (44,4% del patrimonio nazionale), Emilia Romagna (18,0%) e Piemonte (10,7%).

In queste condizioni, si fa strada, fra gli operatori agricoli ed i vari soggetti istituzionali del settore, la consapevolezza che uno sfruttamento intensivo del suolo, se non efficacemente governato, non solo si ripercuote negativamente sull'ambiente circostante con problemi di inquinamento e di degrado delle risorse naturali, ma può anche avere effetti negativi sui valori qualitativi e quantitativi delle produzioni e sulla redditività e competitività delle aziende (4).

## **2. ATTIVITÀ AGRICOLA E AMBIENTE**

Il lavoro agricolo, frutto di tradizione ed esperienza, ha per secoli modellato, quasi plasmato, il territorio senza stravolgerlo e deturparlo. Oggi però l'agricoltura costituisce un settore estremamente variegato e complesso che può, e spesso produce, ingenti danni all'ambiente. L'inquinamento del suolo, dell'acqua e dell'aria, la frammentazione degli habitat e la scomparsa della fauna selvatica possono essere frutto di pratiche agricole e di utilizzo della terra inappropriati. Per questi motivi la PAC (Politica Agricola Comunitaria) ed i regolamenti dell'UE sono sempre più spesso finalizzati a garantire la sostenibilità ambientale (1). La riforma della PAC del 2003 ha rafforzato una serie di misure che incoraggiano una migliore utilizzazione dei terreni e pratiche agricole compatibili con la protezione delle risorse ambientali attraverso il disaccoppiamento, la condizionalità obbligatoria, la modulazione e una serie di misure

volte a promuovere la protezione dell'ambiente (misure agro-ambientali, il sostegno agli agricoltori nelle zone Natura 2000 e in altre zone di grande pregio naturale e il sostegno alle zone svantaggiate) (9).

Con il disaccoppiamento si vuole slegare il legame pre-esistente tra entità di pagamento e produzione effettuata, riducendo in questo modo gli incentivi alle pratiche agricole intensive e adottando un regime di pagamento unico. La condizionalità prevede che gli agricoltori riceveranno le sovvenzioni solo se rispetteranno i requisiti di protezione dell'ambiente. La modulazione prevede che tutti gli Stati membri dell'UE possano applicare una riduzione agli importi dei pagamenti diretti da assegnare sul loro territorio; gli importi netti risultanti verranno messi a disposizione nello Stato membro in cui sono generati per aumentare la dotazione disponibile per le misure agro-ambientali, in questo modo vengono trasferiti fondi dal primo al secondo pilastro (7).

### **3. LE NORME LEGISLATIVE**

La normativa nazionale che regola la gestione dei reflui e dei rifiuti delle attività agricole e agro-industriali è contenuta nel Decreto Legislativo n. 152 del 3/04/06 (Norme in materia ambientale). La normativa è di recente introduzione e cerca di fare fronte alle carenze legislative precedenti e di adeguarsi all'evoluzione dell'attività agricola e di quella agro-industriale, volte a concentrare i processi di produzione e di trasformazione in grosse entità imprenditoriali in ambiti piuttosto ristretti (3).

L'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento, delle acque di vegetazione residue dalla lavorazione delle olive, delle acque reflue provenienti da aziende agricole e piccole aziende agro-alimentari dalla loro produzione fino all'applicazione al terreno ovvero al loro utilizzo irriguo è soggetta a comunicazione all'autorità competente ai sensi dell'art.75 del Decreto Legislativo. Le Regioni disciplinano le attività di utilizzazione agronomica sulla base dei criteri e delle norme tecniche generali adottati con decreto del Ministro delle politiche agricole e forestali, di concerto con i Ministri dell'ambiente e della tutela del territorio, delle attività produttive, della salute e delle infrastrutture e dei trasporti.

Per quanto riguarda la Regione Lombardia con d.g.r. del 21/11/2007 n. 8/5868 (2) ha deliberato un'integrazione con modifica al programma d'azione per la tutela e il risanamento delle acque dall'inquinamento causato da nitrati di origine agricola per le aziende localizzate in zone vulnerabili (D.L. n. 152/2006 e D.M. 7/04/2006) e l'adeguamento dei criteri e delle norme tecniche generali.

La quarta parte del Decreto Legislativo n. 152 si occupa delle "Norme in materia di gestione dei rifiuti e di bonifica dei siti inquinanti". La gestione dei rifiuti viene disciplinata per assicurare protezione all'ambiente e controlli efficaci, tenendo conto della specificità dei rifiuti pericolosi. I rifiuti devono essere recuperati o smaltiti senza pericolo per la salute dell'uomo e senza usare procedimenti o metodi che potrebbero recare pregiudizio all'ambiente e, in particolare, senza determinare rischi per l'acqua, l'aria, il suolo, nonché per la fauna e la flora, senza causare inconvenienti da rumori o odori e senza danneggiare il paesaggio e i siti di particolare interesse.



All'articolo 184 del decreto i rifiuti vengono classificati in rifiuti urbani e rifiuti speciali. I rifiuti da attività agricole e agro-industriali sono classificati come rifiuti speciali. Sono esclusi dalla disciplina di gestione dei rifiuti, ai sensi dell'articolo 185 comma 1, lettera e) del decreto legislativo *“le carogne ed i seguenti rifiuti agricoli: materie fecali ed altre sostanze naturali non pericolose utilizzate nelle attività agricole ed in particolare i materiali litoidi o vegetali e le terre da coltivazione, anche sotto forma di fanghi, provenienti dalla pulizia e dal lavaggio dei prodotti vegetali riutilizzati nelle normali pratiche agricole e di conduzione dei fondi rustici, anche dopo trattamento in impianti aziendali ed interaziendali agricoli che riducano i carichi inquinanti e potenzialmente patogeni dei materiali di partenza”*.

Gli oneri relativi alle attività di smaltimento, secondo l'articolo 189, sono a carico del produttore che deve consegnare i rifiuti ad un raccogliatore autorizzato o ad un soggetto che effettua le operazioni di smaltimento. Chiunque effettua a titolo professionale attività di raccolta e trasporto dei rifiuti deve comunicare annualmente alla Camera di Commercio Industria, Artigianato e Agricoltura competente le quantità e le caratteristiche qualitative dei rifiuti oggetto dell'attività attraverso la compilazione del MUD (Modello unico di dichiarazione ambientale). *Sono esonerati dall'obbligo gli imprenditori agricoli con un volume di affari annuo non superiore a ottomila euro, le imprese che raccolgono e trasportano i propri rifiuti non pericolosi e, per i soli rifiuti non pericolosi, le imprese e gli enti produttori iniziali che non hanno più di 10 dipendenti*. Tali soggetti (art. 190) hanno l'obbligo di tenere un registro di carico e scarico su cui annotare le informazioni sulle caratteristiche qualitative e quantitative dei rifiuti. Il registro tenuto dagli stabilimenti e dalle imprese che svolgono attività di smaltimento e di recupero di rifiuti deve contenere l'origine, la quantità, le caratteristiche e la destinazione specifica dei rifiuti, la data del carico e dello scarico dei rifiuti ed il mezzo di trasporto utilizzato, il metodo di trattamento impiegato. *I registri sono tenuti presso ogni impianto di produzione, di stoccaggio, di recupero e di smaltimento di rifiuti, nonché presso la sede delle imprese che effettuano attività di raccolta e di trasporto, nonché presso la sede dei commercianti e degli intermediari. L'abbandono e il deposito incontrollati di rifiuti sul suolo e nel suolo, secondo l'articolo 192, è vietato ed è vietata l'immissione di rifiuti di qualsiasi genere, allo stato solido o liquido, nelle acque superficiale o sotterranee.*

Durante il trasporto effettuato da enti o imprese, secondo l'art. 193, i rifiuti vanno accompagnati da un formulario di identificazione dal quale devono risultare il nome e l'indirizzo del produttore e del detentore, la quantità del rifiuto (espressa in kg o in litri), l'impianto di destinazione, la data e il percorso dell'istradamento, il nome e l'indirizzo del trasportatore con il numero di iscrizione all'albo delle imprese che effettuano attività di gestione dei rifiuti, il nome e l'indirizzo del destinatario con gli estremi dell'autorizzazione.

Le Regioni devono predisporre piani regionali di gestione dei rifiuti assicurando adeguata pubblicità e la massima partecipazione dei cittadini, tali piani prevedono misure tese alla riduzione della quantità, dei volumi e della pericolosità dei rifiuti.

I soggetti che intendono realizzare e gestire nuovi impianti di smaltimento o di recupero dei rifiuti, anche pericolosi, secondo l'articolo 208, devono presentare

apposita domanda alla regione competente per territorio, allegando il progetto definitivo dell'impianto e la documentazione tecnica prevista per la realizzazione del progetto stesso.

Sono sottoposti a sanzione amministrativa pecuniaria, ai sensi dell'articolo 255, coloro i quali abbandonano o depositano i rifiuti nelle acque superficiali o sotterranee o sul suolo e sono sottoposti a sanzione amministrativa e alla reclusione per un periodo di tempo variabile coloro i quali effettuano un'attività di raccolta, trasporto, recupero, smaltimento, commercio ed intermediazione di rifiuti in mancanza della prescritta autorizzazione, iscrizione o comunicazione.

#### 4. GESTIONE TECNICA DEI RIFIUTI

In ambito agricolo abbiamo due tipologie di rifiuti, quelli provenienti dalle abitazioni rurali, che vengono classificati come rifiuti urbani e quindi sono soggetti alla tassa per lo smaltimento dei rifiuti solidi urbani e sono da depositare negli appositi cassonetti del servizio pubblico, e quelli provenienti dall'esercizio delle attività agricole, che come abbiamo già avuto modo di vedere nel precedente paragrafo, sono classificati come rifiuti speciali e si dividono in rifiuti speciali non pericolosi e rifiuti speciali pericolosi. In attesa che venga istituito ufficialmente l'elenco dei rifiuti, continuano ad applicarsi le disposizioni di cui alla direttiva del Ministro dell'ambiente e della tutela del territorio del 9 aprile 2002, riportata nell'Allegato D alla parte quarta del decreto legislativo 03/04/2006 n. 152 nella classe 02 *Rifiuti prodotti da agricoltura, orticoltura, acquicoltura, caccia e pesca*. I rifiuti pericolosi riportati nell'elenco sono contraddistinti con un asterisco e per questi sono previsti adempimenti aggiuntivi.

Per i rifiuti speciali, le aziende agricole sono tenute a seguire le modalità di gestione previste: deposito temporaneo degli stessi, classificazione, registrazione e trasmissione delle informazioni sui quantitativi prodotti alle autorità competenti (6).

I rifiuti speciali non pericolosi più ricorrenti, che costituiscono la parte prevalente dei rifiuti prodotti dall'azienda agricola, sono: materie plastiche (nylon per la pacciamatura, tubi PVC per l'irrigazione, manichette, teloni di copertura di serre, ecc.), imballaggi carta, cartone, plastica, legno e metallo (sacchi delle sementi, dei concimi e dei mangimi, cassette della frutta, contenitori del florovivaismo, ecc.), oli vegetali esausti, fanghi di sedimentazione ed effluenti di allevamento non impiegati ai fini agronomici, pneumatici usati, contenitori di fitofarmaci bonificati, veicoli e macchine da rottamare, scarti vegetali in genere, purché non destinati al reimpiego nelle normali pratiche agricole. Tali rifiuti devono essere raccolti ed avviati alle operazioni di recupero o smaltimento con cadenza almeno trimestrale indipendentemente dalle quantità in deposito o quando il quantitativo raggiunge i 20 metri cubi; devono inoltre essere conservati in azienda, raggruppati per tipi omogenei, in luoghi idonei ad evitare pericoli di incendio.

I rifiuti pericolosi più frequentemente prodotti dalle imprese agricole sono invece: oli esauriti da motori, freni, trasmissioni idrauliche, batterie esauste, fitofarmaci non più utilizzabili, contenitori di fitofarmaci non bonificati, farmaci ad uso zootecnico scaduti o inutilizzabili. Essi devono essere raccolti ed avviati alle operazioni

di recupero o di smaltimento con cadenza almeno bimestrale indipendentemente dalle quantità in deposito o in alternativa quando il quantitativo dei rifiuti pericolosi in deposito raggiunge e supera 10 metri cubi; devono inoltre essere raggruppati per tipi omogenei in contenitori e luoghi idonei senza portare rischi per l'acqua, il suolo, la fauna, la flora e il paesaggio.

Il controllo e la verifica su tutte le attività di gestione dei rifiuti agricoli è esercitato dalla provincia con l'ausilio del personale ARPA che sono autorizzati ad effettuare ispezioni, verifiche e prelievi.

## **5. INDAGINE AZIENDALE**

### **5.1 Caratteristiche dell'azienda**

L'azienda presa in esame è un'azienda con bovine da latte situata in provincia di Mantova. Nell'azienda sono presenti 300 capi, di cui 170 vacche in lattazione e 130 tra vitelli e manze.

L'azienda possiede 250 biolche mantovane di terra in proprietà e 190 biolche mantovane in affitto, pari complessivamente a 138 ettari. Si coltivano colture foragere (medica, loietto, prati polifiti) e cereali (mais e orzo).

Nell'azienda si producono giornalmente circa 40 quintali di latte e annualmente 14.600 quintali. Il latte prodotto viene trasformato in formaggio Grana Padano (circa 8 forme al giorno), mentre la parte residua viene conferita ad un caseificio sociale della zona.

Si tratta di un'azienda a conduzione prevalentemente famigliare che fa ricorso a personale esterno solamente in alcuni mesi dell'anno.

### **5.2 Le problematiche dello smaltimento dei rifiuti**

Per lo smaltimento dei rifiuti l'azienda agricola presa in esame ha stipulato un contratto con un'azienda certificata (Fincom Italia) che si occupa di raccolta, recupero, smaltimento di rifiuti industriali. Il contratto con questa azienda si rinnova automaticamente di anno in anno, salvo disdetta di una delle due parti da inviarsi entro il 30/09 di ogni anno.

I costi di smaltimento relativi ai diversi rifiuti variano a seconda del quantitativo prodotto e sono elencati nella tabella. I costi elencati di seguito sono i costi di smaltimento a cui dovranno essere aggiunti i costi di trasporto che si diversificano a seconda della tipologia di rifiuti.

Per quanto riguarda invece la gestione e i relativi costi di smaltimento delle carogne, l'azienda ha stipulato una polizza con l'Associazione Allevatori di Mantova per la copertura di quelli che sono i danni agli allevamenti bovini, che prevede, indipendentemente dal numero di capi morti in allevamento, il pagamento di euro 990 nel periodo che va dal 30/09/2006 fino al 31/12/2007. Il prezzo della polizza viene calcolato in base al numero di capi bovini presenti in allevamento.

Per quanto poi riguarda lo smaltimento del letame e liquame, l'azienda possiede terreni, in termini quantitativi sufficienti, per poterli smaltire senza dover far

fronte a spese per l'affitto di terreni; deve invece affrontare, ogni due anni, la spesa per sottoporre a manutenzione i mezzi che vengono utilizzati per lo spandimento del liquame e del letame.

**Tabella 1:** Spesa per lo smaltimento dei rifiuti aziendali

<b>Tipo di rifiuto</b>	<b>Conservazione</b>	<b>Spesa per smaltimento</b>
olio esausto	canestri o fusti	gratuita per qualsiasi quantitativo
batterie	sfuse	gratuita per qualsiasi quantitativo
filtri di olio e gasolio asciutto	sacchi legati	gratuita fino a 2 Kg, oltre i 2 Kg la spesa è di 0,34 euro al Kg
filtri e gasolio gocciolanti	fusti chiusi	spesa di 0,45 euro al Kg, compreso il peso del fusto
contenitori dei medicinali	sacchi legati	gratuita fino a 5 Kg, oltre i 5 Kg la spesa è di 0,24 euro al Kg
contenitori bonificati in plastica	sacchi legati	gratuita fino a 5 Kg, oltre i 5 Kg la spesa è di 0,37 euro al Kg
contenitori sporchi di fitofarmaci	sacchi legati	spesa di 1,14 euro al Kg, compreso il peso del sacco
reti insaccate, sacchi di concime, plastica mista in piccole quantità	sacchi legati	gratuita fino a 5 Kg, oltre i 5 Kg la spesa è di 0,24 euro al Kg
teli in polietilene	puliti, piegati e arrotolati	gratuita per qualsiasi quantitativo
pneumatici di autovetture senza cerchio	sfusi	spesa di 0,13 euro al Kg
pneumatici grandi senza cerchio	sfusi	spesa di 0,18 euro al Kg
rifiuti plastici, contenitori, corde e reti	sacchi legati	spesa di 0,15 euro al Kg
solo reti	in cumulo	spesa di 0,16 euro al Kg

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

Altra spesa che l'azienda si trova a dover affrontare è la spesa per un agronomo, appartenente al Servizio Attività Produttive del Comune di Borgoforte (Mn), l'agronomo viene retribuito in base alle dimensioni dell'azienda ed informa l'azienda agricola su eventuali nuove normative riguardanti la gestione dei reflui, tempi di stoccaggio, metodiche di spandimento ecc.

### 5.3 Analisi di bilancio

I dati raccolti in azienda ci hanno permesso di redigere il bilancio aziendale dalla cui analisi è emerso che le principali spese cui l'azienda deve far fronte sono le spese di reintegrazione (355.138 euro), date dalla somma delle spese per il capitale circolante (spese per l'acquisto di sementi, concimi, mangimi, medicinali, carburanti) e dalle spese delle quote (ammortamento, manutenzione e assicurazione), seguono le spese per servizi extraziendali (prestazioni professionali, noleggi, imposte e carburanti) che ammontano a 33.747 e le spese per i compensi (affitto, salari e interessi) che ammontano a 142.500 euro.

Nell'azienda le spese vive per lo smaltimento dei rifiuti e dei reflui prodotti ammontano a 1.800 euro all'anno. In particolare la loro incidenza è la seguente:

- 0,25% sulla Produzione Lorda Vendibile;
- 0,71% sulle spese per il capitale circolante;
- 0,34% sui costi totali;
- 0,98% sul reddito netto.

In generale si può affermare che le spese di smaltimento dei reflui e dei rifiuti cui un'azienda agricola deve far fronte variano a seconda delle dimensioni dell'azienda, maggiori sono le dimensioni di un'azienda maggiori sono le quantità di rifiuti e di reflui prodotti e quindi maggiori saranno le spese per smaltirli.

Altro parametro che incide sulla variabilità delle spese è il Comune di appartenenza, ogni Comune offre convenzioni, agevolazioni diverse più o meno vantaggiose. Importante è anche la presenza di terreni di proprietà, che permette di non dover andare incontro a delle spese di affitto per spandere i liquami che vengono prodotti in azienda, e il possesso dei mezzi e delle attrezzature atti a mettere in atto lo spandimento in campo del letame e dei liquami, senza dover incorrere ad ulteriori spese per l'affitto dei mezzi e al lavoro dei controterzisti.

La nostra azienda ha dimostrato di sapere contenere i costi di smaltimento e di sapersi adeguare alle normative che sono state introdotte. Per quanto riguarda l'incidenza sul bilancio di quelle che sono le spese per lo smaltimento dei rifiuti e dei reflui prodotti in azienda è emerso che tali costi incidono in bassissima percentuale sul bilancio complessivo e pertanto non rappresentano la preoccupazione principale per l'imprenditore agricolo, quanto la certezza delle norme.

**Tabella 2:** Bilancio economico dell'azienda

Descrizione	Importo (€)	
	parziale	totale
<b>Produzione Lorda Vendibile (PLV)</b>		<b>715800</b>
vegetale	0	
animale	715.800	
altro	0	
<b>Spese di reintegrazione</b>		<b>355.138</b>
<i><b>Spese per il capitale circolante</b></i>		<i><b>252.200</b></i>
sementi	21.000	
concimi	22.500	
presidi sanitari	22.700	
alimenti e lettimi	128.000	
carburanti e lubrificanti	27.000	
spese per smaltimento rifiuti e reflui	1.800	
spese varie	29.200	
<i><b>Quote</b></i>		<i><b>102.938</b></i>
ammortamenti	80.000	
manutenzioni	22.000	
assicurazioni	938	
Spese per servizi extraziendali		<b>33.747</b>
prestazioni professionali	4.247	
noleggi	24.000	
imposte e contributi	5.500	
<b>Compensi</b>		<b>142.500</b>
affitto	28.500	
salari	102.000	
interessi	12.000	
<b>Reddito Netto (RN)</b>		<b>184.415</b>

Fonte: Nostre elaborazioni su dati aziendali

#### 5.4 Gli aspetti economici ed organizzativi dello smaltimento

Dalle indagini svolte nelle diverse aziende ubicate nel territorio della provincia di Mantova è emerso che le spese che le aziende devono sostenere per i servizi di raccolta, trasporto e smaltimento dei rifiuti variano notevolmente a seconda dell'indirizzo produttivo dell'azienda e delle convenzioni stipulate con organismi esterni. Comunque i costi risultano direttamente proporzionali alla dimensione dell'azienda e della quantità di rifiuti prodotta, con agevolazioni nei confronti delle realtà aziendali più piccole, che presentano un minor fatturato annuale.

Per quanto riguarda l'efficienza dei servizi destinati al ritiro, raccolta e trasporto dei rifiuti prodotti in azienda è emerso che sono continui i ritardi, le mancate presenze, tutte circostanze che ne rendono ancor più difficile la gestione, date le grandi quantità di rifiuti che in queste realtà vengono prodotte.

Inoltre la gestione dei reflui e dei rifiuti prodotti in azienda risulta essere sottoposta a continue modifiche legislative che nella maggior parte dei casi non vengono comunicate tempestivamente agli imprenditori agricoli, che rischiano quindi di andare incontro a sanzioni. Ciò che gli imprenditori agricoli richiedono in merito è una migliore informazione in termini di aggiornamento dei cambiamenti, miglior efficienza dei servizi pubblici o privati incaricati della gestione dei rifiuti.

In prospettiva gli imprenditori, per adempiere agli obblighi di smaltimento dei reflui e dei rifiuti prodotti in azienda, dovranno mettere in atto forme innovative che consentano di gestire con le Organizzazioni professionali agricole e con gli Enti pubblici la gestione amministrativa delle pratiche burocratiche, sempre più complessa.

## 6. CONCLUSIONI

L'intensificazione delle produzioni agricole e l'industrializzazione dell'agricoltura hanno portato ad un aumento della produzione aziendale dei rifiuti e dei reflui rendendo necessario un maggiore controllo e una corretta gestione dello smaltimento. Molto spesso infatti le superfici aziendali non sono in grado di sostenere il carico di effluenti organici degli allevamenti: mentre la superficie aziendale si mantiene costante le mandrie aumentano di dimensione, grazie agli alimenti acquistati sul mercato, rompendo così l'equilibrio naturale di un tempo tra sostanze prelevate e sostanze reimpiagate. Inoltre con lo sviluppo tecnologico i rifiuti prodotti interessano anche materiali non organici, che non possono rientrare nel ciclo biologico dei terreni e quindi devono essere smaltiti a parte.

Questo cambiamento presuppone un'oculata gestione dei rifiuti, che se non correttamente effettuata, può compromettere la qualità dell'ambiente con ripercussioni negative all'aria, al suolo e all'acqua.

La gestione dello smaltimento dei reflui e dei rifiuti nelle aziende agricole rappresenta oggi un nuovo onere per l'imprenditore agricolo che è chiamato a rispettare le norme legislative della Politica Agricola Comunitaria e nazionali sullo smaltimento dei rifiuti e sulla salvaguardia dell'ambiente dall'inquinamento di sostanze pericolose.

Per prendere coscienza delle problematiche dello smaltimento dei rifiuti abbiamo svolto delle indagini in un'azienda situata in provincia di Mantova, valutando poi gli aspetti economici ed organizzativi e l'onere sul bilancio economico. Dall'analisi è emerso che le spese cui un'azienda deve andare incontro per i servizi raccolta, trasporto e smaltimento dei rifiuti variano notevolmente a seconda dell'indirizzo produttivo dell'azienda e delle convenzioni stipulate con organismi esterni. L'entità dei costi è strettamente legata alle dimensioni dell'azienda e alla quantità di rifiuti prodotta. La corretta gestione dei reflui è nell'interesse dello stesso imprenditore agricolo, per un migliore valorizzazione della funzione fertilizzante nella salvaguar-

dia dell'ambiente. Per quanto riguarda i rifiuti, l'imprenditore è tenuto a rispettare le normative vigenti per la salvaguardia della sua salute e di quella della collettività, tenuto conto che il relativo onere per lo smaltimento non incide in modo significativo sul bilancio, soprattutto se la gestione dello smaltimento è condotta in forma associata con altri imprenditori agricoli.

Preoccupa invece all'imprenditore la continua evoluzione delle norme legislative sullo smaltimento dei rifiuti e dei reflui, che nella maggior parte dei casi non vengono comunicate agli interessati, con il conseguente rischio di andare incontro all'inosservanza delle norme e a sanzioni.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Caiati G. (2006). Il ruolo dell'agricoltura nel quadro dello sviluppo sostenibile. In *Rivista di Economia Agraria*, n. 1, 59-86.
- 2) Deliberazione Giunta Regionale 21 novembre 2007, n. 8/5868 del Bollettino Ufficiale Regione Lombardia, 6 dicembre 2007, 2° supplemento straordinario.
- 3) Gazzetta Ufficiale Italiana n. 88 (2006), Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n.152 in Supplemento Ordinario n. 96 alla Gazzetta Ufficiale Italiana del 14 aprile 2006.
- 4) INEA a cura di Zezza A (2008). Bioenergie: quali opportunità per l'agricoltura italiana. Edizioni Scientifiche Italiane.
- 5) ISTAT (2004). V° Censimento Generale dell'Agricoltura, 2000, ISTAT, Roma.
- 6) Nasuelli P., Montermini A. (2006). Procedure per gestire i rifiuti agricoli. In *L'informatore agrario* n. 33, pag. 74-76.
- 7) Raffaelli R, Gios G., Notaro S., Molfetta P. (2005). Riforma della PAC e multifunzionalità del sistema zootecnico alpino. In *Rivista di Economia Agraria*, n. 2, 311-362.
- 8) Regione Lombardia (2000). Distribuzione Reflui Zootecnici.
- 9) Rocchi B. (2005). Disaccoppiamento e PAC, 2005, *Rivista di Agraria* n. 4.



# **SOSTENIBILITA' ECONOMICA ED AMBIENTALE DELLE ATTIVITA' CONNESSE: LA COGENERAZIONE DA BIOGAS<sup>1</sup>**

## **ECONOMIC AND ENVIRONMENTAL SUSTAINABILITY OF CONNECTED ACTIVITIES: COGENERATION FROM BIOGAS**

Salghetti A., Ferri G.,<sup>2</sup> Dolci E.<sup>3</sup>

### **PAROLE CHIAVE:**

attività connesse, biogas, economia, ambiente, agrienergia

### **KEY WORDS:**

connected activities, biogas, economy, environment, agri-energy

### **RIASSUNTO**

La produzione di agrienergie, nell'ambito delle attività connesse, è una tematica di grande attualità ed è degna di particolare attenzione da parte del mondo politico ed imprenditoriale.

Affiancando nuove attività all'indirizzo produttivo tradizionale della propria azienda, l'agricoltore può garantire, in primis, un maggiore reddito per l'impresa, seguito da una serie di servizi che vanno a beneficio dell'intera collettività, dando all'agricoltura anche la veste di tutore dell'ambiente.

Le agrienergie rientrano tra le attività connesse caratterizzanti l'agricoltura multifunzionale, pertanto l'obiettivo della nostra indagine è stato quello di valutare, da un punto di vista economico ed organizzativo, il beneficio che l'azienda può ottenere da un impianto per la cogenerazione da biogas a partire dai reflui di un allevamento di bovini da latte.

L'analisi svolta tiene conto della presenza o meno di aiuti pubblici per la realizzazione dell'opera. Dall'analisi dei bilanci effettuati è possibile esprimere una valutazione oggettiva di convenienza nella realizzazione dell'impianto. La sua implementazione a livello aziendale può offrire interessanti opportunità per la differenziazione delle fonti di reddito per l'allevatore, con ricadute positive anche a livello ambientale e per la collettività.

---

1 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 Andrea Salghetti ha redatto i paragrafi 7 e 9; Giovanni Ferri i paragrafi 1, 2 e 3; mentre Elena Dolci ha redatto i paragrafi 4, 5, 6 e 8.

2 Sezione di Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

3 Laureata in Tecnologie delle Produzioni Animali e Sicurezza degli Alimenti.

## ABSTRACT

The production of agri-energy, in the context of connected activities, is a topic of great current importance to which the world of politics and business should dedicate special attention.

Adding new activities alongside the traditional production of their own businesses, farmers can guarantee, first and foremost, a higher income for the company, followed by a series of services that provide benefits for the entire community, so that the farmer is also invested with the role of defender of the environment.

Agri-energy is one of the connected activities that typifies the multifunctional farmer, so the aim of our investigation was to assess, from the economic and organisational standpoint, the benefits that the farm business can reap from a plant for the cogeneration of energy from biogas produced from the effluent of a dairy cattle farm.

The analysis considers the presence or otherwise of public aid for the realisation of the works. From an analysis of the balances, it is possible to make an objective assessment of the advantages to be gained from the construction of such a plant. Its implementation at corporate level can offer interesting opportunities for differentiating the farmer's sources of revenue, while also generating positive repercussions on the environment and on the community at large.

## 1. INTRODUZIONE

In questo periodo l'economia italiana, in analogia con quella mondiale, sta attraversando una fase di particolare difficoltà, che coinvolge tutti i settori produttivi. Anche l'agricoltura è soggetta alla fortissima concorrenza estera, che rende incerte le prospettive future.

I costi di produzione, infatti, negli ultimi anni hanno subito forti rialzi a fronte di prezzi alla produzione sempre meno remunerativi. Molte aziende, soprattutto quelle a conduzione tradizionale e familiare, sono state costrette a chiudere, mentre parte di quelle rimaste cercano di ampliarsi nel tentativo di abbattere i costi fissi ed elaborare tecniche di gestione sul modello industriale per eliminare sprechi ed ottimizzare le risorse.

Sempre nell'ambito di questa nuova concezione di agricoltura, negli ultimi anni è venuta a farsi largo anche la *differenziazione del reddito*, ovvero l'implementazione, sempre a livello aziendale, di nuove attività legate alla produzione primaria ed alla vita in campagna, capaci di generare nuova ed aggiuntiva fonte di reddito per l'agricoltore-imprenditore. Chiari esempi sono forniti dal fiorire dei numerosi agriturismi sparsi per il Paese, la trasformazione e la vendita diretta dei prodotti all'interno dell'azienda, l'elaborazione di prodotti differenti rispetto al primario indirizzo produttivo e, in ultimo, la produzione di bioenergie.

Pertanto, l'agricoltura ha esteso le sue competenze dalla produzione di beni alimentari alla prestazione di servizi alle persone, alla collettività ed al territorio. E' nata così la cosiddetta *agricoltura multifunzionale*, che l'azienda oggetto della presente ricerca ha voluto seguire nel campo energetico.

## 2. LA MULTIFUNZIONALITÀ

La multifunzionalità dell'agricoltura rappresenta una delle chiavi strategiche di valorizzazione e sviluppo del settore. Secondo l'Unione europea, il termine multifunzionalità illustra *“il nesso fondamentale tra agricoltura sostenibile, sicurezza alimentare, equilibrio territoriale, conservazione del paesaggio e dell'ambiente, nonché garanzia dell'approvvigionamento alimentare”*(3).

Il ruolo multifunzionale dell'agricoltura in Italia ha trovato riscontro nell'emanazione del Decreto Legislativo n°228 del 18 maggio 2001 che, in attuazione della cosiddetta “Legge di Orientamento”, dà una nuova configurazione giuridica e funzionale all'impresa agraria e definisce, per la prima volta sul piano normativo, il *distretto rurale* e il *distretto agroalimentare*: in sostanza, amplia lo spettro delle attività che possono definirsi *agricole* (14).

Nel recepire il concetto di agricoltura multifunzionale, la “Legge di Orientamento” delinea dunque un'impresa agraria che, pur restando ancorata al settore agricolo, può realizzare attività che sconfinano nei settori industriale e/o terziario. L'impresa che gestisce un'azienda agraria multifunzionale può quindi cessare di essere “mono-settoriale” e diventare “multi-settoriale”. Basandosi su di un simile quadro normativo, la *multifunzionalità* viene quindi oggi vista dal settore agricolo come un'opportunità economica per le aziende. Infatti cerca di tradurre queste nuove funzioni attribuite all'imprenditore agrario in forme di remunerazione capaci di consentire la sostenibilità economica del settore.

La società attuale si aspetta che l'agricoltura assicuri cibo sicuro e di alta qualità, protegga l'ambiente, salvaguardi o risparmi risorse limitate, conservi il paesaggio rurale e contribuisca allo sviluppo socio economico delle aree rurali e, all'interno di tale visione, la multifunzionalità si configura come lo strumento di cui l'agricoltore si può servire per il raggiungimento di virtuosi obiettivi (5, 6, 7, 8, 13).

E' infine necessario sottolineare che lo sviluppo della multifunzionalità non implica l'abbandono dell'agricoltura “produttiva” ma, al contrario, richiede la ricerca di una soluzione di compromesso efficiente tra gli obiettivi strettamente produttivi e quelli sociali ed ambientali (11).

## 3. LE ATTIVITÀ CONNESSE

Da un punto di vista normativo, il D. Lgs. n. 228/01 sancisce, nel nostro Paese, la nascita della multifunzionalità dell'impresa agricola e definisce i campi di intervento delle attività connesse. E' un passaggio estremamente importante perché alla funzione storica dell'agricoltura, che è quella di produrre beni alimentari, viene riconosciuta la possibilità di svolgere altre funzioni sia in termini di diversificazione produttiva che di fornitura di servizi. Si affaccia così all'orizzonte una nuova figura di *imprenditore* non più inserito solo in un contesto economico e sociale, ma anche in un contesto territoriale, con compiti di presidio, tutela e valorizzazione delle risorse ambientali e culturali. Molte sono le possibilità concrete che l'azienda agricola può sviluppare per integrare il suo reddito, alcune ormai consolidate, come l'agriturismo, ed altre da sviluppare come la manutenzione del territorio o l'artigianato rurale, per

arrivare sino alle nuove frontiere della multifunzionalità rappresentate dalla didattica rurale e dalla produzione di energia.

In particolare, le energie rinnovabili sono una interessante opportunità di reddito per l'azienda agricola. Infatti attraverso colture specifiche, biomasse agroforestali, residui derivanti dalle attività zootecniche, pannelli solari (fotovoltaici) ed eolici è possibile produrre energia elettrica, calore o biocombustibili. Quella che si può intravedere a partire da codesto piano normativo è, perciò, un'*azienda agrienergetica*, cioè produttrice di fonti energetiche da destinare sia alla sua autosufficienza che al mercato (12).

Dal punto di vista fiscale, è poi importante sottolineare che le attività connesse, espletate all'interno dell'azienda agricola dal medesimo imprenditore, rientrano nella tassazione catastale del reddito agrario e non nel reddito d'impresa sulla base del bilancio.

Secondo una indagine ISTAT relativa all'annata 2005, le aziende agricole con attività connesse, intese come quelle attività diverse da quelle tradizionali di coltivazione e di allevamento, sono 105.394, in aumento del 17,7% rispetto al 2003. Esse sono distribuite per il 40,8% nel Mezzogiorno, per il 37,5% nel Nord e per il 21,7% nel Centro. Le attività connesse all'agricoltura rilevate nell'indagine sono di varia natura: l'agriturismo, le attività di artigianato, la lavorazione dei prodotti agricoli vegetali, la lavorazione di prodotti agricoli animali, la lavorazione del legno, la produzione di energia rinnovabile, l'acquacoltura, i lavori per conto terzi effettuati utilizzando le attrezzature dell'azienda, le attività ricreative, la produzione di mangimi completi e complementari e altre attività.

Le attività connesse più rappresentative risultano tuttavia essere la trasformazione di prodotti vegetali (73.869 aziende), la trasformazione di prodotti animali (17.646 aziende) e l'agriturismo (12.705 aziende).

Nel complesso le aziende con attività connesse rappresentano solo il 6,1% delle aziende totali e risultano per lo più aziende di media e piccola o piccolissima dimensione. In particolare, le aziende con solo una attività connessa sono quelle di piccola o piccolissima dimensione, le aziende con due attività connesse sono quelle di media dimensione, mentre quelle aventi tre o più attività connesse sono le aziende di grandi dimensioni; da ciò risulta che all'aumentare della multifunzionalità corrisponde una maggiore dimensione aziendale (9).

#### 4. LA COGENERAZIONE DA BIOGAS

La *digestione anaerobica* a partire dai reflui zootecnici è un processo biologico complesso per mezzo del quale, in assenza di ossigeno, la sostanza organica viene trasformata in *biogas* (o *gas biologico*), una miscela gassosa costituita principalmente da metano (dal 50 all'80%) e anidride carbonica. Affinché il processo abbia luogo è necessaria l'azione di diversi gruppi di microrganismi anaerobi capaci di trasformare la sostanza organica in composti intermedi, principalmente in acido acetico, anidride carbonica ed idrogeno, utilizzabili in ultimo dai batteri metanigeni, i quali concludono la lavorazione producendo il metano. L'ambiente di reazione, definito solitamente *digestore* (o *reattore anaerobico*), per permettere la crescita con-

temporanea di tutti i microrganismi coinvolti, è la risultante di un compromesso tra le esigenze dei singoli gruppi microbici, quindi caratterizzato da un pH di valore uguale a 7-7,5, da una temperatura di 35°C, nel caso d'utilizzo di batteri mesofili, o di 55°C in presenza di termofili e da assoluta anaerobiosi.

Al termine del processo i prodotti ottenuti sono fondamentalmente due: una fonte energetica rinnovabile, ovvero il *biogas*, ed una sostanza organica stabilizzata, sanificata e deodorizzata, ovvero il *digestato*. Dal primo, dopo avere operato opportuni trattamenti di depurazione, è possibile ottenere, mediante combustione, energia elettrica e calore (*cogenerazione*), mentre il secondo risulta essere un ottimo prodotto per la fertirrigazione, in quanto capace di permanere in azienda in attesa di spandimento senza emissione di inquinanti od odori molesti, caratterizzato da una maggiore efficienza ammendante, giacchè gli elementi nutritivi vengono resi più prontamente utilizzabili da piante e terreno e, in ultimo, soddisfacentemente privato della carica patogena in esso eventualmente presente (1, 4).

In un contesto di estrema e continua necessità energetica e di elevato rischio ambientale il trattamento anaerobico con recupero del biogas prodotto risulta oggi un sistema di grande interesse, in grado di offrire molteplici vantaggi all'agricoltore, sia da un punto di vista economico che gestionale, anche in considerazione dei sempre più restrittivi vincoli alle emissioni di inquinanti in atmosfera ed allo spandimento dei liquami in aree vulnerabili, con il rischio di eccessi di nitrati nei terreni (2).

## 5. ANALISI SPERIMENTALE

### 5.1 Premessa

Per procedere ad una corretta analisi dei costi e degli eventuali benefici ottenuti dall'azienda in esame a partire dal recupero di biogas, risulta opportuno precisare che agli oneri economici sostenuti dall'allevatore per la realizzazione dell'impianto di cogenerazione e dei suoi annessi, sono stati aggiunti anche quelli per la realizzazione dell'intero nuovo sistema per la gestione delle deiezioni. Questo particolare approccio si è rivelato necessario data l'innegabile interdipendenza esistente tra le operazioni di raccolta, separazione e stoccaggio del refluo e la produzione di energia a partire dallo stesso, il tutto facente parte di un unico grande progetto di ristrutturazione aziendale, anche per ottemperare alle normative provinciali (2).

La rivoluzione dell'ormai obsoleto sistema di raccolta delle deiezioni prodotte in azienda, l'installazione di una stazione per la separazione dei solidi, già in sede di progetto, si sono rivelate operazioni strettamente necessarie al completo e corretto funzionamento dell'impianto per il recupero di biogas.

Nello svolgimento di un'attenta analisi economica sono poi stati considerati anche altri due importanti fattori, quali la presenza o meno di un contributo pubblico per il finanziamento dell'opera e la dimensione della mandria. Per ciò che riguarda il primo dei due punti, è doveroso precisare che l'azienda in esame, grazie al bando di concorso promosso dalla Regione Emilia Romagna nell'ambito del Piano di Sviluppo Rurale 2000-2006, avendo presentato la domanda completa di progetto e relativi importi nel 2005, ha in realtà potuto beneficiare di un finanziamento pubblico a fondo perduto pari al 40% delle spese sostenute per la realizzazione dell'intera opera. L'al-

tra variabile è invece legata alla consistenza della mandria. L'intero impianto per la cogenerazione da biogas, infatti, voluto e progettato nella prospettiva di un sensibile ampliamento ed ammodernamento aziendale, è dimensionato per il carico di deiezioni che produrrà la mandria a pieno regime. Al momento, dunque, è ragionevole affermare che esso stia sviluppando solo una parte del suo potenziale produttivo, giacché mancano ancora svariati metri cubi di deiezioni da aggiungere al digestore.

La metodologia seguita ai fini dell'indagine è basata sulla raccolta dei dati economici a partire dalle fatture e dai contratti rilevati presso l'azienda in esame relativi all'annata agraria 2008.

Nel caso di costi impliciti, ovvero quelli non originanti un vero e proprio flusso di denaro e, perciò, mancanti di specifica fattura, sono stati calcolati con riferimento ai prezzi di mercato praticati per l'acquisto o l'affitto del medesimo bene o per l'ottenimento di tale prestazione.

## 5.2 Caratteristiche dell'azienda

L'azienda oggetto della presente ricerca è ad indirizzo zootecnico, avente un allevamento intensivo di medie dimensioni di bovine deputate alla produzione di latte per la trasformazione in formaggio Parmigiano Reggiano.

Il lavoro è fornito da due familiari, coadiuvati solamente da un salariato fisso di stalla per ciò che concerne le operazioni di mungitura. I lavoratori familiari si avvicinano sia nella gestione della mandria che nella coltivazione dei campi.

L'azienda, che sorge sulla pedecollina parmense, a partire dal 2006, è stata oggetto di un profondo rinnovamento avente la finalità, in primis, di ampliare la mandria per abbattere i costi fissi di produzione, ottimizzarne ulteriormente la gestione avvalendosi di nuove strutture e tecnologie ed, infine, per ottemperare a tutte le normative vigenti relative all'impatto ambientale della pratica agricola. Ed è proprio nell'ambito di questa ristrutturazione aziendale che è stato realizzato anche l'impianto per il recupero e l'utilizzo di biogas a partire dai reflui bovini.

La composizione della mandria, costituita da bovine di razza Frisona ad elevata produttività lattifera, è illustrata nel dettaglio in Tabella 2, anche se risulta opportuno ricordare che essi sono soggetti ad una costante evoluzione, poiché la *mission* aziendale è quella di incrementare il proprio patrimonio animale di circa 150 soggetti nei prossimi anni.

Ad ogni modo, nonostante i dati riportati nelle Tabelle 2 e 3, nel prosieguo dell'analisi economica oggetto di questa ricerca si farà sempre riferimento alla corrispondenza di 300 capi, per ciò che concerne la situazione numerica attuale e a 450 nel caso in cui si faccia menzione al carico massimo dell'allevamento, che rappresenta l'obiettivo prossimo dell'azienda. La precisazione risulta necessaria poiché, come si potrà notare nelle pagine seguenti, non tutte le deiezioni prodotte dagli animali presenti in allevamento vengono inviate alla digestione anaerobica, pertanto, ai fini di una analisi, si sono conteggiati i valori di 300 e 450 capi poiché rappresentativi dei soggetti che effettivamente producono deiezioni utili al funzionamento dell'impianto per la cogenerazione da biogas.

Il raggiungimento dell'ambizioso obiettivo di incremento della mandria deciso dai titolari sta richiedendo tempi relativamente lunghi a causa della scelta di non

acquistare capi al di fuori dell'azienda, ma di pervenire al numero di soggetti desiderato sfruttando solo ed esclusivamente la rimonta interna.

La stabulazione degli animali, prima libera e svolta su lettiera permanente, ora avviene su cuccette singole con la medesima base di paglia. Ciò, oltre ai benefici economici legati alla riduzione degli sprechi di foraggio e di manodopera per la pulizia della lettiera, consente ai titolari di operare ora una assai differente, nonché migliore, gestione delle deiezioni dei capi in produzione.

Le manze in rimonta vengono allevate in una struttura a parte: la stabulazione è sempre libera con cuccette singole con l'uso di paglia, mentre la pavimentazione è qui costituita da grigliato (con sottostante vasca di raccolta per le deiezioni) e gli animali dispongono di paddocks esterni per la deambulazione.

**Tabella 1:** Ripartizione della superficie aziendale e suo utilizzo

<b>ORDINAMENTO COLTURALE</b>	<b>SUPERFICIE (ha)</b>
Frumento	18
Loietto	10
Prato stabile	10
Erba medica	42
TOTALE	80
SUPERFICIE DESTINATA ALLO SPANDIMENTO DEI LIQUAMI	80

**Tabella 2:** Composizione attuale della mandria

<b>DISTRIBUZIONE DELLA MANDRIA</b>	<b>CAPI (n)</b>
Vacche	164
Manze	40
Manzette	65
Vitelle	75
TOTALE	344

**Tabella 3:** Composizione della mandria a regime

<b>DISTRIBUZIONE DELLA MANDRIA</b>	<b>CAPI (n)</b>
Vacche	260
Manze	60
Manzette	60
Vitelle	80
TOTALE	460

### 5.3 L'impianto di cogenerazione

Sempre nell'ambito della ristrutturazione aziendale, essendo cambiate quantità e tipologia delle deiezioni prodotte dalla mandria a causa della mutata tecnica di stabulazione, visti i nuovi obblighi imposti dalle recenti normative locali riguardanti stoccaggio e spandimento dei reflui zootecnici, nonché gli incentivi regionali offerti per la realizzazione di impianti per la cogenerazione da biogas, i titolari dell'impresa hanno deciso di rivoluzionare l'intero sistema per la raccolta e la gestione degli effluenti del loro allevamento (2).

Nella nuova stalla organizzata in cuccette l'accumulo delle deiezioni, ora in assai minima parte frammiste a paglia, avviene solo all'interno della corsia riservata alla deambulazione degli animali. La pulizia della corsia è perciò affidata allo scorrimento di appositi raschiatori che, impostati dall'allevatore, si attivano tra le tre e le quattro volte nell'arco della giornata. Partendo da un capo della struttura, con moto lento e lineare, accumulano e conducono gli effluenti sino all'opposta estremità, ove vengono riversati, mediante canali di raccolta, in una prima vasca interrata contenente le deiezioni provenienti da ogni corsia.

A tutto questo materiale si aggiungono le deiezioni prodotte dalle manze in rimonta allevate nella stalla con pavimento grigliato e paddocks esterni. I rifiuti prodotti all'interno del ricovero, per caduta, dal grigliato passano alle sottostanti corsie di raccolta, le quali confluiscono in un'unica vasca interrata posta al di fuori della struttura.

Il contenuto delle due vasche di raccolta, per mezzo di tubazioni e canali interrati, viene indirizzato alla stazione di separazione, ove la parte palabile delle deiezioni, ovvero il letame, viene allontanata dalla parte non palabile, rappresentata invece dal liquame. Il letame viene in tal modo agevolmente accumulato e stoccato sull'apposita platea impermeabilizzata e dotata di scanalature perimetrali deputate alla raccolta degli eventuali liquidi percolati. Sulla piattaforma affronta anche il processo di maturazione che lo conduce verso la sanificazione da eventuali patogeni presenti al suo interno ed allo sviluppo di tutte le proprie capacità ammendanti, in vista del successivo utilizzo come concime per frutteti per un'azienda ortofrutticola sita in provincia di Bologna, alla quale viene al momento ceduto in forma gratuita e senza oneri per il trasporto.

Il liquame, invece, viene veicolato all'interno di una terza vasca di raccolta interrata posta all'esterno della stalla ove alloggiavano le vacche in produzione. A partire da essa, dopo essere stato nuovamente miscelato e addizionato delle acque di lavaggio della sala di mungitura, viene infine avviato al digestore a polmone, entro le cui pareti, opportunamente coibentate ed a tenuta ermetica, avviene il processo di digestione anaerobica dei liquami in condizioni di mesofilia.

In assenza di ossigeno ed ad una temperatura di circa 37°C, infatti, la flora batterica normalmente presente nei liquami zootecnici opera la fermentazione anaerobica del medesimo substrato, producendo biogas. Quest'ultimo, salendo dalla massa in digestione ed andandosi a localizzare proprio al di sotto della cupola, viene agevolmente recuperato ed inviato alla vicina stazione di cogenerazione, ove avvengono le operazioni di depurazione e combustione.

Il biogas, una volta privato delle impurità che contiene, proprio come comune gas metano, viene avviato al gruppo di cogenerazione, costituito da un cogeneratore B60 da 60KW/h con motore da 7000 cm<sup>3</sup>, in tutto e per tutto simile a quelli per autotrazione. Esso, funzionando proprio come un normale generatore, produce nel contempo energia elettrica e calore, rispettivamente risultanti dal movimento e dalla combustione necessaria ad ottenerlo. L'elettricità, a seconda delle esigenze e delle impostazioni fornite dai titolari all'impianto, può essere reimpiegata in azienda o venduta al Gestore del Sistema Elettrico (GSE), mentre il calore ottenuto viene in parte utilizzato per garantire, mediante serpentine poste al di sotto della base del



digestore, le condizioni di mesofilia nel digestore.

I liquami esausti, ovvero il cosiddetto *digestato*, al termine del processo di fermentazione, dal digestore vengono trasferiti all'interno del vicino bacino cilindrico per lo stoccaggio dei liquami. Da esso, nella piena ottemperanza dei vincoli locali per lo spandimento degli effluenti zootecnici, mediante un sistema di condutture fisse sotterranee e con l'ausilio del trattore aziendale come fonte di energia per le pompe, vengono diretti ai getti posizionati sui terreni aziendali per la fertirrigazione.

## 6. INDAGINE ECONOMICA

Nello svolgimento dell'analisi economica sono, in primo luogo, state considerate tutte le spese a cui gli allevatori hanno dovuto fare fronte per la realizzazione dell'opera, seguite dall'individuazione degli oneri da sostenersi annualmente per la gestione dell'intero impianto. Per ciò che riguarda le entrate, oltre ai potenziali ricavi da esso ottenibili, sono stati conteggiati anche i risparmi legati al nuovo sistema di raccolta e gestione delle deiezioni, i cosiddetti minori costi.

Per ciò che riguarda i Costi Fissi, ovvero gli investimenti sostenuti dagli imprenditori al momento della realizzazione dell'intero impianto e riportati in Tabella 4, sono passibili di variazioni in presenza o meno del contributo pubblico, in quanto tale aiuto economico consente un drastico calo degli importi relativi alle opere murarie, alle attrezzature ed impianti.

**Tabella 4:** Gli investimenti

DESCRIZIONE	IMPORTO TOTALE (€)	QUOTA ANNUA DI AMMORTAMENTO (€)
Opere murarie	180.600	12.040
Prestazioni professionali	35.056	1.753
Attrezzature ed impianti	316.200	15.810
Interessi di pre-ammortamento	10.637	532
Impiego di macchine ed attrezzature aziendali	4.000	216
Impiego di lavoro familiare	4.320	200
<b>TOTALE</b>	<b>550.813</b>	<b>30.551</b>

*Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali*

I Costi di Gestione, invece, riepilogati in Tabella 5, subiscono cambiamenti dell'importo sia in base alla partecipazione o meno del contributo, in quanto mutano l'ammontare della rata e degli interessi da restituire annualmente alla banca, sia in base al lavoro svolto dal cogeneratore, dal momento che, ad un maggiore utilizzo del motore corrisponde un'augmentata manutenzione, associata alla necessità di contattare più frequentemente consulenti esterni.

**Tabella 5:** La gestione

COSTI ESPLICITI	IMPORTO (€)
Interventi di manutenzione e materiali di consumo	5.952
Imposte e tasse	216
Interessi sui mutui	12.989
Consulenze e prestazioni professionali	2.000
COSTI IMPLICITI	IMPORTO (€)
Impiego del terreno	200
Impiego di macchine ed attrezzature aziendali	3.000
Lavoro familiare e/o di salariati	4.320
Fondo rischi	8.942
<b>TOTALE</b>	<b>37.619</b>

*Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali*

I Minori Costi, derivanti dal risparmio di cui l'azienda viene a beneficiare grazie al nuovo sistema di gestione del refluo zootecnico e mostrati in Tabella 6, rimangono vantaggiosi per l'azienda in tutte le ipotesi di bilancio, soggiacendo solo a lievi variazioni in caso di aumento della mandria, giacchè un maggiore quantitativo di deiezioni impone all'azienda il ritorno all'affitto di concessioni per lo spandimento dei liquami ed annesse spese per il loro trasporto e distribuzione in campo.

**Tabella 6:** I minori costi

DESCRIZIONE	IMPORTO (€)
Concessioni per lo spandimento dei liquami	13.000
Trasporto e spandimento	3.800
Cessione letame	4.000
<b>TOTALE</b>	<b>20.800</b>

*Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali*

I Ricavi, infine, come del resto presumibile ed auspicabile, subiscono forti incrementi all'aumentare della produzione di energia conseguente alla crescita della mandria. In Tabella 7 sono riepilogati i ricavi relativi all'attività dell'impianto di cogenerazione nell'annata 2008.

**Tabella 7:** I ricavi

DESCRIZIONE	IMPORTO (€)
Vendita di energia elettrica ad Enel	8.477
Energia elettrica reimpiegata in azienda	8.208
Certificati Verdi	20.000
<b>TOTALE</b>	<b>36.685</b>

*Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali*

Tenuto conto di quest'analisi preliminare, il bilancio dell'investimento svolto si articola in quattro fasi distinte, rispettivamente riportate nelle Tabelle 8, 9, 10 e 11:

1° Ipotesi: realizzazione dell'opera in condizioni di libero mercato e sua redditività alla stato attuale della mandria (300 capi);

2° Ipotesi: realizzazione dell'opera con intervento pubblico di finanziamento e sua redditività allo stato attuale della mandria (300 capi);

3° Ipotesi: realizzazione dell'opera in condizioni di libero mercato e sua redditività a pieno regime (450 capi);

4° Ipotesi: realizzazione dell'opera con intervento pubblico di finanziamento e sua redditività a pieno regime (450 capi).

**Tabella 8:** 1° Ipotesi di bilancio: in libero mercato e con l'attuale mandria (300 capi)

ENTRATE			USCITE		
	DETTAGLIO (€)	QUOTA ANNUA (€)		DETTAGLIO (€)	QUOTA ANNUA (€)
<b>MINORI COSTI</b>		<b>20.800</b>	<b>COSTI FISSI</b>		<b>30.551</b>
Concessioni per lo spandimento dei liquami	13.000		Opere murarie	12.040	
Trasporto e spandimento	3.800		Prestazioni professionali	1.753	
Cessione letame	4.000		Attrezzature ed impianti	15.810	
<b>RICAVI</b>	<b>36.685</b>		Interessi di pre- ammortamento	532	
Vendita energia elettrica	8.477		Impiego di macchine ed attrezzature aziendali	200	
Energia elettrica reimpiegata in azienda	8.208		Impiego di lavoro famigliare	216	
Certificati Verdi	20.000		<b>COSTI DI GESTIONE</b>		<b>37.619</b>
TOTALE ENTRATE		57.485	ESPLICITI	21.157	
<b>PERDITA D'ESERCIZIO</b>		<b>10.685</b>	IMPLICITI	16.462	
<b>TOTALE</b>		<b>68.170</b>	<b>TOTALE</b>		<b>68.170</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

**Tabella 9:** 2° Ipotesi di bilancio: con il contributo pubblico e con l'attuale mandria (300 capi)

ENTRATE			USCITE		
	DETTAGLIO (€)	QUOTA ANNUA (€)		DETTAGLIO (€)	QUOTA ANNUA (€)
<b>MINORI COSTI</b>		<b>20.800</b>	<b>COSTI FISSI</b>		<b>20.801</b>
Concessioni per lo spandimento dei liquami	13.000		Opere murarie	12.040	
Trasporto e spandimento	3.800		Prestazioni professionali	1.753	
Cessione letame	4.000		Attrezzature ed impianti	6.060	
<b>RICAVI</b>			<b>36.685</b>	Interessi di pre- ammortamento	
Vendita energia elettrica	8.477		Impiego di macchine ed attrezzature aziendali	200	
Energia elettrica reimpiegata in azienda	8.208		Impiego di lavoro famigliare	216	
Certificati Verdi	20.000		<b>COSTI DI GESTIONE</b>		
			Espliciti	16.558	
			Impliciti	16.462	
			<b>TOTALE USCITE</b>		<b>53.821</b>
			<b>UTILE D'ESERCIZIO</b>		<b>3.664</b>
<b>TOTALE</b>		<b>57.485</b>	<b>TOTALE</b>		<b>57.485</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

**Tabella 10:** 3° ipotesi di bilancio: in libero mercato e con mandria a pieno regime (450 capi)

ENTRATE			USCITE		
	DETTAGLIO (€)	QUOTA ANNUA (€)		DETTAGLIO (€)	QUOTA ANNUA (€)
<b>MINORI COSTI</b>		<b>16.000</b>	<b>COSTI FISSI</b>		<b>30.551</b>
Concessioni per lo spandimento dei liquami	8.000		Opere murarie	12.040	
Trasporto e spandimento	2.000		Prestazioni professionali	1.753	
Cessione letame	6.000		Attrezzature ed impianti	15.810	
<b>RICAVI</b>			<b>84.326</b>	Interessi di pre- ammortamento	
Vendita energia elettrica	31.366		Impiego di macchine ed attrezzature aziendali	200	
Energia elettrica reimpiegata in azienda	12.960		Impiego di lavoro famigliare	216	
Certificati Verdi	40.000		<b>COSTI DI GESTIONE</b>		
			Espliciti	29.017	
			Impliciti	21.622	
			<b>TOTALE USCITE</b>		<b>81.190</b>
			<b>UTILE D'ESERCIZIO</b>		<b>19.136</b>
<b>TOTALE</b>		<b>100.326</b>	<b>TOTALE</b>		<b>100.326</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

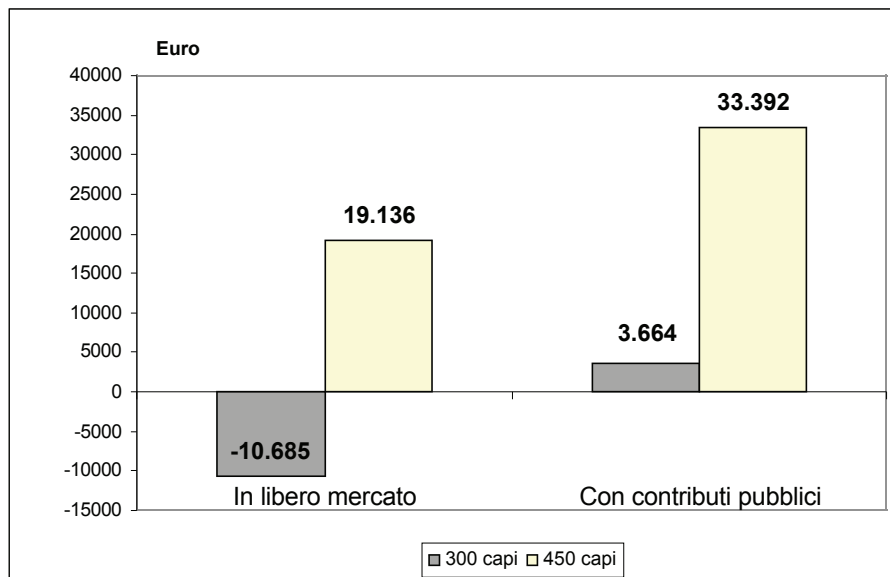
**Tabella 11:** 4° Ipotesi di bilancio: con il contributo pubblico e con mandria a pieno regime (450 capi)

ENTRATE			USCITE		
	DETTAGLIO (€)	QUOTA ANNUA (€)		DETTAGLIO (€)	QUOTA ANNUA (€)
<b>MINORI COSTI</b>		<b>16.000</b>	<b>COSTI FISSI</b>		<b>20.801</b>
Concessioni per lo spandimento dei liquami	8.000		Opere murarie	12.040	
Trasporto e spandimento	2.000		Prestazioni professionali	1.753	
Cessione letame	6.000		Attrezzature ed impianti	6.060	
			Interessi di pre- ammortamento	532	
<b>RICAVI</b>		<b>84.326</b>	Impiego di macchine ed attrezzature aziendali	200	
Vendita energia elettrica	31.366		Impiego di lavoro famigliare	216	
Energia elettrica reimpiegata in azienda	12.960				
CERTIFICATI VERDI	40.000				
			<b>COSTI DI GESTIONE</b>		<b>46.133</b>
			Espliciti	24.511	
			Impliciti	21.622	
			TOTALE USCITE		66.934
			<b>UTILE D'ESERCIZIO</b>		<b>33.392</b>
<b>TOTALE</b>		<b>100.326</b>	<b>TOTALE</b>		<b>100.326</b>

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

## 7. ALCUNE VALUTAZIONI ECONOMICHE ED AMBIENTALI

Ciò che emerge dall'intera analisi è un'indubbia redditività dell'investimento. L'unica delle quattro situazioni considerate nella ricerca capace di generare una passività, peraltro solo iniziale, è quella in cui risulta assente il contributo pubblico per la realizzazione del progetto. Si è in questo caso di fronte ad un rendimento di scala crescente, ovvero una situazione in cui ad un aumento di *inputs* consegue una crescita più che proporzionale dell'*output*. In altri termini, l'ampliamento della mandria consente agli allevatori di ottenere un buon utile in quanto i costi, fatta una leggera eccezione per quanto riguarda quelli di gestione, rimangono tutto sommato invariati, mentre i ricavi crescono in maniera esponenziale a causa dell'aumentata quantità di liquame inviato alla digestione anaerobica.

**Grafico 1:** Redditività dell'impianto per la cogenerazione da biogas nelle quattro ipotesi considerate

Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

In ultima analisi è anche possibile affermare che nel beneficio che, anche in questo caso, viene fornito dall'economia di scala è possibile ritrovare le motivazioni che oggi, con sempre maggiore impellenza, spingono le aziende agricole italiane di medie dimensioni ad ingrandirsi sempre di più e quelle piccole a cessare la loro attività. Una mandria di grandi dimensioni, infatti, garantisce una migliore diluizione dei costi fissi legata all'aumento della produzione e, quindi dei ricavi che da essa derivano.

Fatte queste considerazioni preliminari, risulta logico commentare che, fatta eccezione per la prima ipotesi, tutte le altre valutazioni economiche effettuate indicano margini di redditività indubbiamente interessanti e buone prospettive per gli allevatori nel medio-lungo periodo, soprattutto in considerazione dell'evoluzione della consistenza della mandria e, quindi, dell'aumento della produzione energetica stessa.

Nonostante quest'analisi in definitiva dimostri che il progetto possa essere realizzato anche senza l'intervento pubblico, la sua assenza potrebbe precludere a molti allevatori interessati la possibilità di poter iniziare a produrre energia in cogenerazione a partire dai reflui dei propri animali, venendo meno la possibilità di ampliare il proprio reddito, come dimostrato nel caso dell'azienda in esame.

## 8. CALCOLO DEL PUNTO DI BE

Tra le analisi economiche volte ad individuare il grado di efficienza raggiunto dalla gestione aziendale trova applicazione anche il calcolo del Punto di Break Even (PBE). Il metodo trova applicazione nei settori extragricoli, dove entra a far parte degli strumenti ordinari di analisi di efficienza aziendale, indicando la quantità di prodotto che deve essere venduto per coprire i costi. In agricoltura, però, ha sino ad ora trovato ridotte applicazioni, mentre dovrebbe costituire uno strumento semplice e snello per offrire dei punti di riferimento ai produttori, in particolare nell'allevamento dei bovini da latte.

Essendo il PBE il punto in cui i ricavi eguagliano i costi per non subire perdite di gestione, la sua ricerca nell'ambito della presente indagine consente di individuare il livello minimo di ampiezza della mandria che consente agli allevatori di coprire tutti i costi legati alla realizzazione ed al funzionamento dell'intero impianto per la cogenerazione da biogas. In pratica, esso è il punto in cui i ricavi eguagliano i costi con tornaconto uguale a zero (9).

Nei Grafici 2 e 3 è illustrata la redditività nel medio-lungo periodo dell'impianto per la cogenerazione da biogas realizzato sia in condizioni di libero mercato che con contributo pubblico con relativo PBE, individuato mediante il calcolo aritmetico del punto d'intersezione tra due rette, nella fattispecie quella dei ricavi che incrocia quella dei costi totali.

A questo proposito è necessario precisare che nella realizzazione della retta dei *Ricavi*, utile al calcolo del PBE, non si è voluto tenere conto dei *Minori Costi* in quanto ritenuti particolarmente specifici della realtà aziendale esaminata e, quindi, difficilmente riproducibili in altre realtà aziendali. In questo caso, infatti, la convenienza economica sarebbe già presente per l'opera realizzata anche senza il contributo pubblico.

Da questa elaborazione si ottengono due Punti di BE, dissimili dai valori attesi in seguito alla lettura dei bilanci sopra riportati. Le due rette sono state ottenute mediante le formule:

$$\text{RICAVI TOTALI : } y_1 = m_1 \cdot x_1 + a_1$$

$$\text{COSTI TOTALI : } y_2 = m_2 \cdot x_2 + a_2$$

Ponendo "x" come l'intervallo entro cui si estende la retta lungo l'asse della ascisse, "a" quale punto di partenza della retta e "y" quale punto di arrivo sull'asse delle ordinate, è stato possibile individuare l'incognita "m".

<u>RICAVI TOTALI:</u>	<u>COSTI TOTALI:</u>
$y1 = m1 \cdot x1 + a1$	$y2 = m2 \cdot x2 + a2$
$84.326 = m1 \cdot 150 + 36.685$	$81.190 = m2 \cdot 150 + 68.170$
$m1 = (84.326 - 36.685) / 150$	$m2 = (81.190 - 68.170) / 150$
$m1 = 317,61$	$m2 = 86,8$

I valori di m1 ed m2 individuati corrispondono ai coefficienti angolari delle due rette in esame, ovvero corrispondono rispettivamente alle tangenti degli angoli formati dalle medesime rette con l'asse delle ascisse.

Conoscendo quindi i coefficienti angolari (m) ed i punti di partenza delle rette (a), mediante la formula:

$$Xp = (A2 - A1) / (M1 - M2)$$

è stato infine possibile determinare la coordinata in ascissa del PBE che, all'interno della presente analisi, si traduce in pratica nel numero di capi necessari ad avere l'uguaglianza tra costi e ricavi con tornaconto uguale a zero.

$$Xp = (68.170 - 36.685) / (317,61 - 86,8)$$

$$Xp = 31.845 / 230,81$$

$$Xp = 136$$

Considerato infine il fatto che le rette rappresentate in Graf. 2, nonché l'intera analisi economica svolta, ha come punto di partenza una consistenza della mandria pari a 300 capi, al valore Xp ricavato occorre ora aggiungere tale numero per individuare l'esatto punto di pareggio (PBE):

$$PBE = Xp + 300$$

$$PBE = 136 + 300$$

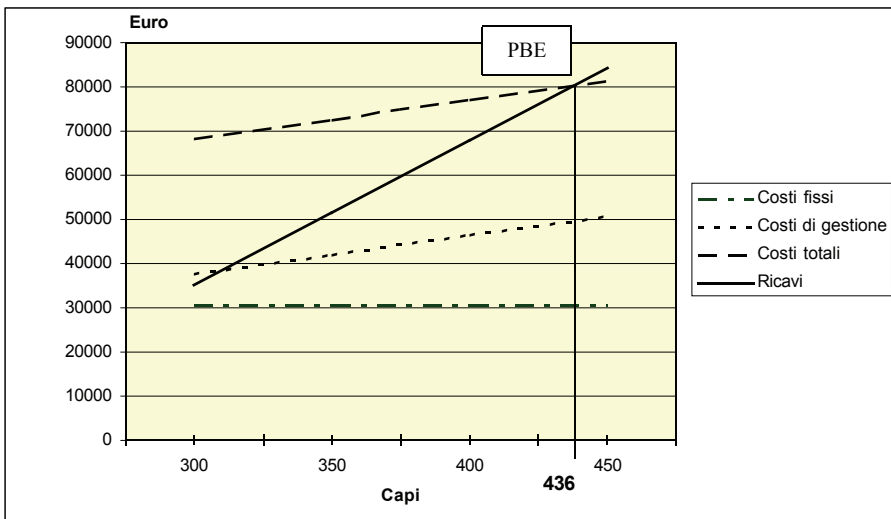
$$\mathbf{PBE = 436 \text{ capi}}$$

Analoga metodica è stata utilizzata per l'individuazione del PBE all'interno del Graf. 3, elaborato in base ai risultati relativi alla 2° e 4° ipotesi di bilancio, ovvero quelle in cui figura il contributo pubblico.



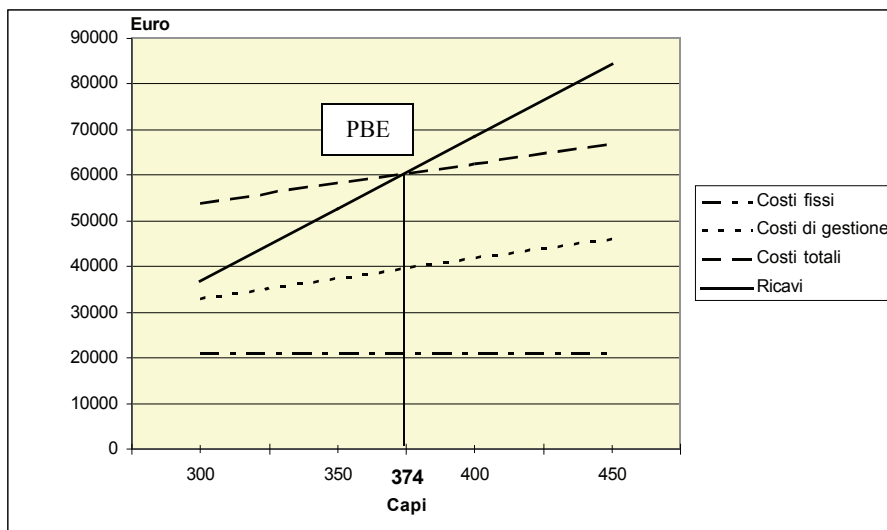
<u>RICAVI TOTALI:</u>	<u>COSTI TOTALI:</u>
$y_1 = m_1 \cdot x_1 + a_1$	$y_2 = m_2 \cdot x_2 + a_2$
$84.027 = m_1 \cdot 150 + 35.210$	$66.934 = m_2 \cdot 150 + 53.821$
$m_1 = (84.326 - 36.685) / 150$	$m_2 = (66.934 - 53.821) / 150$
$m_1 = 317,61$	$m_2 = 87,42$
$X_p = (a_2 - a_1) / (m_1 - m_2)$	
$X_p = (53.821 - 36.685) / (317,61 - 87,42)$	
$X_p = 17.136 / 230,19$	
$X_p = 74$	
$PBE = X_p + 300$	
$PBE = 74 + 300$	
<b>PBE = 374</b>	

**Grafico 2:** Redditività nel medio-lungo periodo dell'impianto per la cogenerazione da biogas realizzato in condizioni di libero mercato e relativo Punto di Break Even (PBE)



Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

**Grafico 3:** Reddittività nel medio-lungo periodo dell'impianto per la cogenerazione da biogas realizzato in con il contributo pubblico e relativo Punto di Break Even (PBE)



Fonte: nostra elaborazione su dati aziendali

Ciò che emerge dai grafici e dai calcoli che li supportano è il grande divario esistente tra i due PBE individuati. Infatti, mentre nell'ipotesi di realizzazione dell'impianto in condizioni di libero mercato (Graf. 2) il pareggio è raggiunto a quota 436 capi, in caso di intervento pubblico di finanziamento il PBE viene a localizzarsi in corrispondenza di 374 capi, cioè con un anticipo rispetto al precedente di ben 62 soggetti.

Per l'azienda agricola oggetto della presente ricerca, beneficiaria del finanziamento pubblico, tale dimostrazione risulta avere importanza assai rilevante, giacché consente di pervenire ad una situazione di pareggio incrementando la mandria attuale di circa un'ottantina di capi e di iniziare a percepire un vero e proprio tornaconto dall'impianto già a partire dai primissimi anni d'attività dell'impianto.

Per ciò che riguarda le prospettive d'utilizzo dell'energia prodotta da cogenerazione nell'azienda esaminata, oltre naturalmente al reimpiego aziendale dell'elettricità, alla vendita di quest'ultima all'Enel ed al beneficio legato ai Certificati Verdi, numerose sono le modalità di sfruttamento del calore prodotto dal motore. Esso, infatti, al momento non trova un vero e proprio utilizzo all'interno di quest'allevamento e, perciò, la parte inutile al riscaldamento del digestore viene semplicemente dissipata nell'ambiente. Sono, però, documentati casi di aziende agricole che utilizzano l'aria calda così prodotta per riscaldare, ad esempio, l'interno di una serra oppure l'acqua necessaria alla pulizia della sala di mungitura. Altri possibili impieghi di questo calore prodotto da fonti rinnovabili sono rappresentati dal teleriscaldamento, durante i mesi freddi, ed il suo ricircolo all'interno di un essiccatoio durante la stagione dei fieni.

## 9. CONCLUSIONI

L'analisi condotta porta ad alcune riflessioni positive e all'individuazione di opportunità di sviluppo future per gli impianti di fermentazione anaerobica per la produzione energetica in cogenerazione.

I risultati economici dell'investimento oggetto della presente ricerca indicano margini di redditività interessanti per gli allevatori e buone prospettive nel medio-lungo periodo, soprattutto in considerazione della garanzia dei Certificati Verdi per almeno quindici anni, come attestato dalla Legge Finanziaria 2008.

Un ulteriore fattore d'incremento della redditività è dato dal contributo pubblico erogato in sede di costruzione dell'opera dalle amministrazioni locali. Esso è infatti determinante nell'anticipare l'inizio della concreta redditività dell'intero investimento, consentendo agli agricoltori di raccogliere sin da subito i frutti della cogenerazione, stimolando gli agricoltori italiani ad investire in tal senso.

Quanto dimostrato sinora si fa ancora più interessante se si osserva l'investimento dal punto di vista della *multifunzionalità* che, inevitabilmente, sta iniziando a permeare il tessuto agricolo italiano. La diversificazione delle produzioni all'interno dell'azienda agricola italiana di medie dimensioni, e non solo, si ritiene sia, infatti, l'unica via da percorrere per proseguire l'attività, essendo sempre più difficile raggiungere l'obiettivo del reddito con le sole produzioni primarie. In questo caso si può dunque parlare di *diversificazione del reddito* nell'ambito della multifunzionalità agricola, ovvero la possibilità per l'allevatore di poter beneficiare di entrate provenienti da un'attività aziendale sempre connessa all'agricoltura, ma allo stesso tempo distante dall'indirizzo produttivo originario.

Oltretutto, nel caso specifico della cogenerazione da biogas a partire dai reflui zootecnici, all'allevatore è consentito trarre un beneficio da ciò che normalmente rappresenta un onere, sia dal punto di vista gestionale, che economico. Quindi lo sfruttamento di questa particolare biomassa risulta doppiamente vantaggioso per la zootecnia italiana, giacché i numerosi e sempre più opprimenti vincoli ambientali legati alla tutela dei suoli, da una parte impongono all'agricoltore una sempre più attenta ed onerosa gestione del refluo zootecnico e dall'altra prescrivono che esso permanga lungamente presso l'azienda. Dunque, la possibilità di potere ottenere sia energia elettrica che calore e, quindi, come qui dimostrato, un reddito da questa massa altrimenti inutilizzata rende la questione particolarmente interessante dal punto di vista economico.

Infine, sempre parlando di multifunzionalità in agricoltura, la cogenerazione da biogas a partire da reflui zootecnici permette al Settore Primario di mutare il proprio ruolo da tradizionale sfruttatore a nuovo "*custode delle risorse ambientali*". La produzione di energia a partire dalle biomasse agricole, infatti, se opportunamente gestita, può essere la strada vincente per il raggiungimento degli ambiziosi obiettivi che via via vengono promossi dalle politiche ambientali. In particolare, la nuova volontà collettiva mondiale di riuscire ad ottenere energia elettrica e calore a partire da ciò che normalmente viene considerato un rifiuto o, comunque, uno scarto di produzione, apre alla cogenerazione a partire dai reflui zootecnici buone prospettive in termini sia di sviluppo tecnologico, che di diffusione.

Al momento la cogenerazione da biogas di origine agricola è ancora poco diffusa nel nostro Paese: i pochi impianti esistenti sono concentrati al Nord e sono quasi tutti di piccole dimensioni. Per il futuro, però, alcuni dati lasciano ben sperare: il numero delle domande per il contributo alla costruzione di nuove stazioni per la cogenerazione è in costante crescita e molti allevatori iniziano seriamente a considerare il sistema per la digestione anaerobica dei reflui come il primo tra gli interventi da apportare alla propria azienda.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) AA. VV. (2005): Energia dal biogas – soluzioni possibili per l’azienda zootecnica. Il Divulgatore – Anno XXVIII, n. 12.
- 2) DALL’OLIO N., CRAPELLA B. (2002): “La gestione degli spandimenti sul suolo di reflui zootecnici e fanghi di depurazione in provincia di Parma – valore agronomico e sostenibilità ambientale”. Provincia di Parma – Assessorato Agricoltura ed Alimentazione.
- 3) COMMISSIONE CE (1991). Comunicazione della Commissione al Consiglio – “Evoluzione e futuro della Pac”, *Com /91/100 def.*, Bruxelles.
- 4) DEVENUTO L., RAGAZZONI A. (2008): Il biogas è un affare se la filiera è corta. *L’Informatore Agrario*, n. 18.
- 5) IACOMELLI A. (2007). “Oltre Kyoto. Cambiamenti climatici e nuovi modelli energetici. Muzzio Editore.
- 6) HENKE R. (a cura di), (2004). Verso il riconoscimento di una agricoltura multifunzionale. Teorie, politiche, strumenti. Edizioni Scientifiche Italiane, INEA, Roma.
- 7) HOFFMANN A. (2006). La nuova politica di sviluppo rurale. Franco Angeli, Milano.
- 8) IDDA L., FURESI R., PULINA P. (2005). Mid Term Review e multifunzionalità. In *Rivista di Economia Agraria*, n. 2, 195-222.
- 9) 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.
- 10) SALGHETTI A., FERRI G., MANGHI E. (2007). Strategie d’impresa e multifunzionalità in agricoltura. *Annali Fac. Med. Vet., Università di Parma*, XXVII.
- 11) SPISNI P. (2004). Che cos’è la multifunzionalità? Centro Studi Aziendali. Bologna.
- 12) TOUFIC EL ASMAR. (2006). L’agrienergia ed il ruolo multifunzionale dell’agricoltura. ASPO-Italia.
- 13) VELASQUEZ B. E. ( 2004). Multifunzionalità: definizione, aspetti tecnico-economici e strumenti. In Inea: *Verso il riconoscimento di un’agricoltura multifunzionale*. Edizioni Scientifiche Italiane, Napoli.
- 14) Decreto Legislativo n. 228/2001 ([www.parlamento.it](http://www.parlamento.it)).





Finito di stampare  
nel mese di aprile 2009  
da Toriazzi S.r.l. - Parma

