

INVOLVEMENT OF THE OPIOIDERGIC AND DOPAMINERGIC SYSTEM IN THE CENTRAL REGULATION OF GONADOTROPIN SECRETION

F. De Rensis (DVM, M.Phil, PhD)

*Docente di Fisiologia degli Animali Domestici, Istituto di Clinica Ostetrica Veterinaria,
via del Taglio 8, 43100 Parma, Italy. e-mail: fderensi@ipruniv.cce.unipr.it*

Introduction

The hypothalamus has extensive efferent and afferent connections with various brain structures and many experiments have shown that these have both inhibitory and facilitatory effects on gonadotropin secretion. There are many multisynaptic stimulatory and inhibitory pathways between extra-hypothalamic areas and the hypothalamus and the different neurotransmitters involved include adrenaline, noradrenaline, dopamine, acetylcholine, histamine, serotonin, endogenous opioid peptides (EOPs), N-methyl D-aspartate (NMDA), gamma-aminobutyric acid (GABA) and neuropeptide Y (Krulich, 1979; Elde and Hokfelt, 1979; Bicknell, 1985; Okrasa et al., 1996). Those systems seldom work in isolation but very often operate in concert to determine peripheral LH concentrations. Up today most of the effect of the central control of the GnRH seems mediated by dopamine and opioids. The aim of this paper is to give a simplified review of the control of gonadotropin release by the dopaminergic and opioidergic system. Furthermore will be discuss the interaction between those system in the control of GnRH secretion.

The dopaminergic control of gonadotropin secretion

Regarding the relationship between dopamine and GnRH, some *in vitro* studies indicate that dopamine can stimulate the release of GnRH and thus LH (Rasmussen et al., 1986). Also *in vivo* it has been demonstrated that a dopaminergic (pimozide) antagonist consistently blocked the estradiol-induced LH surge and suppressed LH secretion in ovariectomized ewe (Jackson et al., 1977). Sneider and McCann (1970) report that dopamine is only effective in enhancing LH in steroid treated ovariectomized females. Similarly, it was demonstrated that *in vitro* release of LHRH from incubations of the mediobasal hypothalamus was only enhanced by dopamine when the tissue was taken from intact male or ovariectomized, estrogen-treated female rats (Rotsztein et al., 1978a,b). Collectively, these data suggest that the dopaminergic stimulation of LHRH is apparent only in intact or steroid treated castrate animals. Furthermore, it has been shown that the catecholamine content of tuberoinfundubular cell bodies exhibit a cyclical variation throughout the estrous cycle of the rat, confirming that the ovarian steroids are important in determining the influence of the dopaminergic system on LH secretion (Ahern et al., 1978; Barraclough et al., 1982). Consistent with the evidence for a stimulatory effect of dopamine on the central control of LHRH and LH secretion, treatment with the dopamine agonist bromocriptine restored ovulatory function in women with hyperprolactinaemia (Besser et al., 1972; Thorner et al., 1975; Del Pozo et al., 1974) and increased mean LH concentrations in lactating sows (Bever et al., 1981; De Rensis et al., 1993c; 1998b). There are, however, many experiments that suggest an inhibitory, rather than a facilitatory role, for dopamine on LH release (Miyachi et al., 1973; Uemura and Kobayashi, 1971; Drouva and Gallo, 1976; Beck and Wuttke, 1977; Ramirez et al., 1984; Leebaw et al., 1978). In ewes dopamine inhibited release of GnRH from the median eminence (Kuljis et al., 1989) and a fall in plasma LH concentration after bromocriptine treatment has been described in the sows (Kraeling et al., 1982). Furthermore, results based on the treatment of luteal phase ewes with dopamine or a dopamine receptor antagonist, suggest that progesterone might exert an inhibitory effect on LH secretion through a dopaminergic mechanism (Deaver and Dailey, 1983; Deaver et al., 1987, Dailey et al., 1987). Also in intact anestrus sheep, dopaminergic antagonists (phenoxybenzamine and pimozide) increased pulsatile secretion of LH (Meyer and Goodman, 1986) and it appears that a dopaminergic inhibitory effect on LH secretion predominates in anestrus ewes. Exquisite sensitivity to ovarian hormone feed-back, probably estradiol (Goodman et al., 1980a,b 1982), may regulate the activity of this inhibitory neural system and thereby suppress LH pulse frequency. Finally acute administration of bromocriptine in human and sow has been reported to have no effect on LH secretion (Evans et al., 1980; Mattioli et al., 1986).

The overall conclusion from these apparently contradictory data is that some effects of dopamine on GnRH are mediated by the presence of ovarian steroids; thus, as Dailey et al. (1987) suggest, the different actions of catecholamine antagonists in the different species, with and without ovaries, could be due to the relative activity of two different catecholaminergic systems (dopaminergic and noradrenergic) involved in regulating episodic secretion of LH.

The specific effects of dopamine on gonadotropin secretion depends on the type of dopamine receptors present at each level of the brain-hypothalamo-hypophysial axis. As many as five different dopamine receptors have been identified (Sokoloff et al., 1990; Deary et al., 1990; Sunahara et al., 1991) and Kebejian and Calne

(1979) first proposed that dopamine receptors in the brain are divided into two separate subtypes designated D1 and D2. Recently Sokoloff et al. (1990) have been able to characterize a receptor subtype D3, which differs in its pharmacology and signalling system from D1 and D2. The D3 receptor is localized in the limbic areas of the brain associated with cognitive, emotional and endocrine function. Finally James et al., (1987) observed in the rat that the selective D2 agonist LY171555 and D2 antagonists, sulpiride and domperidone, had no effect on plasma LH or ovulation, but the D1 agonist SKF 38393 stimulated LH release indicating that the stimulatory effect of dopamine on LH release is centrally mediated via D1 receptors.

There are some differences between studies in the apparent site of dopaminergic control of gonadotropin secretion. However, overall the main site of action of dopamine on gonadotropin secretion is generally believed to be at hypothalamic level on GnRH neurons. These conclusions have been also drawn from observations that incubation of dopamine with pituitary cells *in vitro* failed to affect secretion of LH. Other studies suggest a pituitary site of action for dopamine modulation of LH release and this is supported by the identification of dopamine receptors in pituitaries of various species (Nunez et al., 1981; Johns et al., 1982). Studies of dopamine receptor distributions in mammalian species indicate that only D2 receptors are found in the pituitary Thomas et al., 1989), whereas in the median eminence receptors are primarily of the D1 type (Leibowitz et al., 1982). Others have reported that there are also D1 receptors in the pituitary cells and administration of Fenodolpan (a specific dopamine D1 agonist) resulted in a dose-dependent decrease in PRL secretion *in vivo* and *in vitro* in the rat (Schoors et al., 1991). In a recent study Martinez-de-la-Escalera et al. (1992) and Findell et al. (1993) report that there is a direct stimulatory effect of DA on GnRH release via dopamine D1-receptors but not dopamine D2-receptors.

By infusing Fenodolpan during the follicular phase in woman, Boesgaard et al. (1991) induced an increase in the LH and FSH responses to GnRH administration, and also suggested that this dopamine agonist was acting at the hypophysial level. The release of LH in response to GnRH is decreased in ovariectomized, pituitary stalk-transected ewes (Donnelly and Dailey 1991), in stalk sectioned rabbits (Dailey et al., 1978), ovariectomized ewes (Deaver et al., 1982) and humans (Leebaw et al., 1978) treated with dopamine infusion.

In conclusion, although there are conflicting data *in vivo* and *in vitro* on dopamine actions of LH release, it seems possible to postulate that dopamine modulates gonadotropin secretion by regulating GnRH secretion at the hypothalamic level. However, a pituitary effect of dopamine cannot be excluded. The presence of either inhibitory or stimulatory effects of dopamine agonists and antagonists suggests that other regulatory systems (i.e. steroids) are involved in modulating the effects of dopamine on GnRH and LH secretion during different reproductive periods.

The opioidergic control of gonadotropin secretion

Endogenous opioid peptides

Several comprehensive reviews on the opioids have been published (Bicknell, 1985; Brooks et al., 1986; Malven, 1986; Haynes et al., 1989; Barb et al., 1991; Kraeling et al., 1992; Britt et al., 1993; Schillo, 1993; Rawlings et al., 1993; De Rensis et al., 1993a; Okrasa et al., 1996) and Table 1 summarizes research conducted in domestic species using the EOP antagonist naloxone. The family of peptides comprising the endogenous opioids is divided into three sub-groups by virtue of structure and precursor molecule. The enkephalins, beta-endorphins and dynorphins exhibit varying affinity for at least five opiate receptors, mu, kappa, delta, sigma (Paterson et al., 1983). Among these, the mu receptors appear to be particularly relevant for the control of gonadotropin secretion (Cicero et al., 1983; Pfeiffer et al., 1983; Panerai et al., 1985; Laedem et al., 1985;) and there are suggestion also for kappa receptors (Goodman et al., 1980; Pfeiffer et al., 1983). However the studies of Weisner et al., (1985) indicate that delta but not mu receptors are implicated in opioid inhibition of LH. Finally Hoffman et al. (1989) reported that only a fraction of GnRH cells is contacted by opioid neurones.

There are two levels at which opioids may modulate gonadotropin secretion. Firstly they may interfere with GnRH action at the anterior pituitary gland; secondly they may influence GnRH secretion within the hypothalamus. Several lines of evidence argue against the hypothesis that opioids inhibit LH secretion via direct actions upon the anterior pituitary. Early *in vivo* and *in vitro* studies in a variety of species showed that neither naloxone nor morphine altered the pituitary LH responses to pulses of GnRH (Cicero et al., 1977; Grossman et al., 1989; Ferin et al., 1984; Ebling et al., 1987) and naloxone did not disrupt the secretory response of the pituitary to exogenous GnRH given *in vivo* (Cicero et al 1977; Grossman et al., 1984, Ferin et al 1984). Furthermore in the rat GnRH antagonist treatment decreased naloxone-induced elevations in plasma LH (Blank et al., 1982) and morphine reduces secretion of GnRH into pituitary portal plasma (Ching., 1983). Finally, in the sheep there is

no direct pituitary action of morphine on LH secretion *in vivo* and no specific binding in the anterior pituitary gland (Horton et al., 1990). However, other authors have reported effects of opiates at the pituitary level (Chao et al., 1986; Blank et al. 1986; Mattery and Moberg, 1985; Chao et al., 1986; Barb et al., 1990). Therefore it seems that opioids may have a more important role in the control of LH secretion at the pituitary level than was suggested from earlier studies.

The precise site in the central nervous system at which opioids might affect GnRH secretion remains largely speculative. On the basis of several observations it seems that the site of action of the opioids is in the medial preoptic area, the median eminence and the arcuate nucleus (King et al., 1982; Witkin et al., 1982; Kalra, 1981, 1983), with the highest concentrations of beta-endorphin being reported in the rat to be in the medial hypothalamus and lower concentrations in the thalamus, zona compacta of the substantia nigra, medial amygdaloid nucleus, periaqueductal grey area and the locus coeruleus (for review see Morley, 1981; Grossmann et al., 1989). Although there is no available evidence on whether LHRH neurons are innervated directly by any of the opioidergic systems (for review see Hoffman et al., 1989), the above data and the stimulatory effect of naloxone on LHRH release under *in vitro* conditions (Blank et al., 1982; Laedem et al., 1985) demonstrate that opioids affect the release of LHRH from the hypothalamus.

The opioids and the post-partum anestrus in the domestic animals.

Cow

In cattle, LH pulse frequency and therefore GnRH secretion is depressed during the post-partum period and this suppression exists for a greater length of time in suckled compared to milked cows, implying that the suckling stimulus rather than the lactation itself was responsible for LH suppression (Peters et al., 1981).

One of the mechanisms by which suckling inhibits GnRH secretion in the cow involves the opioids. Naloxone infusion into suckled beef cows around day 40 post-partum resulted in a significant increase in LH pulse frequency and amplitude, while naloxone was ineffective in raising LH in non suckled post-partum cows (Whisnant et al 1986a,b). Calf removal usually abolished the response to naloxone. It has also been shown that a larger dose of naloxone is required to elicit an LH response on day 14 post-partum compared to days 28 and 42, leading to the proposal that opioidergic inhibition of LH in the post-partum cow appears to be more potent in the early post-partum period (Whisnant et al 1986b). In conclusion, from these data, it would appear that the removal of the suckling stimulus disinhibits the effect of opioids on LH secretion in the cow. Conversely, Cross et al. (1987) observed that naloxone increased mean LH concentration, and episodic LH pulse frequency and amplitude in suckled beef cows at day 18-19 post-partum but a response was also evident three days after weaning at day 24. These discrepancies between studies could be related to the time of weaning. From the above data and the observations of a latent effect on the pituitary of the high steroid levels during gestation (see Nett, 1987), it seems possible to conclude 1) that in cows, suckling influences LH secretion at the later but not during the immediate post-partum period and 2) that the opioids in cows are effective in inhibiting GnRH secretion but this effect gradually diminishes during the post-partum period.

Sheep

Research in the sheep is difficult to relate to that in other domestic species due to marked reproductive seasonality. However, during the post-partum period in the ewe, naloxone significantly increases LH concentration, with a decrease in the response of LH to naloxone treatment with time from lambing (Gregg et al 1986).

Elevations in post-partum LH concentrations following EOP antagonism were associated with depressions in PRL secretion in suckled and non-suckled ewes. In another study, involving the alternative approach of direct estimation of hypothalamo-hypophysial beta-endorphin concentrations and receptor populations, there was a suggestion that under the stimulus of suckling, this opioid exhibits an autocrine role within the hypothalamus, inhibiting GnRH release and also the dopaminergic suppression of PRL secretion (Gordon et al., 1987). Hence, plasma PRL concentrations may represent the result of hypothalamic EOP inhibition rather than playing a causal role in GnRH regulation. In the spring lambing ewe, naloxone was administered to suckling ewes and to ewes weaned 20 days post-partum (3 days after lamb removal). EOP antagonism elevated LH secretion in both groups when compared with non-suckled and suckled counterparts without EOP inhibition. This result suggests that although EOP may have reduced gonadotropin secretion in these animals, their effects were not modified by suckling (Newton et al., 1988). It is noteworthy however, that LH concentrations in the control, weaned group fell following weaning when compared with suckled ewes. The possibility remains that suckling effects were still evident 72 hours post-weaning and the authors argue that, although a comparison between weaned and weaned plus naloxone was unobtainable, suckling was unlikely to have affected responses to the antagonist. On this basis, they suggest that the post-partum lactating ewe differs from species exhibiting a distinct lactational anestrus, e.g. pigs and cattle.

Thus in the ewe the opioidergic suppression of LH did not appear dependent on suckling, since the response to naloxone is still present in ewes from which the lambs are removed at day 10 of lactation and there are no differences in pre-naloxone LH values between suckled and non-suckled ewes. Thus it is not surprising that there are no differences in the time taken from birth until post-partum estrus between suckled and non suckled ewes (Fletcher et al 1973; Moss et al 1980). A marked seasonal cycle in the peripheral blood plasma concentrations of beta-endorphin occurs in sheep with a 10- to 20- fold increase from spring to autumn (Ebling and Lincoln, 1985).

In conclusion, it seems that although opioids reduce gonadotropin secretion in the sheep, this effect is independent of the suckling stimulus.

Pig

Suckling in the sow has been shown to inhibit LH secretion by a suppression of the GnRH pulse generator, as evidenced by a LH response to a single GnRH challenge (Rojanasthien et al., 1987) and to repeated GnRH injections during suckling, (Bevers et al., 1981; Britt et al., 1985; De Rensis et al., 1991). The principal cause of lactational anestrus is the inhibitory effect of suckling on hypothalamic GnRH release and the resulting decline in episodic LH secretion. The opioids have been shown to be prime candidates as mediators of this inhibitory effect of the suckling stimulus on LH secretion. Barb et al. (1986a) and Mattioli et al. (1986) first observed that naloxone injections are able to increase LH plasma levels during lactation in swine. Armstrong et al. (1988a) also blocked the increase in LH secretion associated with transient weaning and demonstrated a delayed estrus onset in weaned sows following morphine administration. Armstrong et al. (1988b) also report that constant infusion of naloxone in suckled sows, while increasing LH pulse frequency, failed to elevate mean LH levels above those of suckled sows treated with saline, whilst temporary removal of the litter (for 8 hours) caused a significant increase in both LH mean and LH pulse frequency. A more detailed study demonstrated that in the sow an opioid-dependent mechanism is an important component of the suckling-dependent regulation of LH and prolactin secretion in established lactation, but not during the first 72 h post partum (De Rensis et al., 1998a)

In summary, in the pig the opioids appear to play a role in post-partum control of LH secretion and therefore in lactational anestrus, although their role appears to vary with time post-partum.

Interactions between opioids, dopamine and gonadotropin secretion

Available data suggest that the mechanisms by which opioids suppress LH secretion may not involve the dopaminergic system. In fact the combined treatment of post-partum ewes with metoclopramide (a dopamine antagonist) in addition to naloxone did not modify the response of LH (Knight et al., 1986), leading to the conclusion that endogenous opioids suppressed LH secretion in the suckling ewe by a mechanism insensitive to dopaminergic modulation, as previously proposed by Kann et al. (1979). However the release of LHRH from medio-basal hypothalamic fragments, induced by KCl depolarization or DA, can be inhibited by submicromolar concentrations of met-enkephalin, leu-enkephalin or beta-endorphin (Drouva et al., 1980, 1981; Rotsztein et al., 1978a; Rotsztein et al., 1978b).

In the post-partum sheep elevations in LH concentrations following opioid antagonism on days 10 and 26 post-partum, (Gregg et al., 1986) are associated with depressions in PRL secretion in suckled and non-suckled ewes. In another study involving the alternative approach of direct estimation of hypothalamo-hypophysial beta-endorphin concentrations and receptor populations, there was a suggestion that, under the stimulus of suckling, the opioids exhibit an autocrine role within the hypothalamus, inhibiting GnRH release and the dopaminergic suppression of PRL secretion (Gordon et al., 1987). However there are studies indicating that dopamine can influence opioid secretion and might therefore exert indirect effects of GnRH and LH secretion. In humans, a tonic dopamine inhibition of beta-endorphin was reported (Genazzani et al., 1984) and stimulatory effects of DA antagonists on beta-endorphin secretion have been observed in rats (Farah et al., 1983; Giraud et al., 1980), dog (Sharp et al., 1982). Furthermore Vermes et al. (1984) demonstrated *in vitro* that the release of beta-endorphin from the mediobasal hypothalamus is under the inhibitory control of dopaminergic neurons. In the ram dopamine inhibits beta-endorphin and PRL secretion under either long and short days and Ssewanyana et al., (1990) reported that circulating concentrations of beta-endorphin and PRL decrease following treatment with bromocriptine during different stages of the photoperiod-induced cycle.

Recently it has been reported that mu receptors undergo upregulation in response to chronic cocaine exposure suggesting that dopamine activity can regulate the

expression of mu opioid receptors (Unterwald et al., 1992). Dopamine receptor agonists (bromocriptine, lysuride) do not change plasma beta-endorphin when acutely administered but induce responses during chronic treatment (Autelitano et al., 1987). These results further confirm that there is a chronic and not an acute effect of dopamine on GnRH/LH secretion. In a recent study (De Rensis et al., 1998b) has been investigated the interaction between dopaminergic and opioidergic in the control of LH and prolactin secretion utilizing naloxone (an opioid antagonist) and morphine (an opioid agonist). The results of this study indicate that dopamine agonist administration is able to increase LH secretion after chronic and not acute treatment; this effect may be mediated by a disinhibition of the inhibitory effect of endogenous opioids on GnRH secretion.

TABLE 1 EFFECT OF ADMINISTRATION OF NALOXONE ON LH SECRETION IN DOMESTIC SPECIES.

Species	Reproductive period	Naloxone effect	Reference
<i>Sheep</i>	1. Lamb 12 weeks old	LH increase	Ebling et al., 1989
	2. Lamb 12 weeks old, ovx+E17 implants	LH increase	
	1. Early post-natal	LH increase	Finnie et al., 1989
	2. Late prepubertal	LH increase	
	3. Prepubertal	No effect	
	1. Prepubertal lamb, 20, 23, 25, 30 weeks old	LH increase	Matthews and Murdoch, 1984 Churchill and Rawlings, 1987
	1. Yearling ewes, seas. anestrus	LH increase	Brooks et al., 1986b
	1. Adult seasonally anestrus	No effect	Brooks et al., 1986b
	1. Ovx lamb 3 weeks old, after removing E2 implants	LH increase	Ebling et al., 1989
	1. Prepubertal feed-restricted lambs	LH attenuated response	Foster et al., 1988
	1. Cyclic luteal phase	LH freq. decr. LH ampl. incr.	Whisnant and Goodman, 1988
	2. Cyclic follicular phase	LH freq. incr. LH ampl. decr.	
	3. Ovx ewe + E2	LH ampl. incr.	
	4. Ovx ewe + P4	LH freq. incr. LH ampl. incr.	
	1. Luteal phase	LH freq. incr.	Yang et al., 1985 Brooks et al., 1985 Brooks et al., 1986
	2. Follicular phase	LH freq. incr.	
	1. Follicular phase	LH freq. incr. LH ampl. decr.	Currie and Rawlings, 1987
	1. Suckling	LH increase	Newton et al., 1988
	2. None suckling	LH increase	
	1. Ram breeding season	LH increase	Ebling and Lincoln, 1985
2. Ram anestrus	No effect		
1. Ovx ram + testosterone, breeding season	No effect	Lincoln et al., 1987	
1. Suckling 10, 14, 18, 22, 26 days post-partum	LH increase	Gregg et al., 1986	

	1. Ram breeding season	LH increase	Boeing and Lincoln, 1985
	2. Ram anestrus	No effect	
	1. Ovx ram + testosterone, breeding season	No effect	Lincoln et al., 1987
	1. Suckling 10, 14, 18, 22, 26 days post-partum	LH increase	Gregg et al., 1986
	2. No suckling 10 days post-partum	LH increase	
	1. 12 weeks old	Limited increase	Ebling et al., 1987
	2. 20 weeks old, ovx + E2 shortly before puberty	LH increase	
	3. 35 weeks old ovx + E2 E2 replaced with P4	No effect No effect	
	1. Luteal phase	LH increase	Brooks et al., 1986b Currie and Rawlings, 1987 Trout and Malven, 1987
	1. Ovx breeding season	LH increase	Brooks et al., 1986c
	2. Ovx seasonally anestrus	LH increase	
	3. Breeding season + E2	No effect	
	4. Seasonally anestrus + E2	No effect	
	1. Seasonally anestrus	No effect	Meyer and Goodman, 1986 Brooks et al., 1986b Yang et al., 1988
	1. Ovx	Limited effect	Brooks et al., 1986
	2. Ovx + P4	LH increase	
	3. None breeding season	No effect	
	- ovx	No effect	
	- ovx + E2	No effect	
	- ovx + E2 + P4	LH increases	
	1. Ovx + P4	LH increase	Trout et al., 1987
	- After P4 removal	No effect	
	- Single E2 injection	LH increase	
	1. Ovx, breeding season	LH increase	Cernak and Nett, 1985
	2. Ovx, none breeding season	LH increase	
	3. Ovx, breeding season + E2	greater LH increase	
	4. None breeding season	greater LH increase	
Cow	1. Late follicular phase	LH ampl. incr.	Short et al., 1987
	2. Luteal phase	No effect	
	1. Early post-natal	LH increase	MacDonald et al., 1990
	2. Late prepubertal	LH increase	
	3. End of infantile period	No effect	
	1. None suckled, post-partum	No effect	Whisnart et al., 1986a
	2. Suckled day 40, post-partum	LH increase	
	1. Calf removal, day 48 post-partum	No effect	Whisnart et al., 1986c
	1. Suckled day 18 and 19 post-partum	LH increase	Cross et al., 1987

	2. Suckled day 40, post-partum	LH increase	
	1. Calf removal, day 48 post-partum	No effect	Whisnart et al., 1986c
	1. Suckled day 18 and 19 post-partum	LH increase	Cross et al., 1987
	1. Suckled day 14, 28, 42	LH increase	Whisnart et al., 1986a Whisnart et al., 1986b
	2. After weaning	No effect	
	3. None suckled	No effect	
	1. Follicular phase	LH increase	Short et al., 1987
	2. Luteal phase	No effect	
	1. Suckled day 18-19	LH increase	Cross et al., 1987
	2. Weaned day 21	No effect	
<i>Horse</i>	1. Diestrous	LH increase	Sharp et al., 1985
	2. Estrous	No effect	
	3. Ovx	No effect	
	1. None breeding season	No effect	Sharp et al., 1985
<i>Pig</i>	1. Very young immature male pig	FSH increase, no LH increase	Trudeau et al., 1988 Trudeau et al., 1989
	1. 10 week old males	No FSH incr., ---	Prunier et al., 1990
	1. Luteal phase	LH increase	Barb et al., 1991
	2. Early follicular phase	No effect	Barb et al., 1986
	3. Late follicular phase	No effect	
	1. 40 h after weaning	No effect	Barb et al., 1986
	1. Prepubertal gilts	No LH increase	Barb et al., 1991
	2. Ovx prepubertal gilts + P4	No LH increase	
	3. Ovx gilts + P4	LH increase	
	4. Ovx gilts + E2 or E2 + P4	LH increase	
	5. Adult gilts + P4 at ovx	LH increase	
	1. Prepubertal gilts, feed-restricted	LH suppressed	Cosgrove et al., 1991
	2. Prepubertal gilts, re-fed	LH suppressed	
	1. Suckled	LH increase	Mattioli et al., 1986
	1. Suckled	LH increase	Barb et al., 1986b
	1. Suckled	LH freq. incr.	Armstrong et al., 1988b

ABBREVIATION USED

ovx = ovariectomized
E2 = estradiol-17beta
P4 = progesterone
ses. = seasonal
inj. = injection
pp. = post-partum
suckl. = suckling
wean. = weaned

P4 = progesterone
 ses. = seasonal
 inj. = injection
 pp. = post-partum
 suckl. = suckling
 wean. = weaned

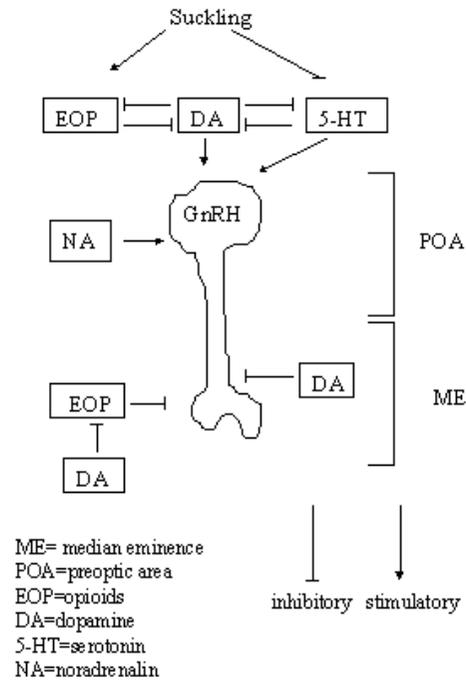


Fig. 1. Schematic diagram of the suggested interactions between the dopaminergic and opioidergic system and the control of GnRH/LH secretion. The diagram is highly simplified and does not take account of the many other potential neuroendocrine regulators of GnRH

BIBLIOGRAPHY

- Armstrong, J.D., Kraeling, R.R., Britt, J.H. (1988a). Morphine suppresses luteinizing hormone concentrations in transiently weaned sows and delays onset of estrus after weaning. *J. Anim. Sci.*, 66:2216-2222.
- Armstrong, J.D., Kraeling, R.R., Britt, J.H. (1988b) Effects of naloxone or transient weaning on secretion of LH and prolactin in lactating sows. *J. Reprod. Fert.*, 83:301-308.
- Autelitano, D.J., Clements, J.A., Nikolaidis, I., Canny, B.J., Funder, J.W. (1987). Concomitant dopaminergic and glucocorticoid control of pituitary proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid and beta-endorphin levels. *Endocrinol.*, 121:1689-1693.
- Barb, C.R., Kraeling, R.R., Rampacek, G.B., Whisnant, C.S. (1986). Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion in the post-partum lactating sow. *Biol. Reprod.*, 35:368-371.
- Barb, C.R., Estienne, M.J., Kraeling, R.R., Marple, D.N., Rampacek, G.B., Rahe, C.H., Sarti, J.I. (1990). Endocrine changes in sows exposed to elevated ambient temperature during lactation. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 8, 1:117-127.
- Barb, C.R., Kraeling, R.R., Rampacek, G.B. (1991). Opioid modulation of gonadotropin and prolactin secretion in domestic farm animals. *Dom. Anim. Endocrin.*, 91:15-27.
- Barraclough, C.A., Wise, P.M. (1982). The role of catecholamines in the regulation of pituitary LH and FSH secretion. *Endocrine rev.*, 3:91-119.
- Beck, W., Engelbart, S., Gelato, M., Wuttke, W. (1977). Antigonadal effect of prolactin in adult castrated and in immature female rats. *Acta. Endocrinol.*, 84:62-71.
- Bevers, M.M., Willemsse, M.H., Kruij, T.A.M., Van de Wiel D.F.M. (1981). Prolactin levels and the LH response to synthetic LHRH in lactating sow. *Anim. Reprod. Sci.*, 4:155-163.
- Bicknell, R.J. (1985). Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurones. *J. Endocr.*, 107, 437-446.
- Blank, M.S., Panerai, A.E., Friesen, H.G. (1979). Opioid peptides modulate LH secretion during sexual maturation. *Science* 203:1129-1131.
- Blank, M.S., Roberts, D.L. (1982). Antagonist of GnRH blocks naloxone induced elevation in serum LH. *Neuroendocrinol.*, 5:309-312.
- Boesgaard, S., Hagen, C., Hangaard, J., Andersen, A.N., Eldrup, E. (1991). Pulsatile gonadotrophin secretion and basal PRL levels during dopamine D1 receptor stimulation in normal

- womem. *Fert. and Ster.*, 55:281-286.
- Britt, J.H., Armstrong, J.D., Cox, N.M., Esbenshade, K. (1985). Control of follicular development during and after lactation in the sow. *J. Reprod. Fert.*, 33:37-54
 - Britt, J.H., Armstrong, J.D., Moore, K.L., Sesti, L.A.C (1993). Involvement of opioids in regulation of LH secretion during lactational- or nutritional-induced anestrus in pig and cattle. In: *Opioids in farm animals*, EDS N.Parvizi, pp. 34-54.
 - Brooks, A.N., Lamming, G.E. and Hynes, N.B. (1986a). Endogenous opioid peptides and the control of gonadotrophin secretion. *Res. in Vet. Sci.* 41:285-299.
 - Brooks, A.N., Lamming, G.E., Lees, P.D., Haynes, N.B. (1986b). Opioid modulation of LH in ewes. *J. Reprod. Fert.*, 76:693-708.
 - Brooks, A.N., Haynes, N.B. Yang, K-P. and Lamming, G.E. (1986c). Ovarian steroid involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion in seasonally anoestrous mature ewes. *J. Reprod. Fert.*, 76:709-715.
 - Chao, C.C., Malven, P.V., Moss G.E. (1986). Direct opioid regulation of pituitary release of bovine luteinizing hormone. *Life Sci.*, 39:527-534.
 - Ching, M., (1983). Morphine suppresses the proestrous surges of GnRH in pituitary portal plasma of rats. *Endocrinol.*, 112, 2209-2211.
 - Churchill, I.J., and Rawlings, N.C., 1987. Naloxone enhances episodic luteinizing hormone and suppress episodic follicle stimulating hormone secretion in prepubertal ewe lambs. *Biol. Reprod.* 36: (suppl.1) abstr. 418.
 - Cicero, T.J., Bordger, T.M., Willcox, C.E., Bell, R.D., Meyer, E.R. (1977). Morphine decreases luteinizing hormone by an action on the hypothalamic - pituitary axis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 203:548-555.
 - Cicero, T.J., Owens, D.P., Schmoeker, P.F., Meyer, E.R. (1983). Morphine induced enhancement of the effect of naloxone on serum luteinizing hormone levels in male rat: specificity for mu antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226:770-774.
 - Cosgrove, J.R., Booth, P.J., Foxcroft, G.R., (1991). Opioidergic control of gonadotrophin secretion in the prepubertal gilt during restricted feeding and realimentation. *J. Reprod. Fert.*, 91:277-284.
 - Cross, J.C., Rutter, L.M., Manns, J.C. (1987). Effect of progesterone and weaning on LH and FSH responses to naloxone in post-partum beef cows. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 4:111-112.
 - Currie, W.D. and Rawlings, N.C. (1987). Naloxone enhances LH but not FSH release during various phases of the estrous cycle in the ewe. *Life Sci.*, 41:1207-1214.
 - Dailey, R.A., Deave, D.R., Goodman, R.L. (1987). Neurotransmitter regulation of LH and PRL secretion. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 34:17-26.
 - Deaver, D.R., Dailey, R.A. (1982). Effects of dopamine, norepinephrine and serotonin on plasma concentrations of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized and anoestrous ewe. *Biol. Reprod.* 27:624-632.
 - Deaver D.R., Dailey, R.A. (1983). Effects of dopamine and serotonin on concentrations of luteinizing hormone and estradiol-17beta in plasma of cycling ewes. *Biol. Repr.* 28:870-877.
 - Deaver, D.R., Keisler, D.H., Dailey, R.A. (1987). Effects of domperidone and thyrotropin-releasing hormone on secretion of LH and PRL during the uterine phase and following induction of luteal regression in sheep. *Dom. Anim. Endocrin.* 4:94-102 .
 - Dearth, D.R., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T., Bates, M.D., Caron, M.G. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for human D1 dopamine receptor. *Nature*, 347: 72-76.
 - Del Pozo, E., Varga, L., Wyss, H., Tolis, G., Froiesen, H., Wenner, R., Vetter, L., Uttewiler, A. (1974). Clinical and hormonal response to bromocriptine (CB 154) in the galactorrhea syndromes. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 39:18-21.
 - De Renzis, F., Hunter, M.G., Grant, S.A., Lancaster, R.T., Foxcroft, G.R. (1991). Effect of estrogen administration on endogenous and luteinizing-hormone-releasing-hormone-induced luteinizing hormone secretion and follicular development in the lactating sow. *Biol. of Reprod.* 44:975-982.
 - De Renzis, F., Foxcroft, G.R. (1993). Endogenous opioid modulation of gonadotropin and prolactin secretion in the post-partum sow. In: *Opioids in farm animals*, EDS N.Parvizi, pp. 15-33.
 - De Renzis, F., Cosgrove, J., Foxcroft, G.R. (1993c). Luteinizing hormone and prolactin responses to naloxone vary with stage of lactation in the sow. *Biol. of Reprod.* 48:970-976.
 - De Renzis, F., Cosgrove, J.R., Foxcroft, G.R. (1998a). Ontogeny of the opioidergic regulation of LH and prolactin secretion in lactating sow I: failure of naloxone to antagonize suckling-induced changes in LH and prolactin secretion in early lactation, irrespective of pattern of administration. *J. Reprod. Fert.*, 112:79-85
 - De Renzis F., Quintavalla, F., Foxcroft, G.R. (1998b). Treatment of lactating sows with dopamine agonist Cabergoline: effects of LH and prolactin secretion and responses to challenges with naloxone and morphine. *Animal Reprod. Sci.*, 51:233-247
 - Donnelly, P.J. and Dailey, R.A. (1991). Effect of dopamine norepinephrine and serotonin on secretion of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin in ovariectomized, pituitary stalk-transected ewes. *Domestic Animal Endocrinol.*, 8(1):87-98.
 - Drouva, S.V., Gallo, R.V. (1976). Catecholaminergic involvement in episodic luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Endocrinol.*, 99: 651-658.
 - Ebling, F.J.P., Lincoln, G.A., Martin, G.B., Taylor, P.L. (1987). LHRH and beta-endorphin in the hypothalamus of the ram in relation to photoperiod and reproductive activity. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 4:149-156.
 - Ebling, F.J.P., Schwartz, M.L., Foster, D.L. (1989). Endogenous opioid regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion during sexual maturation in the female sheep. *Endocrinol.*, 125:369-383.
 - Evans, G. (1980). Reproductive potential and endocrinological responses of sheep kept under controlled lighting. III. Prolactin and pituitary responsiveness to Gonadotrophin releasing hormone in the post partum period. *Anim. Reprod. Sci.*, 3:57-68.
 - Farah, J.M., Sapum-Malcom, D., Muller, G.P. (1983). *Endocrinol.*, 110:657-659.
 - Ferin, M., Van Vugt, D., Wardlaw, S. (1984). The hypothalamic control of the menstrual cycle and the role of endogenous opioid peptides. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 40:441-480.
 - Findell, P.R., Wong, K.H., Jackman, J.K., Daniels, D.V. (1993). Beta1-adrenergic and dopamine (D1)-receptors coupled to adenylyl cyclase activation in GT1 gonadotropin-releasing-hormone neurosecretory cells. *Endocrinol.*, 132:682-688.
 - Finnie, A.D., 1989. Opioid and dopamine modulation of luteinizing hormone secretion in live lambs. Ph.D. thesis, University of Nottingham.
 - Fletcher, I.C., (1973). Effect of lactation, suckling and oxytocin on post-partum oestrus in ewes. *J. Reprod. Fert.*, 33: 293- 298
 - Foster, D.L., Ebling, F.J.P., Vannerson, L.A., Wood, R.I. and Fenner, D.E., 1988. Regulation of puberty in the lamb: internal and external cues. In "Progress in Endocrinology" Eds. H. Imura, K. Shizume and S. Yoshida. Elsevier, Amsterdam. Vol.2:861.
 - Genazzani, A.R., Petraglia, F., Nappi, G., Martignoni, E., De Leo, M., Facchinetti, F. (1984). Endorphins in peripheral plasma: origin and influencing factors. In: *Central and peripheral endorphins: Basic and clinical aspects*. Ed. by E.E. Muller and A.R. Genazzani, Raven press, New York. pp. 89-96.
 - Goodman, R.L., Karsh, F.J. (1980a). Pulsatile secretion of LH: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinol.*, 107:1286-1290.

- Goodman, R.R., Snyder, S.H., Kuhar, M.J., Young, W.S. (1980b). Differentiation of delta and mu opiate receptor localization by light microscopic autoradiography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77:6239.
- Goodman, R.L., Bittman, E.L., Foster, D.L., Karsh, F.J. (1982). Alterations in the control of LH-pulse frequency underlie the seasonal variations in estradiol negative feed-back in the ewe. *Biol. Reprod.*, 27:580-589.
- Gordon, K., Renfree, M.B., Short, R.V., Clarke, L.J. (1987). Hypothalamo-pituitary portal blood concentrations of Beta-endorphin during suckling in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 79:397-408.
- Gregg, D.W., Moss, G.E., Hudgens, R.E., Malven, P.V. (1986). Endogenous opioid modulation of luteinizing hormone and prolactin in post-partum ewes and cows. *J. Anim. Sci.*, 63:838-847.
- Grossman, A. (1989). Opioid peptides, prolactin, and gonadotrophin regulation in the human. In: *Brain opioid system in reproduction*. Eds Dyer, R.G., Bicknell, R.J. Oxford University Press, 325-339.
- Grossman, A., Dyer, R.G. (1989) Opioid inhibition of brainstem projections in the medial preoptic area in female rats. In: *Brain opioid system in reproduction*. Eds Dyer, R.G., Bicknell, R.J. Oxford University Press, 112-130.
- Haynes, N.B., Lammings, G.E., Yang, K.P., Brooks, A.N., Finnie, A.D. (1989). Endogenous opioid peptides and farm animal reproduction. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Ed. by Millington S.R., 11:111-145.
- Hoffman, G.E., Fitzsimmons, M.D., Watson, R.E. (1989). Relationship of endogenous opioid peptide axons and GnRH neurones in the rat. In *Brain opioid systems in reproduction*. Eds R.G. Dyer, R.J. Bicknell. 124-134.
- Horton, R.J.E., Jiang-Yuan Li, Cummins, J.T., A.I., Shen, P.J., Clarke, I.J. (1990). Morphine decreases LH secretion in ovariectomized Ewes only after steroid priming and not by direct pituitary action. *Neuroendocrinol.*, 52:612-617.
- Jackson, G.L., Kuehl, D., Mc Dowell, K., Zaleski, A. (1978). Effect of hypothalamic deafferentation on secretion of LH in the ewe. *Biol. Reprod.*, 18:808.
- James, M.D., MacKenzie, F.J., Tuohy-Jones, P., Wilson, C.A. (1987). Dopaminergic neurones in the zona incerta exert a stimulatory control on gonadotrophin release via D1 dopamine receptors. *Neuroendocrinol.*, 45:348.
- Johns, M.A., Azmitia, E.C., Kreiger, D.T. (1982). Specific in vitro uptake of serotonin by cells in the anterior pituitary of the rat. *Endocrinol.*, 110:256-263.
- Kalra, S.P., Simpkins, J.W. (1981). Evidence for noradrenergic mediator of opioid effect on LH secretion. *Endocrinol.*, 109:776-782.
- Kalra, S.P. (1983). Opioid peptides-inhibitory neuronal system in regulation of gonadotrophin secretion. In: *Role of peptides and proteins in control of reproduction*. Eds McCann, S.M., Dhindsa, D.S., Elsevier, pp. 63-87.
- Kann, G., Martinet, J., Schirar, A. (1977). Hypothalamic-pituitary control during lactation in the sheep. In: *Control of ovulation*. Ed by D.B. Crighton, N.B., Haynes, G.R. Foxcroft and G.E. Lammings. Butterworths, London pp. 19-34.
- Keababian, K.W., Calne, D.B., (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature, Lond.* 277:93-96.
- King, J.C., Tobet, S.A., Snavely, F.L., Arimura, A.A. (1982). LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *J. Comp. Neurol.*, 209:287-300.
- Knight, P.G., Howles, C.M., Cunningham, F.J. (1986). Evidence that opioid peptides and dopamine participate in the suckling induced release of prolactin in the ewe. *Neuroendocr.*, 14:29-35.
- Kraeling, R.R., Barb, R.C., Rampacek, G.B. (1992). Prolactin and luteinizing hormone secretion in the pregnant pig. *J. Anim. Sci.* 70:3521-3527.
- Kraeling, R.R., Rampacek, G.B., Cox, N.M., Kiser, T.E. (1982). Prolactin and luteinizing hormone secretion after bromocriptine (CB 154) treatment in lactating sows and ovariectomized gilts. *J. Anim. Sci.*, 54:1212-1220.
- Laedem, C.A., Kalra, S.P. (1985). Effects of endogenous opioid peptides and opiates on LH and prolactin secretion. *Neuroendocrinol.*, 41:342-352.
- Leebaw, W.F., Lee, L.A., Woolf, P.D., (1978). Dopamine effect basal and augmented pituitary hormone secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47:480.
- Leibowitz, S.F., Jhanwar-Uniyal, M., Dvorkin, B., Makman, M.H. (1982). Distribution of alpha adrenergic, beta-adrenergic and dopaminergic receptors in discrete hypothalamic areas of the rat. *Brain. res.*, 233:97.
- Macdonald, R.D., Peters, J.L. and Deaver, D.R., 1990. Effect of naloxone on the secretion of LH in infantile and prepubertal Holstein bull calves. *J. Reprod. Fert.*, 89:51-57.
- Malven, P., (1986). Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 3:135-144.
- Martinez-de-la-Escalera, G., Gallo, F., Choi, A.L., Weiner, R.I., (1992) Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines; stimulation of GnRH release via D1-receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinol.*, 131:2965-71.
- Matteri, R.L., Moberg, G.P., (1985). The effect of opioid peptides on ovine pituitary gonadotropin secretion in vitro. *Peptides*, 6:957-963.
- Matthews, M.V., and Murdoch, W.J., (1984). Increased secretion of luteinizing hormone in prepubertal ewes treated with an antagonist of opiates. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 1:167-163.
- Mattioli, M., Conte, F., Seren, E., Galeati, G. (1986). Effect of naloxone on plasma concentrations of prolactin and LH in lactating sows. *J. Reprod. Fert.*, 76:167-173.
- Meyer, S.L., Goodman, R.L. (1985). Neurotransmitters involved in mediating the steroid dependent suppression of pulsatile LH secretion in anestrus ewes; effects of receptor antagonists. *Endocrinol.*, 116:2054-2161.
- Meyer, S.L., Goodman, L.R. (1986). Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in the anestrus ewe. *Biol. Reprod.*, 35:562-571.
- Miyachi, V., Meklenburg, R.S., Lipsett, M.B. (1973). In vitro studies of pituitary median eminence unit. *Endocrinol.*, 93:492-496.
- Moss, G.E., Adams, T.E., Niswender, G.D., Nett, T.M. (1980). Effect of parturition and suckling on concentration of pituitary gonadotrophins, hypothalamic GnRH and pituitary responsiveness to GnRH in ewes. *J. Anim. Sci.*, 50:496-502.
- Nett, T.M. (1987). Function of the hypothalamic-hypophysial axis during the post-partum period in ewes and cows. *J. Reprod. Fert.*, 34:201-213.
- Newton, G.R., Schillo, K.K. and Edgerton, L.A., (1988). Effects of naloxone on luteinizing hormone secretion in postpartum ewes. *Biol. Reprod.*, 39:532-535.
- Nunez, E.A., Gerson, M.D., Silverman, A. (1981). Uptake of 5-hydroxytryptamine by gonadotrophs of the bat's pituitary: a combined immunocytochemical radioautographic analysis. *J. Histochem. Cytochem.*, 29:1336-1346.
- Okrasa, S., Kalamaz, H. (1996) Involvement of opioid system in the control of LH secretion in sows. *Reprod. Dom. Anim.* 31:575-583.
- Panerai, A., Petraglia, F., Sacerdote, P., Genazzani, A.R. (1985). Mainly mu opiate receptors are involved in LH and prolactin secretion. *Endocrinol.*, 117:1096-1099.
- Paterson, S.J., Robson, L.E., Kosterlitz, H.W. (1983). Classification of opioid receptors. *British Medical Bulletin*, 39:31-36.
- Peters, A.R., Lammings, G.E., Fisher, M.W. (1981). A comparison of plasma LH concentrations in milked and suckling post-partum cows. *J. Reprod. Fert.*, 62:567-573.

- Pfeiffer, D.G., Pfeiffer, A., Shimahigashi, K., Merriam, G.R., Loriaux, D.L. (1983). Predominant involvement of mu rather than delta or kappa opiate receptors in LH secretion. *Peptides* 4:647-649.
- Prunier, A., Ellendorff, F. and Parvizi, N., (1990). Opioid action on luteinizing hormone secretion in newborn pigs: paradoxical effects of naloxone. *J. Develop. Physiol.*, 14:221-227.
- Ramirez, V.D., Feder, H.H., Ssolweyer, C.H. (1984). The role of brain catecholamines in the regulation of LH secretion: a critical inquiry. *Frontiers in Neuroendocrinol.*, 8:27-83.
- Rasmussen, D.D., Liu, J.H., Wolf, P.L., Yen, S.S.C. (1986). GnRH neurosecretion in the human hypothalamus. In vitro regulation by dopamine. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 62:479.
- Rawlings, N.C., Currie, W.D., Evans, A.C.O, Churchill, I.J. (1993). Opioid modulation of gonadotropin secretion in mature ewe during the breeding season and seasonal anestrus and in the prepubertal ram, bull, ewe and heifer. In: *Opioids in farm animals*, EDS N.Parvizi, pp. 77-98.
- Rojanasthien, S.A.M., Lundeheim, N., Einarsson, S. (1987). Luteinizing hormone response to different doses of synthetic gonadotrophin releasing hormone during early and late lactation in primiparous sows. *Anim. Reprod. Sci.*, 13:299-307.
- Rotsztein, W.H., Drouva, S.V., Pattou, E., Kordon, C. (1978a). Met-enkephalin inhibits in vitro dopamine-induced LHRH release from mediobasal hypothalamus of male rats. *Nature*, 274:281-283.
- Schillo, K.K. (1993). Possible roles of endogenous opioids in control of luteinizing hormone secretion in female ruminants. In: *Opioids in farm animals*, EDS N.Parvizi, pp. 1-14
- Schoors, D.F., Vauquelin, G.P., De Vos, H., Smet, G., Velkeiner, B., Vanhaaelst, L., Dupont, A.G. (1991). Identification of a D1 receptor, not linked to adenylyate cyclase, on lactotroph cells. *Br. J. Pharmacol.* 103:1928-1934.
- Sharp, B., Karson, B., Marrshak, D., Ross, R., George, R., Sowers, J., Yamada, T. (1982). *Life Sci.* 31:981-985.
- Sharp, D.C., Grumbach, W.R., and Wasserman, C., (1985). Effect of naloxone on gonadotrophin releasing hormone (GnRH) administration to anoestrous mares. *Biol. Reprod.*, 32: (suppl.1), abstr. 153.
- Short, R.E., Brooks, A.N., Peters, A.R. & Lamming, G.E. (1987) Opioid modulation of LH secretion during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.* 80,213-219.
- Sneider, H.P.G., McCann, S.M. (1970). Mono- and indolamines and control of LH secretion. *Endocrinol.*, 86:1127-1133.
- Sokoloff, P., Giros, B., Matres, M.P., Bouthenet, M.L., Schwartz, J.C. (1990). Molecular cloning and characterization of novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics., *Nature*, 347:146-151.
- Ssewanyana, E., Lincoln, G.A. (1990). Regulation of the photoperiod-induced cycle in the peripheral blood concentrations of beta-endorphin and prolactin in the ram: role of dopamine and endogenous opioids. *J. Endocrinol.*, 127:461-469.
- Sunahara, R.K., Guan, H., O'Dowd, B.F., Seeman, P., Laurier, L.G., George, S.R., Torchia, J., Van Tol, H.h., Niznik, H.B. (1991). Cloning of gene for human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350:614-619.
- Thomas, G.B., Pearse, D.T., Oldham, C.M., Martin, G.B., Lindsay, D.R. (1988). Effects of breed, ovarian steroids and season on the pulsatile secretion of LH in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fert.*, 84:313-324.
- Thorner, M., Besser, G.M., Jone, A., Dacie, J., Jones, A.E. (1975). Bromocriptine therapy of female infertility-a report of 13 pregnancies. *Br. Med. J.*, 4:649-651.
- Trout, W.E., and Malven, P.V., (1987). Effects of exogenous oestradiol-17 β and progesterone on naloxone-reversible inhibition of the release of luteinizing hormone in ewes. *J. Anim. Sci.*, 65:1602-1609.
- Trudeau, V.L., Pharazyn, A., Beltranena, E., Aherne, F.X. (1988). Naloxone elevates plasma follicle stimulating hormone but not luteinizing hormone levels in the immature male pig. *Can. J. Anim. Sci.*, 69:1095-1098.
- Trudeau, V.L., Meijer, J.C., van de Wiel, D.F.M., Bevers, M.M. and Erkens, J.H.F. (1989). Effects of morphine and naloxone on plasma levels of LH, FSH, prolactin and growth hormone in the immature male pig. *J. Endocrinol.*, 119:501-508.
- Uemura, H., Kobayashi, (1971). Effects of dopamine implanted in the median eminence on the oestrus cycle in the rat. *Endocrinol. Jap.*, 18:91-94.
- Unterwald, E.M., Horne-King, J., Kreek, M.J. (1992). Chronic cocaine alters brain mu opioid receptors. *Brain Research*, 582(1-2) 314-318.
- Weisner, J.B., Koening, J.I., Krulich, L., Moss, R.L. (1985). Possible delta receptor mediation of the effect of beta-endorphin in LH release, but not on prolactin release in the ovariectomized rat. *Endocrinol.*, 116:475.
- Whisnant, C.S. and Goodman, R.L. (1988). Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative feedback. *Biol. Reprod.*, 39:1032-1038.
- Whisnant, C.S., Kiser, R.E., Thompson, F.N. and Barb, C.R. (1986a). Naloxone infusion increases pulsatile luteinizing hormone release in postpartum beef cows. *Domest. Anim. Endocrin.* 3, 49-54.
- Whisnant, C.S., Kiser, R.E., Thompson, F.N. and Barb, C.R. (1986b). Opioid inhibition of LH secretion during the postpartum period in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 63, 1445-1448.
- Whisnant, C.S., Kiser, R.E., Thompson, F.N. and Barb, C.R. (1986c). Influence of calf removal on the serum luteinizing hormone response to naloxone in the postpartum beef cow. *J. Anim. Sci.* 63 (suppl.), 561.
- Witkin, J., Paden, C., Silverman, A. (1982). The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinol.*, 35:429-438.
- Yang, K., Haynes, N.B., Lamming, G.E. and Brooks, A.N., (1988). Ovarian steroid hormone involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion in mature ewes during the breeding and non-breeding seasons. *J. Reprod. Fert.*, 83:129-139.

MACRO- AND MICRO-MINERAL ELEMENTS OF THE MILK AND SIALIC ACID BOUND TO CASEIN AND TO WHEY PROTEINS IN NURSING MARES OF BARDIGIANO HORSE BREED⁽¹⁾⁽²⁾

F. Martuzzi, A. Summer, A.L. Catalano, P. Mariani⁽³⁾

(3) Istituto di Zootecnica Alimentazione e Nutrizione, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

(1) Research supported by M.U.R.S.T. (Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica)

(2) Communication presented at the 49th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Warsaw, Poland, August 24-27, 1998

Introduction

The Bardigiano Horse is bred prevalently in the Parma and Piacenza provinces (North Italy). Its numerical consistence is about 3500 head. It is an autochthonous equine population, formed during the centuries in the area of the high valleys of the Taro and Ceno rivers; it was exploited mainly for agricultural works, but also for meat production, in an area comprised in a territory in which the horse meat consumption is largely widespread. Recently the selection objectives, provided for at the Stud Book institution act (D.M. 2-8-1977), were partly modified with the aim to improve the breed by the production of higher at withers horses, more suitable for light draft and above all for riding (farm holidays), but also to improve zootechnical performance. The mare's rearing is of mixed type, stalled from November to April, and afterwards grazing with the foal till October. From this point of view, the maternal characteristics take great importance, referring to the satisfaction of the good growing capacities (1-1.1 kg/d in the first month of life) and to the maintenance of an optimal health state of the foal. Aim of this study was to complete the outline of the milk characteristics of the Bardigiano Horse (Mariani *et al.*, 1996), by the study of the macro- and micro-mineral composition and of the sialic acid content of the proteins, with reference to the important and specific plastic, biotrophic-nutritional and biological functions of such components (Ziegler, 1960; Manfredini, 1984; Carlson, 1985; Thatcher, 1991; Kawakami *et al.*, 1992; Glade, 1993; Beucher *et al.*, 1994; Magni, 1997).

Materials and methods

The study was carried out on 33 individual milk samples taken between the 5th and the 35th lactation day from the same number of mares, 17 of them of Bardigiano Horse breed (BH) and 16, used as a comparison, of Italian Saddle Horse breed (ISH). Milk was obtained by complete manual milking of one mammary gland (dx) in presence of the foal (sx), prevented from suckling by a muzzle in the two hours before. On average 256.8± 68.1 ml of milk from the BH mares and 305.6± 97.4 ml from the ISH mares were collected. The Bardigiano Horse mares, from 7 stud farms in the Parma province, with live weight 420± 500 kg and 3± 22 years old (1± 16 parities), were fed with mixed hay *ad libitum* (10-11 kg) and with 1-1.5 kg of oats. The Italian Saddle Horse mares, from 5 stud farms in the Parma and Cremona provinces, live weight 500± 600 kg and 3± 20 years old (1± 14 parities), were fed with permanent meadow hay and lucerne hay *ad libitum* (10-13 kg) and with 4-5 kg of commercial concentrate with 16% crude protein on dry matter.

On each individual milk sample the following analytical determinations were done: a) *Ca, K, Na, Zn, Fe and Cu* by AAS (Anon., 1982), working on dry ash in muffle at 530° C and taken again with HCl; b) *phosphorus (P)*, by colorimetry according to Allen (1940); c) *sialic acid* (N-acetylneuraminic acid as standard) by colorimetry with thiobarbituric acid – on total protein precipitated with 12% TCA and on isoelectric casein treated with 0.1 N H₂SO₄ for 45 min at 80 °C (Marier *et al.*, 1963) - according to Aminoff (1961); d) *total nitrogen (TN)*, *noncasein nitrogen (NCN)* and *nonprotein nitrogen (NPN)*, respectively on milk, acid whey at pH 4.6 and 12% TCA filtrate of milk, by means of Kjeldahl according to Aschaffenburg and Drewry (1959); from which: casein N (TN – NCN), casein (casein N x 6.38) and true whey protein N (NCN – NPN); e) *somatic cells* (Schmidt Madsen, 1975) by means of a Foss-o-Matic 250 apparatus.

Statistical significance of the differences between mean values of the two horse breeds was analysed by ANOVA after control (Bartlett test) of variance homogeneity (Statgraphics, 1993).

Results and discussion

The data of macro- and micro-mineral composition and sialic acid content of proteins in the milk from mares of Bardigiano Horse (BH) and Italian Saddle Horse (ISH)

breeds are shown in table 1 and 2 respectively.

Table 1 - Macro- and micro- mineral elements content in the milk from mares of Bardigiano Horse and Italian Saddle Horse breeds. (Means±SD)

		Bardigiano Horse (BH)		Italian Saddle Horse (ISH)		Differences (BH-ISH)	
Mares	no.	17		16			
Parities	no.	4.1	± 4.1	6.9	± 5.5	- 2.8	NS
Lactation days	d	20.0	± 8.3	21.8	± 9.2	- 1.8	NS
Calcium	ppm	1220	± 240	1155	± 128	+ 65	NS
Phosphorus	ppm	668	± 138	678	± 80	- 10	NS
Casein P / Casein ⁽¹⁾	%	0.78	± 0.10	0.80	± 0.06	- 0.02	NS
Potassium	ppm	662	± 153	573	± 116	+ 89	*
Sodium	ppm	198	± 46	167	± 51	+ 31	*
Ca : P	—	1.83	± 0.21	1.70	± 0.15	+ 0.13	*
K : Na	—	3.34	± 1.10	3.43	± 0.95	- 0.09	NS
Zinc	ppm	2.79	± 0.50	2.95	± 0.57	- 0.16	NS
Iron	ppm	1.06	± 0.51	1.47	± 0.64	- 0.41	*
Copper	ppm	1.06	± 0.30	0.73	± 0.41	+ 0.33	*

⁽¹⁾ P casein: phosphorus esterified to casein determined on isoelectric casein (pH 4.6).

NS, not significant (P>0.05); *, P≤0.05.

Table 2 - Sialic acid bound to casein and to true whey protein in the milk from mares of Bardigiano Horse and Italian Saddle Horse breeds. (Means±SD)

		Bardigiano Horse (BH)		Italian Saddle Horse (ISH)		Differences (BH-ISH)
Mares	no.	17		16		
Somatic cells	log / ml	4.440	± 0.399	4.356	± 0.392	+ 0.084 NS
I) <i>Sialic acid / Milk:</i>						
from total protein	ppm	45.44	± 9.75	44.36	± 5.72	+ 1.08 NS
from casein	ppm	28.42	± 7.48	29.19	± 5.35	- 0.77 NS
from whey protein	ppm	17.02	± 9.11	15.17	± 7.24	+ 1.85 NS
II) <i>Sialic acid / Protein:</i>						
on total protein	%	0.21	± 0.03	0.22	± 0.03	- 0.01 NS
on casein	%	0.23	± 0.06	0.24	± 0.06	- 0.01 NS
on whey protein	%	0.18	± 0.08	0.19	± 0.08	- 0.01 NS

NS, not significant (P>0.05).

a) *Macro- and micro-mineral composition* – The ash content, equal to 0.498± 0.096% for the Bardigiano Horse and to 0.502± 0.066% for the Italian Saddle Horse (P>0.05), results in accordance with the values found for the milk of the beginning of the lactation from other horse breeds by several Authors: 0.48% for Dutch Warm-blooded Saddle Horse (Bowman & Van der Schee, 1978); 0.51% for Quarter Horse and Arabian (Ullrey *et al.*, 1966); 0.53% for Thoroughbred (Schryver *et al.*, 1986). Instead Baucus *et al.* (1989), for the milk of "Light" Horse and Csapò-Kiss *et al.* (1995) for the milk of Hungarian Draught, Haflinger, Breton, and Boulonnais, find significantly lower values, equal to 0.43% and to 0.41% respectively.

The Bardigiano Horse milk results richer of calcium (ppm 1220 BH vs 1155 ISH; P>0.05) and slightly less supplied with phosphorus (ppm 668 BH vs 678 ISH; P>0.05) in comparison to the milk of the Italian Saddle Horse (Table 1). Also the isoelectric casein of the Bardigiano, separated at pH 4.6, contains a slightly lesser quantity of esterified phosphorus (0.78% BH vs 0.80% ISH; P>0.05), in comparison to that of the Italian Saddle Horse. Consequently, the value of the Ca : P ratio results on average higher for the Bardigiano Horse milk (1.83 BH vs 1.70 ISH; P<0.05).

The calcium value of the Bardigiano milk results comparable with the values found by Ullrey *et al.*, 1966 (1210 ppm for Quarter Horse and Arabian), Bowman & Van der Schee, 1978 (1240 ppm for Dutch Warm-blooded Saddle Horse) and Schryver *et al.*, 1986 (1220 ppm for Thoroughbred).

Instead Doreau *et al.* (1992) for the heavy breeds Breton and Comtois (1440 ppm) and Baucus *et al.*, (1989) for light breeds (900 ppm) observe calcium values much higher and much lower, respectively, as shown in brackets. The phosphorus value of the Bardigiano results lower comparing to the values found for Thoroughbred (800 ppm) (Schryver *et al.*, 1986) and for Dutch Saddle Horse (770 ppm) (Smolders *et al.*, 1990) and definitely higher comparing to the values (400; 440; 500 ppm) observed for other breeds (Quarter Horse and Arabian; Breton and Comtois; "Light" Horse) by other Authors (Ullrey *et al.*, 1966; Doreau *et al.*, 1990; Baucus *et al.*, 1989) respectively. The milk of the Bardigiano Horse contains 16% more potassium (ppm 662 BH vs 573 ISH; P = 0.05) and 19% more sodium (ppm 198 BH vs 167 ISH; P = 0.05), comparing to that of the Italian Saddle Horse; while the values of the K : Na ratio differ moderately (3.34 BH vs 3.43 ISH; P>0.05). The potassium value of the milk of Bardigiano Horse, always with reference to the first lactation month, is in fair accordance with those found for other breeds by Neseni *et al.* (1958), Ullrey *et al.* (1966), Schryver *et al.* (1986) and Doreau *et al.* (1992); while Baucus *et al.* (1989) and Csapò-Kiss *et al.* (1995) report values much higher (900 ppm) and much lower (520 ppm), respectively. With the same Authors there is full concordance regarding the sodium content, except in one case (110 ppm, by Doreau *et al.*, 1992). Very low values of sodium (and of potassium) are reported also by Orlandi *et al.* (1992) for mares of Franches Montagnes breed, regarding the milk of the first lactation week. The milk of Bardigiano Horse contains significantly lower quantities of iron and higher of copper comparing to the milk of Italian Saddle Horse; while the zinc values are quite similar (Table 1). The zinc values are very close to those found by Ullrey *et al.* (1974), Schryver *et al.* (1986) and Baucus *et al.* (1988), while Breedveld *et al.* (1988) and Csapò-Kiss *et al.* (1995) report lower values. Greater discordance results for the other two trace elements.

b) *Sialic acid of casein and of whey proteins*. – The Bardigiano Horse milk contains a significant higher quantity of true whey protein ($0.93 \pm 0.17\%$ BH vs $0.81 \pm 0.09\%$ ISH; $P < 0.05$) comparing to that of the Italian Saddle Horse, while its casein content is just slightly lower ($1.25 \pm 0.22\%$ BH vs $1.27 \pm 0.19\%$ ISH; $P > 0.05$); consequently the Bardigiano milk results altogether richer of true protein ($2.18 \pm 0.35\%$ BH vs $2.08 \pm 0.28\%$ ISH; $P > 0.05$). This outline affects the sialic acid values, even if moderately, because all differences result not significant (Table 2). The Bardigiano Horse milk, for the quota bound to total protein, presents a sialic acid content slightly higher (ppm 45.4 BH vs 44.4 ISH) than that of the Italian Saddle Horse. This is due to the higher contribution (ppm 17.0 BH vs 15.2 ISH) of the whey protein, partially counterbalanced by the lower contribution (ppm 28.4 BH vs 29.2 ISH) of the casein. About 2/3 of the sialic acid are bound to casein. The Bardigiano casein contains less sialic acid (0.23% BH vs 0.24% ISH) comparing to that of the Italian Saddle. Those values result sensibly lower comparing to those observed in parallel by Mariani *et al.* (1996) for bovine milk (about 0.39% for casein of Italian Brown cows), very likely due to the different content of k-casein or to the different degree of glycosylation of the micellar system of the two species (Kotts & Jenness, 1976; Ono *et al.*, 1989). The sialic acid values of this study are according to those found by Morrissey (1973), on average equal to 47 ppm (*min.* 28 and *max.* 94), but characterised by a lower variability (*min.* 31 and *max.* 77 for BH; *min.* 36 and *max.* 54 for ISH). There is concordance with Morrissey (1973) also for the sialic acid content of casein (0.25%). Kulisa (1977) and (1986) finds, instead, on average higher values; with significant differences among the examined breeds: Arab (51 ppm), Malopolski (57 ppm) and Hutsul (52 ppm). The values reported by Brzeski and Kulisa (1979), always referring to the milk of mares from Arab breed, are slightly higher (61 ppm).

Conclusions

The milk from mares of Bardigiano Horse breed, even though presenting the same ash content of the milk from Italian Saddle Horse, tends to differentiate with regard to some macro- and micro-mineral components; while the two milks don't differ for the sialic acid content of casein and of whey proteins. The higher calcium, sodium and potassium content of the milk from the Bardigiano Horse doesn't appear bound to the probable lower milk production, comparing to that of the Italian Saddle, as the higher phosphorus content of the last one shows, therefore this has to be considered, within certain limits, a characteristic of the indigenous breed. From this point of view, also the different outline of the micro-mineral components, even if more strictly bound to feeding, appears as a general information which tends to characterise the typology of the Bardigiano Horse rearing.

Keywords: Bardigiano Horse, nursing mare, milk composition, mineral elements, sialic acid.

Parole chiave: Cavallo Bardigiano, cavalla nutrice, composizione del latte, elementi minerali, acido sialico.

Summary - The main mineral constituents and the sialic acid in the milk of Bardigiano Horse mares were studied for the first time. 33 individual milks were taken between the 5th and the 35th *post partum* day, from 17 Bardigiano Horse (BH) and, as comparison, from 16 Italian Saddle Horse (ISH) nursing mares. The BH mares, weighing 420+ 500 kg, 3+ 22 years old (1+ 16 parities), were fed with hay *ad libitum* and 1-1.5 kg of oats. Milk was taken by total manual milking of one gland, while the foal was suckling the other. Ca, K, Na, Zn, Fe and Cu were determined by AAS; P according to Allen (1940); sialic acid by colorimetry according to Aminoff (1961). Data were analysed by ANOVA. For the mineral elements content (ppm) the following values (mean±SD) were observed, for BH and ISH respectively: Ca 1220±240 vs 1155±128; P 668±138 vs 678±80; K 662±153 vs 573±116 ($P=0.05$); Na 198±46 vs 167±51 ($P=0.05$); Zn 2.79±0.50 vs 2.95±0.57; Fe 1.06±0.51 vs 1.47±0.64 ($P < 0.05$); Cu 1.06±0.30 vs 0.73±0.41 ($P < 0.05$). Sialic acid content in the milk (ppm), for the quota bound to the total protein, results slightly higher in the BH than in the ISH (45 ± 10 vs 44 ± 6) because richer of true whey protein ($0.93 \pm 0.17\%$ vs $0.81 \pm 0.09\%$; $P < 0.05$). About 2/3 of sialic acid are bound to casein. The sialic acid content of casein ($0.23 \pm 0.06\%$ BH vs $0.24 \pm 0.06\%$ ISH) results definitely lower than that of cow milk.

RIASSUNTO - *Macro- e micro-elementi minerali del latte e acido sialico della caseina e delle sieroproteine in giumente di razza Cavallo Bardigiano*. L'obiettivo è stato di studiare per la prima volta i principali costituenti minerali e l'acido sialico del latte del Cavallo Bardigiano. Sono stati analizzati 33 lattini individuali prelevati tra il 5° ed il 35° giorno *post-partum* da altrettante cavalle nutrici: 17 Cavallo Bardigiano (BH) e 16 Cavallo Sella Italiano (ISH), come confronto. Le giumente di razza Cavallo Bardigiano, del peso vivo di 420+ 500 kg e di 3+ 22 anni di età (1+ 16 parti), erano alimentate con fieno *ad libitum* e 1-1.5 kg di avena. Il latte è stato munto mediante mungitura manuale completa di una ghiandola, mentre il puledro succhiava dall'altra. Ca, K, Na, Zn, Fe e Cu sono stati determinati mediante assorbimento atomico; il P per via colorimetrica e l'acido sialico secondo Aminoff (1961). I dati sono stati analizzati mediante ANOVA. Per il contenuto in macro-elementi (ppm) sono stati osservati i seguenti valori medi (±DS), rispettivamente per Cavallo Bardigiano e Cavallo Sella Italiano: Ca 1220±240 vs 1155±128; P 668±138 vs 678±80; K 662±153 vs 573±116 ($P=0.05$); Na 198±46 vs 167±51 ($P=0.05$); Zn 2.79±0.50 vs 2.95±0.57; Fe 1.06±0.51 vs 1.47±0.64 ($P < 0.05$); Cu 1.06±0.30 vs 0.73±0.41 ($P < 0.05$). Il contenuto di acido sialico (ppm) del latte, per la quota legata alla proteina totale, è risultato leggermente più elevato nel Cavallo Bardigiano (45 ± 10 vs 44 ± 6) in quanto più ricco di sieroproteina vera ($0.93 \pm 0.17\%$ vs $0.81 \pm 0.09\%$; $P < 0.05$) rispetto al Cavallo Sella Italiano. I 2/3 circa dell'acido sialico risultano legati alla caseina. Il contenuto di acido sialico delle caseine di cavalla ($0.23 \pm 0.06\%$ BH vs $0.24 \pm 0.06\%$ ISH) è nettamente inferiore rispetto a quello del latte di vacca.

References

- Allen R.J.L. (1940). The estimation of phosphorus. *Biochem. J.* **34**, 858-865.
- Aminoff D. (1961). Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoides. *Biochem. J.* **81**, 384-392.
- Anon. (1982). Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co GmbH, Ueberlingen, Germany.
- Aschaffenburg R., Drewry J. (1959). New procedures for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. XVth Int. Dairy Congr. **3**, 1631-1637.
- Baucus K.L., Ralston S.L., Rich G.A., Squires E.L. (1989). The effect of copper and zinc supplementation on mineral content of mares' milk. *J. Equine Vet. Sci.* **9**(4), 206-209.
- Beucher S., Lavenez F., Yvon M., Corring T. (1994). Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *J. Nutr. Biochem.* **5**(12), 578-584.
- Bouwman H., Van der Schee W. (1978). Composition and production of milk from Dutch warmblooded saddle horse mares. *Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtermittelkde* **40**, 39-53.
- Breedveld L., Jackson S.G., Baker J.P. (1988). The determination of a relationship between the copper, zinc and selenium levels in mares and those in their foals. *Equine Vet. Sci.* **8**(5), 378-382.
- Brzeski E., Kulisa M. (1979). Levels of N-acetylneuraminic acid and fat in milk of Arab mares. *Roczniki-Naukowe-Zootechniki*, **6**(1), 29-35.
- Carlson S.E. (1985). N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *American J. Clinical Nutr.* **41**(4), 720-726.
- Csapò-Kiss Z., Stefler J., Martin T.G., Makray S., Csapò J. (1995). Composition of mares' colostrum and milk: protein content, amino acid composition and contents of macro- and micro- elements. *Int. Dairy J.* **5**, 403-415.
- Doreau M., Boulot S., Bauchart D., Barlet J.P., Martin Rosset W. (1992). Voluntary intake, milk production and plasma metabolites in nursing mares fed two different diets. *J. Nutr.* **122**, 992-999.
- Doreau M., Boulot S., Barlet J.P., Patureau-Mirand P. (1990). Yield and composition of milk from lactating mares: effect of lactation stage and individual differences. *J. Dairy Res.* **57**, 449-454.
- Glade M.J. (1993). Effects of gestation, lactation, and maternal calcium intake on mechanical strength of equine bone. *J. Am. Coll. Nutr.* **12**(4), 372-377.
- Kawakami H., Kawasaki Y., Dosako S., Tanimoto M., Nakajima I. (1992). Determination of k-casein glycomacropeptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic acid pretreatment. *Milchwissenschaft* **47**, 688-693.
- Kotts C., Jenness P. (1976). Isolation of k-casein-like proteins from milks of various species. *J. Dairy Sci.* **59**, 816-822.
- Kulisa M. (1977). The composition of mare milk in three horse breeds with reference to N-acetylneuraminic acid. *Acta Agraria et Silvestria - Zootechnica* **17**(1-2), 25-37.
- Kulisa M. (1986). Selected amino acids, fatty acids and N-acetylneuraminic acid in mare milk. 37th Annual Meeting of the E. A.A.P., Budapest. Vol. **2**, 310-311.
- Magni L. (1997). L'alimentazione del puledro. *Obiettivi e Doc. Vet.* **17**(6), 27-31.
- Manfredini M. (1984). Fabbisogni minerali e vitaminici del cavallo. *Zoot. Nutr. Anim.* **10**, 381-395.
- Mariani P., Martuzzi F., Summer A., Pagani G.P., Catalano A.L. (1996). Principali caratteristiche e ripartizione delle frazioni azotate del latte nelle razze cavallo Bardigiano e Cavallo Sella Italiano: rilievi sul latte del primo mese di lattazione. *Atti Soc. It. Sci. Vet.* **50**, 499-500.
- Mariani P., Summer A., Rando A., Fossa E., Serventi P. (1996). N-acetylneuraminic acid content of casein in Italian Brown cows with different genotypes at the k-casein *locus*. *Ann. Fac. Med. Vet. Univ. Parma* **16**, 83-95.
- Marier J.R., Tessier H., Rose D. (1963). Sialic acid as an index of the k-casein content of bovine skim milk. *J. Dairy Sci.* **46**, 373-379.
- Morrissey P.A. (1973). The N-acetyl neuraminic-acid content of the milk of various species. *J. Dairy Res.* **40**, 421-425.
- Nesen R., Flade E., Heidler G., Steger H. (1958). Yield and composition of mare's milk in the course of lactation. *Arch. Tierzucht* **1**, 91-129.
- Ono T., Khono H., Odagiri S., Takagi T. (1989). Subunit components of casein micelles from bovine, ovine, caprine and equine milks. *J. Dairy Res.* **56**, 61-68.
- Orlandi M., Colombani B., Gatta D., Liponi G.B., Campodoni G. (1992). Evoluzione della composizione chimica del colostro di cavalla: nota preliminare. *Atti Soc. It. Sci. Vet.* **46**, 1679-1683.
- Schmidt Madsen P. (1975). Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk. *J. Dairy Res.*, **42**, 227-239.
- Schryver H.F., Oftedal O.T., Williams J., Soderholm L.V., Hintz H.F. (1986). Lactation in the horse: the mineral composition of mare milk. *J. Nutr.* **116**, 2142-2147.
- Smolders E.A.A., Van der Veen N.G., Van Polanen A. (1990). Composition of horse milk during the suckling period. *Livest. Prod. Sci.* **25**, 163-171.
- Statgraphics (1993). Statistical graphics system by statistical graphics corporation. Ref. manual; version 7 for DOS. Manugistics Inc., Rockville Maryland USA.
- Thatcher C.D. (1991). Nutritional aspects of developmental orthopedic disease in growing horses. *Vet. Medicine* **7**, 743-747.
- Ullrey D.E., Struthers R.D., Hendricks D.G., Brent B.E. (1966). Composition of mare's milk. *J. Anim. Sci.* **25**, 217-222.
- Ullrey D.E., Ely W.T., Covert R.L. (1974). Iron, zinc and copper in mare's milk. *J. Anim. Sci.* **38**, 1276-1277.
- Ziegler E. (1960). Betrachtungen über die ernährungsphysiologische Bedeutung der Milchsaccharide. *Helvetica Paediatrica Acta* **15**, 552-565.

ANDAMENTO MENSILE DELLE PRINCIPALI CARATTERISTICHE DI COAGULAZIONE DEL LATTE DI SINGOLI ALLEVAMENTI DI VACCHE DI RAZZA FRISONA CON PARTICOLARE RIGUARDO ALLA VELOCITÀ DI FORMAZIONE DEL COAGULO⁽¹⁾

P. Mariani ⁽²⁾, A. Summer ⁽²⁾, P. Formaggioni ⁽²⁾, A. Beltrami ⁽²⁾, S. Sandri⁽³⁾

⁽²⁾ *Istituto di Zootecnica Alimentazione e Nutrizione, Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma.*

⁽³⁾ *Centro Lattiero Caseario, via Torelli 17, 43100 Parma.*

⁽¹⁾ Lavoro eseguito nell'ambito del programma di sperimentazione della regione Emilia-Romagna, con il coordinamento tecnico-organizzativo del Centro Ricerche Produzioni Animali di Reggio Emilia.

Introduzione

La qualità tecnologica del latte assume un ruolo fondamentale nella produzione dei formaggi a pasta cotta, dura, a lungo periodo di maturazione. Nella coagulazione mista, lattico-presamica, a carattere prevalentemente enzimatico, il complesso micellare del latte tende a mantenere inalterate le sue proprietà, da cui dipendono buona parte delle caratteristiche reologiche della cagliata, la contrattilità della massa caseosa e il rendimento della trasformazione casearia.

Nella produzione di formaggi di particolare pregio, come ad esempio il Parmigiano-Reggiano, il cui processo di caseificazione, con implicazioni enzimatiche, fisico-chimiche e fisico-meccaniche, consiste essenzialmente nella formazione e nella disidratazione di una cagliata lattico-presamica, il requisito basilare è senza alcun dubbio rappresentato dall'attitudine precipua del latte alla coagulazione. Il latte utilizzato in queste trasformazioni deve essere dotato di peculiari caratteristiche chimico-fisiche e strutturali, perfettamente collimanti con quelle pregevoli ed uniche che contraddistinguono il prodotto finito.

La velocità di formazione del coagulo rappresenta un parametro basilare nella valutazione della qualità tecnologico-casearia del latte; essa manifesta rapporti abbastanza stretti con il tempo di coagulazione e con la consistenza del coagulo, parametri, a loro volta, molto importanti ai fini della valutazione del comportamento reologico della cagliata nel corso della caseificazione. L'attitudine del latte alla coagulazione presamica, nel suo complesso, è influenzata, in particolare, da fattori patologici, genetici e fisiologici propriamente detti, legati allo stadio di lattazione e all'età della vacca. Tuttavia, il problema della diffusione dei lattii ipoacidi e soprattutto le difficoltà stagionali che interessano la produzione di alcuni formaggi tipici suggeriscono che il fenomeno è più vasto e che la rosa dei fattori si allarga a comprenderne altri, di natura prevalentemente ambientale.

La stagione, in senso lato, in effetti, è in grado di esercitare un'influenza significativa su diversi costituenti organici e inorganici del latte (1-5), le cui modificazioni si riflettono sul comportamento tecnologico in diversi processi di trasformazione (6-11). Le variazioni chimico-fisiche, soprattutto quelle che interessano il sistema micellare, i sali minerali e l'acidità, si ripercuotono direttamente sulle proprietà tecnologico-casearie del latte (12-14) ed acquistano un significato del tutto particolare nei riguardi delle produzioni casearie (15-19), specie se contraddistinte da peculiari requisiti qualitativi (20, 21).

Le variazioni stagionali sono dovute, principalmente, all'influenza combinata di diversi fattori di ordine fisiologico, alimentare e climatico che nel corso dell'anno interagiscono con intensità variabile (6, 8, 15, 22-26). Le condizioni climatiche, dato il notevole sforzo metabolico che caratterizza la produzione, possono svolgere un ruolo di un certo rilievo (4, 13, 27-30) nel determinismo della qualità tecnologica del latte, specie con riferimento alle frequenti situazioni ambientali particolarmente sfavorevoli (caldo-umido) che contraddistinguono il periodo estivo (31).

Lo scopo della ricerca è stato quello di studiare, a livello di campioni di latte di massa di singoli allevamenti bovini di razza Frisona, l'andamento mensile della velocità di formazione del coagulo in rapporto alle variazioni stagionali di composizione e delle proprietà fisico-chimiche del latte.

Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta su campioni di latte di massa di singoli allevamenti di vacche di razza Frisona della provincia di Parma. È stato analizzato il latte di 20 aziende conferenti di 3 caseifici produttori di Parmigiano-Reggiano, dislocati sul territorio di altrettanti comuni della media e bassa pianura. Il latte di ciascun allevamento è stato prelevato con cadenza mensile da gennaio a dicembre. La consistenza degli allevamenti varia tra 6 e 135 vacche in lattazione (46.5 ± 36.1), in parte mantenute in stabulazione fissa (14 allevamenti) e in parte libera (6 allevamenti). La produzione media di latte dei singoli allevamenti varia tra 4.200 e 7.800 kg per vacca (5.770 ± 1.102), mediamente più elevata nella stabulazione libera (6.683 ± 875 kg) rispetto alla fissa (5.379 ± 964 kg). In 10 allevamenti di piccola dimensione (fino a 25 vacche in lattazione; 16.4 ± 7.8) la produzione media di latte varia tra 4.200 e 5.700 kg per vacca (4.880 ± 484); mentre nei 10 di media dimensione (76.5 ± 26.2 vacche), di cui 6 a stabulazione libera, la produzione oscilla tra 5.500 e 7.800 kg per vacca (6.600 ± 753).

Sui 240 campioni di latte di massa, rappresentativi della produzione della mungitura del mattino di ciascun allevamento, addizionati di sodio mertiolato (0.02% w/v), sono state effettuate le seguenti determinazioni:

- acidità per titolazione di 50 ml di latte con idrossido di sodio 0.25N (32);

- parametri lattodinamografici, secondo Annibaldi et al. (33), con Formagraph, operando a 35°C su 10 ml di latte addizionato di 0.2 ml di una soluzione di caglio (1:19.000) diluito 1:100 con tampone acetato (pH

5.5); t = tempo di coagulazione; k_{20} = velocità di formazione o tempo di rassodamento del coagulo; a_{30} =consistenza del coagulo misurata a 30 min dall'aggiunta del caglio; il tracciato è stato misurato fino a 45 min, anche al fine di rilevare la consistenza (a) del coagulo aggiustata per il tempo di coagulazione ($1/2t$) (34);

- N totale e N non caseinico, rispettivamente, su latte e su siero acido a pH 4,6 mediante Kjeldahl, secondo Aschaffenburg e Drewry (35); da cui: N caseina (N totale - N non caseinico), caseina (N caseina \times 6.38) e indice di caseina (N caseina \times 100/N totale);

- N urea, su filtrato TCA 12% del latte, per via colorimetrica con aldeide 4-dimetilamminobenzoica (36, 37);

- grasso e lattosio, mediante letture nel medio infrarosso IR (38), con Milko-Scan 134 A/B;

- ceneri, mediante incenerimento di 20 ml di latte e calcinazione in muffola a 530°C (39);

- fosforo, per via colorimetrica secondo le indicazioni riportate da Allen (40): ossidazione del latte con acido perclorico e reazione con ammonio-molibdato in presenza di 2-4 diammino-fenolo bicloridrato;

- cloruri, Cl⁻, secondo Charpentier-Volhard: defecazione con acetato di zinco e ferrocianuro di potassio, acidificazione nitrica e rititolazione del nitrato di argento con solfocianuro di ammonio 0.1 N (39):

- cellule somatiche (41) con apparecchio Fossomatic 250.

La significatività statistica delle differenze tra i valori medi mensili delle caratteristiche è stata saggiata mediante analisi della varianza con verifica (test di Bartlett) della omogeneità delle varianze (42).

Risultati e discussione

I risultati sono riportati nelle tabelle 1-5 e in parte illustrati nelle figure 1 e 2. I dati riguardanti la "velocità" di formazione o tempo di rassodamento del coagulo sono raccolti in quattro distinte tabelle, precisamente nella tabella 1 le medie mensili di 20 allevamenti, nella tabella 3 le medie annue dei singoli allevamenti e nelle tabelle 4 e 5 i valori mensili degli allevamenti di piccola e di media dimensione.

1) *Valori mensili della velocità di formazione del coagulo.* - I valori medi del tempo di coagulazione del latte variano significativamente ($P < 0.01$), ma in misura moderata nel corso dell'anno (Tab. 1). Essi oscillano tra un minimo di 17.7 min di aprile ed un massimo di 20.7 min di settembre, del 17% più elevato rispetto al primo. L'andamento della caratteristica risulta piuttosto irregolare (Fig. 1). Tuttavia, dall'analisi dell'insieme dei dati si trae l'indicazione che il latte prodotto durante il periodo estivo tende a coagulare più lentamente (20.0 min) rispetto sia a quello di produzione invernale e primaverile (19.3 min) che a quello autunnale (19.4 min).

Molto più importanti ($P < 0.0001$) risultano le variazioni che interessano la capacità di aggregazione delle micelle di para-caseina, ovvero la cosiddetta "velocità" di formazione del coagulo, espressa dal parametro k_{20} , tecnicamente denominato tempo di rassodamento (= tempo necessario per ottenere un coagulo di "consistenza" pari a 20 mm), corrispondente al valore preso a riferimento in caseificio per l'avvio della frantumazione o rottura della cagliata. I valori medi mensili del tempo di rassodamento variano da un minimo di 7.3 min, corrispondente al mese di gennaio, ad un massimo di 14.9 min di luglio, valore più elevato del 104% circa (Tab. 1). L'andamento della caratteristica appare sufficientemente regolare (Fig. 1).

Il latte dei mesi invernali fornisce un coagulo che tende a rassodare più velocemente (8.5 min) rispetto a quello dei mesi primaverili (9.8 min) ed autunnali (10.8 min), mentre il latte prodotto durante il periodo estivo, nei mesi di luglio, agosto e settembre, si caratterizza per avere tempi di rassodamento eccessivamente lunghi (13.8 min), tali da risultare anomali, specie in corrispondenza dei mesi di luglio e agosto (Fig. 1). Il latte prodotto in luglio, pur essendo contraddistinto da un tempo di coagulazione leggermente migliore rispetto al valore medio annuo (Tab. 1), dà origine ad un coagulo che si caratterizza per avere il peggiore tempo di rassodamento (Fig. 1).

Sotto questo profilo, in effetti, il comportamento reologico del latte prodotto durante i tre mesi estivi fa registrare una ulteriore anomalia, in quanto i parametri t e k_{20} appaiono tra loro correlati negativamente (Fig. 1), al contrario di quanto si verifica normalmente (43).

L'andamento del tempo di rassodamento si ripercuote in misura marcata sulla consistenza del coagulo. I valori medi mensili della consistenza del coagulo, misurati a 30 min dall'aggiunta del caglio, variano in maniera statisticamente significativa nel corso dell'anno (Tab. 1). Essi oscillano tra un minimo di 16.9 mm (agosto) ed un massimo di 27.8 mm (gennaio), con una differenza del 64% circa a favore di quest'ultimo. L'andamento della caratteristica appare sufficientemente regolare (Fig. 1). Il latte prodotto durante i mesi invernali fornisce coaguli dotati di una discreta consistenza (25.1 mm), di poco superiore a quella dei lattini di produzione primaverile (22.9 mm) e autunnale (22.4 mm), mentre il latte del periodo estivo si caratterizza per dare coaguli sistematicamente più deboli (17.2 mm), provvisti di scarsa consistenza, probabilmente ai limiti della idoneità per la trasformazione in Parmigiano-Reggiano. I valori medi di luglio (17.5), agosto (16.9) e settembre (17.3) si collocano tutti e tre decisamente al di sotto del valore medio annuo di 21.9 mm (Tab. 1).

Le anomalie reologiche del latte prodotto durante i mesi caldi si registrano in misura importante anche a livello dei valori " $a_{1/2t}$ " cioè della consistenza del coagulo misurata a parità di condizioni per quanto riguarda il tempo di coagulazione. I valori di questa caratteristica (Tab. 1; Fig. 1), svincolati dal tempo di coagulazione, dovrebbero sostanzialmente risultare legati ai contenuti di caseina e di fosfato di calcio colloidale del latte, le due variabili maggiormente e più direttamente coinvolte nel determinismo della stessa. Tuttavia, il forte calo dei valori di consistenza " $a_{1/2t}$ " dei coaguli ottenuti dal latte di produzione estiva, comparativamente ai valori di a_{30} , anche alla luce di tali considerazioni, resta di difficile interpretazione (Fig. 1).

2) *Rapporti con le caratteristiche di base e la composizione azotata e minerale del latte.* - I valori medi mensili delle principali caratteristiche del latte (Tab. 2) si modificano in maniera statisticamente significativa nel corso dell'anno. L'acidità titolabile (3.10 mag vs 3.34 gen; °SH/50) e i contenuti di grasso (3.42% lug vs 3.77% dic), di proteina (2.97% mar vs 3.22% nov) e di lattosio (4.96% set vs 5.11% ott) variano significativamente ($P < 0.0001$) entro i limiti minimo e massimo indicati. Variano significativamente anche i contenuti medi mensili delle due principali componenti azotate, precisamente caseina (2.32% mar e lug vs 2.50% nov) e sieroproteina (0.65% mar vs 0.72% ott e nov); conseguentemente varia anche l'indice di caseina (76.85% lug vs 78.17% gen).

Per quanto riguarda i costituenti minerali si modificano significativamente i valori delle ceneri (0.712% lug e ago vs 0.732% nov) e dei cloruri, espressi come ioni cloro (102.2 feb vs 109.0 set; mg/100g); mentre le variazioni del fosforo, pur essendo più che apprezzabili (83.6 giu vs 87.3 ott; mg/100g), non raggiungono la significatività statistica. Lo stesso vale per il contenuto di cellule somatiche, espresse come unità per ml di latte (244.300 gen vs 388.100 dic).

L'andamento dei valori medi mensili della maggior parte delle caratteristiche appare abbastanza irregolare (Tab. 2). Tuttavia, l'analisi delle variazioni stagionali consente di mettere in evidenza alcune indicazioni utili circa i possibili rapporti con l'andamento delle caratteristiche di coagulazione del latte (Fig. 1).

Le variazioni stagionali del tempo di rassodamento trovano una discreta rispondenza in quelle che interessano il contenuto di lattosio e, soprattutto, di cloruri, entrambe mutate dalle variazioni del contenuto di cellule somatiche del latte (Tab. 2). In effetti, il latte prodotto durante il periodo estivo (E), in particolare nei mesi di luglio e agosto, rispetto a quello primaverile (P), tende ad essere più provvisto di cellule somatiche (321.000 E vs 298.000 P; unità per ml) e, per associazione, chimicamente più povero di lattosio (4.98% E vs 5.07% P) e più ricco di ioni cloro (107.7 E vs 103.7 P; mg/100g). L'aumento di cellule somatiche, in questo caso, probabilmente in rapporto all'insorgenza di disordini secretori e di mastiti, sembra rappresentare una valida spiegazione del fenomeno, che appare chiaramente sotto l'influenza delle sfavorevoli condizioni ambientali (caldo-umido) che caratterizzano l'estate della pianura padana (30, 44).

L'osservazione risulta avvalorata dalle variazioni dell'indice di caseina, che risulta più basso nel periodo estivo (77.11% E vs 77.98% P). Tuttavia, le alterazioni reologiche dei coaguli ottenuti dal latte prodotto in estate sono tali da chiamare in causa altre modificazioni di maggiore valenza, quali il pH, gli equilibri salini (disponibilità di calcio ionico per la aggregazione delle particelle di para-caseina) e, molto probabilmente, la stessa struttura micellare del latte.

3) *Variabilità tra allevamenti della velocità di formazione del coagulo.* - Le principali caratteristiche chimico-fisiche e i parametri di coagulazione del latte variano da allevamento ad allevamento in maniera statisticamente significativa (Tab. 3). Il valore medio annuo più favorevole del tempo di coagulazione corrisponde al latte dell'allevamento n.4 (17.6 min) mentre il peggiore, superiore del 23% circa, corrisponde all'allevamento n.19 (21.7 min).

La velocità di formazione del coagulo, oltre che le variazioni stagionali tende a caratterizzare in misura marcata anche la variabilità tra gli allevamenti. Nettissimo risulta infatti il divario tra i valori minimo (7.6 min; allev.8) e massimo (14.2 min; allev.12) riguardanti il tempo di rassodamento del coagulo; quest'ultimo, nettamente sfavorevole, risulta dell'87% circa più lungo del primo (Tab. 3).

I lattini prodotti negli allevamenti di piccola dimensione forniscono coaguli che tendono ad avere tempi di rassodamento mediamente più lunghi (11.3 min) rispetto a quelli degli allevamenti di media dimensione (10.1 min).

4) *Variazioni mensili della velocità di formazione del coagulo in rapporto alla dimensione dell'allevamento.* - L'andamento dei valori mensili del tempo di coagulazione del latte è diverso da allevamento ad allevamento. Tuttavia, dall'insieme dei dati raccolti si trae l'indicazione che il latte prodotto nei piccoli allevamenti risente maggiormente l'influenza stagionale rispetto a quello degli allevamenti di media dimensione. In effetti, durante il periodo estivo in almeno 6 dei 10 allevamenti di piccola dimensione si registra un peggioramento sensibile della reattività al caglio: il tempo di coagulazione di questo latte è sempre superiore al valore medio annuo.

Il fenomeno risulta meglio definito nei riguardi della velocità di formazione del coagulo, sia a livello dei valori mensili (Tab. 4) sia di quelli medi stagionali. Durante l'estate, il latte degli allevamenti di piccola dimensione, eccetto uno, fa registrare un significativo allungamento del tempo di rassodamento del coagulo, specie nei confronti del latte di produzione primaverile, nonché di quello invernale. Negli allevamenti di media dimensione, invece, il fenomeno risulta più attenuato e meno diffuso. In effetti, mentre nei piccoli allevamenti il tempo medio di rassodamento raggiunge addirittura i 15.1 min, in quelli di media dimensione si attesta sui 12.4 min (Tab. 5; Fig 2).

Le differenti proprietà reologiche del coagulo, anche in questo caso, sembrano in gran parte riconducibili alla diversa qualità del latte, in rapporto alle condizioni di produzione, soprattutto igieniche e climatiche, che si realizzano nelle due tipologie di allevamento.

Nel latte dei piccoli allevamenti (p), sempre con riferimento al periodo estivo, infatti, il contenuto di cellule somatiche risulta nettamente più elevato che nel latte degli allevamenti di media (m) dimensione (370.000 p vs 270.000 m; unità per ml) (Tab. 5; Fig. 2).

Il latte dei piccoli allevamenti, conseguentemente, risulta più povero di lattosio (4.89% p vs 5.07% m), più ricco di ioni cloro (111.2 p vs 104.1 m; mg/100g) e contraddistinto da un indice di caseina significativamente più basso (76.37% p vs 77.84% m).

Conclusioni

Le principali proprietà di coagulazione del latte - tempo di coagulazione, velocità di formazione del coagulo e consistenza del coagulo - variano significativamente nel corso dell'anno. Di particolare rilievo risultano le variazioni riguardanti la "velocità" di formazione del coagulo o tempo di rassodamento, parametro tecnologico, preso a riferimento in caseificio per l'avvio della frantumazione della cagliata.

Il latte prodotto durante il periodo estivo, nei mesi di luglio agosto e settembre, si contraddistingue per avere un tempo di rassodamento notevolmente più lungo rispetto a quello degli altri periodi stagionali. Ciò si

ripercuote negativamente, in misura marcata, sulla consistenza del coagulo.

Le variazioni peggiorative delle caratteristiche di coagulazione del latte durante l'estate trovano una discreta rispondenza in quelle che interessano i contenuti di lattosio e di cloruri, entrambe mutate dall'andamento delle cellule somatiche (disordini secretori e mastiti), aumento che appare chiaramente sotto l'influenza delle sfavorevoli condizioni ambientali (caldo-umido).

L'andamento stagionale dei parametri di coagulazione del latte varia sensibilmente da allevamento ad allevamento. Il latte prodotto negli allevamenti di piccola dimensione risente maggiormente l'effetto stagionale rispetto a quello degli allevamenti di media dimensione. Ciò è particolarmente vero per quanto riguarda la velocità di formazione o tempo di rassodamento del coagulo.

Durante l'estate il latte degli allevamenti di piccola dimensione registra un significativo peggioramento per quanto riguarda la velocità di formazione del coagulo, probabilmente a causa di condizioni ambientali più sfavorevoli, nei confronti di quello degli allevamenti di media dimensione (in parte con vacche mantenute in stabulazione libera).

Tabella 1 – Valori medi mensili del tempo di coagulazione del latte (r), della velocità di formazione (k_{20}) e della consistenza del coagulo (20 allevamenti; 12 prelievi per allevamento; 240 campioni di latte di massa). Medie \pm ds.

		Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic	Medie	F(P) ⁽¹⁾
Allevamenti	no.	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	—	—
r	min	19.1	19.7	19.1	<u>17.7</u>	20.4	19.9	18.8	20.5	<u>20.7</u>	19.0	19.7	19.6	19.5	2.42
tempo coagulazione		1.5	2.3	2.1	1.7	2.5	2.1	2.4	3.0	2.2	1.3	3.5	3.5	2.5 ⁽²⁾	**
k_{20} ⁽³⁾	min	<u>7.3</u>	8.6	9.6	9.1	10.5	9.8	<u>14.9</u>	14.2	12.2	10.7	11.0	10.8	10.7	9.38
tempo rassodamento		1.4	1.7	1.7	2.5	2.4	2.9	4.5	5.0	2.9	2.4	3.2	5.0	3.8	****
a_{30} ⁽⁴⁾	mm	<u>27.8</u>	24.6	23.0	26.5	19.6	22.6	17.5	<u>16.9</u>	17.3	22.6	20.9	23.8	21.9	6.27
consistenza coagulo		4.7	5.3	5.5	6.7	5.7	7.9	5.9	6.8	6.4	4.8	8.1	7.5	7.1	****
$a_{1/2r}$ ⁽⁵⁾	mm	<u>24.4</u>	22.5	20.4	21.1	20.4	21.5	<u>15.0</u>	16.5	17.8	18.6	19.0	19.1	19.7	10.62
consistenza coagulo		2.9	3.8	2.8	4.3	3.9	3.9	3.2	3.1	2.3	2.7	2.8	5.6	4.3	****

⁽¹⁾ Rapporto varianze (F) e probabilità (P) per 11 e 228 gradi di libertà

⁽²⁾ Deviazione standard calcolata per n=240

⁽³⁾ "Velocità" di formazione del coagulo o tempo di rassodamento

⁽⁴⁾ Consistenza del coagulo misurata a 30 min dall'aggiunta del caglio

⁽⁵⁾ Consistenza del coagulo (a) aggiustata per il tempo di coagulazione (1/2 r)

** , P<0.01; ****, P<0.0001

Figura 1 - Variazioni mensili (e stagionali) dei parametri di coagulazione del latte : r = tempo di coagulazione ; k_{20} = velocità formazione coagulo (tempo rassodamento); a_{30} e $a_{1/2r}$ = consistenza coagulo (v. testo).

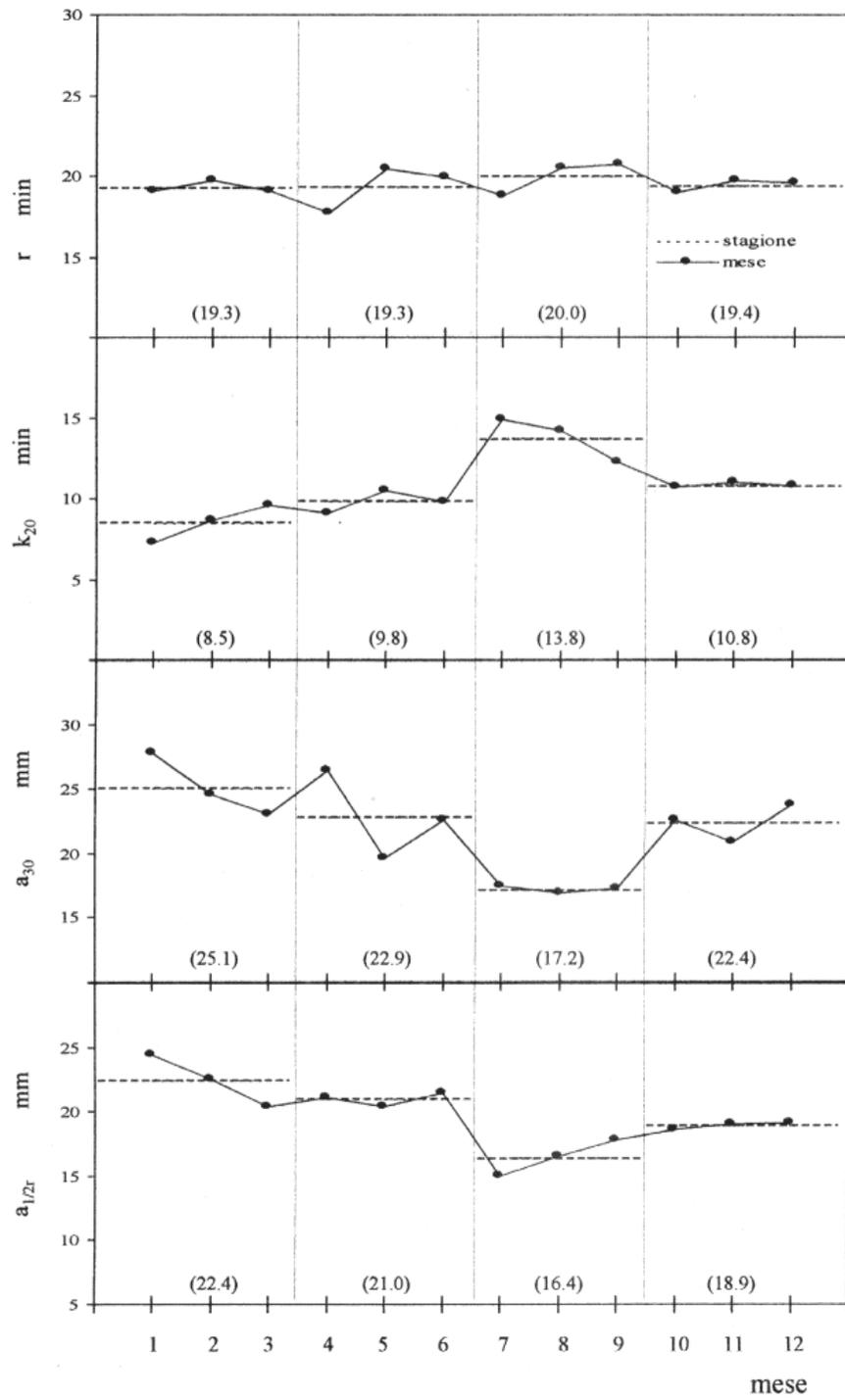


Tabella 2 – Valori medi mensili delle principali caratteristiche e della composizione azotata e minerale del latte (20 allevamenti; 12 prelievi per allevamento; 240 campioni di latte di massa).

	Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic	Medie	F(P) ⁽¹⁾
Allevamenti no.	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	—	—
Acidità tit. °SH/50ml	<u>3.34</u>	3.25	3.28	3.12	<u>3.10</u>	3.12	3.18	3.17	3.14	3.17	3.21	3.19	3.19 0.16 ⁽²⁾	4.73 ****
Grasso g/100g	3.67	3.63	3.48	3.54	3.50	3.50	<u>3.42</u>	3.43	3.55	3.57	3.75	<u>3.77</u>	3.57 0.27	4.35 ****
Proteina grezza g/100g	3.10	3.00	<u>2.97</u>	3.01	3.05	3.04	3.02	3.05	3.12	3.21	<u>3.22</u>	3.19	3.08 0.14	10.45 ****
Caseina g/100g	2.43	2.33	<u>2.32</u>	2.34	2.38	2.37	<u>2.32</u>	2.35	2.42	2.49	<u>2.50</u>	2.49	2.39 0.12	9.10 ****
Sieroproteina g/100g	0.68	0.67	<u>0.65</u>	0.67	0.67	0.67	0.70	0.70	0.70	<u>0.72</u>	<u>0.72</u>	0.70	0.69 0.05	6.62 ****
Indice caseina —	<u>78.17</u>	77.80	78.04	77.89	78.11	77.94	<u>76.85</u>	76.96	77.51	77.53	77.57	77.91	77.69 1.12	3.20 ****
Lattosio g/100g	5.06	4.95	4.99	5.02	5.08	5.10	4.98	4.99	<u>4.96</u>	<u>5.11</u>	5.09	5.03	5.03 0.13	4.32 ****
Ceneri g/100g	0.725	0.728	0.719	0.718	0.718	0.717	<u>0.712</u>	<u>0.712</u>	0.726	0.724	<u>0.732</u>	0.728	0.722 0.014	5.11 ****
Fosforo mg/100g	86.0	85.9	84.6	84.5	84.3	<u>83.6</u>	84.1	85.6	84.3	<u>87.3</u>	84.7	85.4	85.0 3.6	1.68 ns
Cloruri, Cl- mg/100g	102.7	<u>102.2</u>	103.0	102.3	104.6	104.3	106.6	107.4	<u>109.0</u>	103.3	104.1	105.3	104.5 7.1	1.92 *
Urea (N×2.14) mg/100g	29.64	28.21	27.07	27.76	<u>25.77</u>	27.39	26.30	27.50	26.11	26.36	26.54	<u>30.15</u>	27.39 5.78	1.16 ns
Cellule som. 1000/ml	<u>244</u>	298	298	273	322	298	342	314	306	292	284	<u>388</u>	305 189	0.71 ns

⁽¹⁾ Rapporto varianze (F) e probabilità (P) per 11 e 228 gradi di libertà

⁽²⁾ Deviazione standard calcolata per n=240

ns, P>0.05; *, P<0.05; ***, P<0.001; ****, P<0.0001

Tabella 3 – Velocità di formazione del coagulo (k_{30}) e caratteristiche chimico-fisiche del latte di singoli allevamenti (20 allevamenti; 12 prelievi per allevamento da gennaio a dicembre). Media annua.

Allevamenti	r min	k_{30} min	a_{10} mm	a_{12} mm	Acidità °SH/50 ml	Caseina g/100g	Lattosio g/100g	Cellule 1000/ml
1 m	21.0	13.3	18.4	18.4	3.08	2.43	5.10	284
2 m	19.6	10.6	22.5	19.9	3.23	2.47	5.14	262
3 m	18.6	9.7	24.2	19.8	3.19	2.35	5.06	359
4 m	17.6 -	8.4	28.0	21.5	3.31	2.40	5.10	238
5 m	19.7	11.8	18.8	18.0	3.05	2.31 -	5.07	169
6 m	17.7	8.7	27.1 +	21.1	3.28	2.37	5.12	209
7 m	19.6	10.3	21.7	20.1	3.25	2.41	5.10	306
8 m	19.3	7.6 -	27.0	24.3 +	3.31	2.55 +	5.15 +	301
9 m	19.9	10.5	21.1	20.4	3.31	2.44	5.02	285
10 p	19.4	10.8	21.3	19.0	3.24	2.36	5.04	418
11 m	20.2	10.2	20.4	20.2	3.20	2.37	4.99	333
12 p	20.6	14.2 +	16.0 -	16.3 -	3.28	2.32	5.01	239
13 p	20.8	14.0	18.2	16.3	3.18	2.39	4.95	248
14 p	18.8	9.3	24.9	21.6	3.33 +	2.43	5.13	50 -
15 p	18.9	11.4	20.8	17.8	3.12	2.41	4.99	418
16 p	19.8	11.2	20.7	18.8	3.12	2.43	4.74 -	391
17 p	18.9	11.0	21.7	18.4	3.14	2.32	5.02	363
18 p	18.6	9.6	24.6	20.1	3.17	2.33	4.93	343
19 p	21.7 +	11.8	17.1	20.1	3.00 -	2.36	4.92	307
20 p	19.5	9.9	23.6	20.9	3.05	2.45	5.01	575 +
FP) ⁽¹⁾	2.32 **	2.94 ***	3.13 ****	2.61 ***	7.17 ****	3.84 ****	12.18 ****	5.27 ****

p = allevamenti di piccola dimensione fino a 25 vacche in lattazione (16.4 ± 7.8).

m = allevamenti di media dimensione (76.5 ± 26.2 vacche in lattazione).

⁽¹⁾ Rapporto varianze (F) e probabilità (P) per 19 e 220 gradi di libertà

** , P<0.01; *** , P<0.001; **** , P<0.0001

Tabella 4 – Valori mensili della velocità di formazione del coagulo (k_{30}) o tempo di rassodamento (min) del latte dei singoli allevamenti (20 allevamenti).

Allevamenti	Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic	Medie
1 m	8.8	10.3	8.3	7.3	10.0	17.5	20.5	30.0	14.0	10.5	11.3	11.5	13.3
2 m	7.0	6.5	8.5	7.0	11.8	15.3	11.0	18.5	9.8	9.0	10.5	11.8	10.6
3 m	7.5	8.0	6.8	6.5	12.0	11.0	10.5	11.3	11.0	10.0	11.0	11.0	9.7
4 m	7.0	7.0	8.8	7.5	6.8	8.5	12.3	8.3	11.5	9.5	5.5	8.0	8.4
5 m	9.5	7.8	11.8	10.8	16.5	10.8	12.5	14.5	13.5	10.5	11.8	11.8	11.8
6 m	8.0	6.5	8.5	7.5	8.3	6.8	12.3	8.8	10.0	8.5	9.3	10.0	8.7
7 m	5.5	6.5	12.5	8.8	9.3	9.5	12.8	11.5	12.0	11.5	12.8	10.5	10.3
8 m	7.0	6.0	10.3	6.3	8.8	6.5	7.5	8.0	8.5	9.0	6.8	7.0	7.6
9 m	6.3	10.5	9.3	10.0	10.3	10.0	13.0	15.8	10.0	8.5	11.5	10.8	10.5
10 p	7.3	9.0	12.5	10.0	10.8	11.0	18.5	10.5	8.0	8.3	11.8	12.3	10.8
11 m	6.0	8.5	11.0	10.0	11.5	11.8	12.0	9.0	11.5	10.3	12.0	8.5	10.2
12 p	7.0	11.0	10.2	15.3	15.0	11.5	25.0	18.5	17.5	14.8	10.8	13.3	14.2
13 p	5.5	9.5	7.5	12.0	9.0	8.0	16.7	15.8	17.8	17.8	18.5	30.0	14.0
14 p	6.5	8.0	8.8	5.3	7.0	7.0	9.5	11.8	17.0	10.8	10.8	8.5	9.3
15 p	7.0	10.3	8.5	11.8	13.3	10.0	18.5	13.8	11.8	10.3	13.0	9.0	11.4
16 p	5.0	7.5	7.8	12.8	11.5	11.5	21.5	18.8	9.8	11.5	9.3	7.5	11.2
17 p	7.5	10.0	10.0	9.0	10.5	7.0	18.0	16.3	12.5	12.5	9.0	9.5	11.0
18 p	8.8	9.0	8.5	7.5	8.3	7.5	13.0	14.0	10.5	11.3	8.5	7.8	9.6
19 p	10.5	11.5	9.0	8.3	9.5	7.3	15.0	13.8	15.8	11.3	18.5	10.8	11.8
20 p	8.0	8.5	12.5	8.3	10.8	7.5	18.0	14.8	10.8	7.3	7.3	5.5	9.9

p = allevamenti di piccola dimensione fino a 25 vacche in lattazione (16.4 ± 7.8)

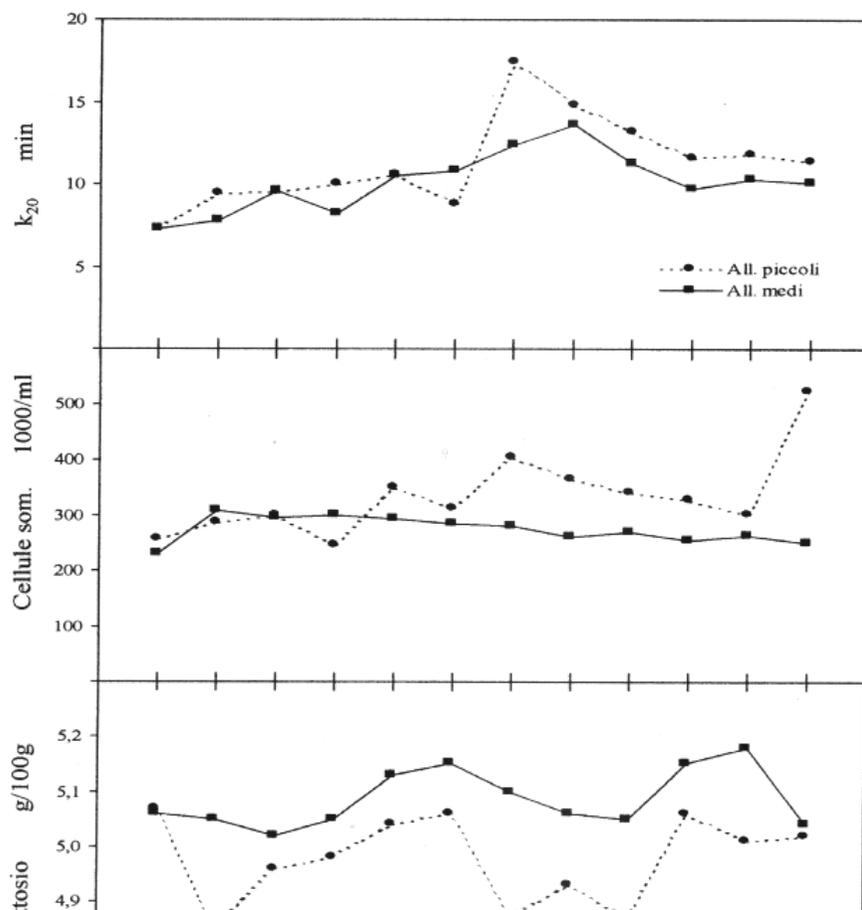
m = allevamenti di media dimensione (76.5 ± 26.2 vacche in lattazione)

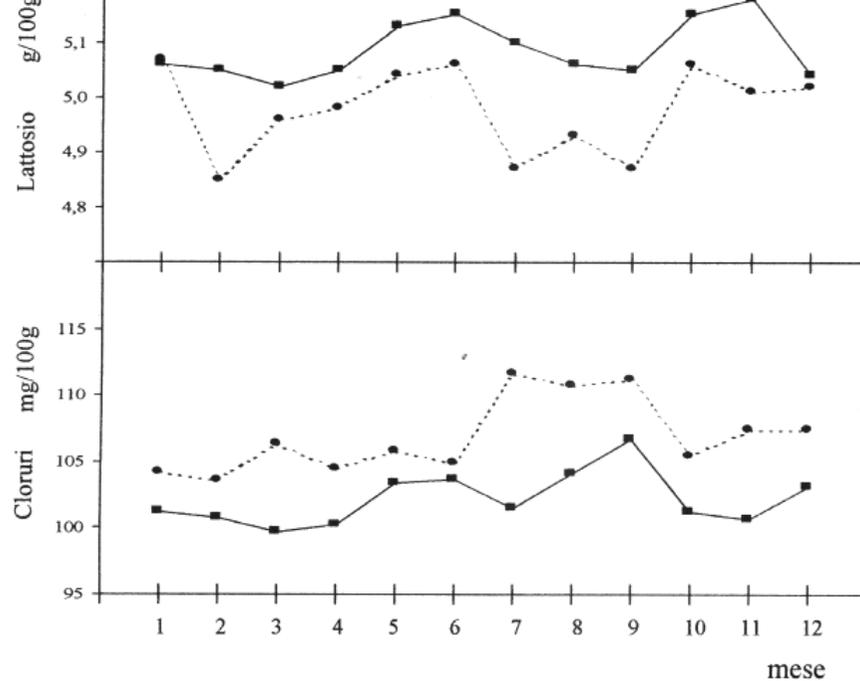
Tabella 5 – Valori medi mensili della velocità di formazione del coagulo (k_{20}) e di alcune caratteristiche del latte in rapporto alla dimensione dell'allevamento: p =10 allevamenti fino a 25 vacche; m =10 allevamenti sopra 25 vacche (12 prelievi per allevamento).

		Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic	Medie
k_{20}	min													
	p	7.3	9.4	9.5	10.0	10.6	8.8	17.4	14.8	13.2	11.6	11.8	11.4	11.3
Cellule som.	1000/ml													
	p	257	287	301	245	350	312	404	365	342	329	303	525	335
Lattosio	g/100g													
	p	5.07	4.85	4.96	4.98	5.04	5.06	4.87	4.93	4.87	5.06	5.01	5.02	4.97
Cloruri Cl-	mg/100g													
	p	5.06	5.05	5.02	5.05	5.13	5.15	5.10	5.06	5.05	5.15	5.18	5.04	5.09
Indice caseina	%													
	p	104.2	103.5	106.3	104.4	105.8	104.9	111.6	110.7	111.2	105.4	107.4	107.4	106.9
Indice caseina	%													
	m	101.2	100.8	99.7	100.2	103.4	103.6	101.5	104.1	106.7	101.2	100.7	103.1	102.2
Indice caseina	%													
	p	78.19	77.86	77.96	78.08	78.29	78.00	75.92	76.22	76.99	77.11	77.11	77.66	77.45
Indice caseina	%													
	m	78.15	77.74	78.11	77.69	77.94	77.88	77.77	77.70	78.06	77.95	78.03	78.16	77.93

p = allevamenti di piccola dimensione fino a 25 vacche in lattazione (16.4 ± 7.8)
 m = allevamenti di media dimensione (76.5 ± 26.2 vacche in lattazione)

Figura 2 - Variazioni mensili della velocità di formazione del coagulo (k_{20}) e di alcune caratteristiche del latte prodotto negli allevamenti di piccola ($n = 10$) e di media ($n = 10$) dimensione.





Parole chiave: Latte, coagulazione presamica, tempo rassodamento, variazioni stagionali, variabilità tra allevamenti, dimensione allevamenti.

Key words: Cow milk, rennet-coagulation, curd firming time, seasonal variations, variability between herds, herd size.

RIASSUNTO - Sono state studiate le variazioni mensili della "velocità" di formazione o tempo di rassodamento del coagulo in rapporto al periodo stagionale e alla dimensione dell'allevamento. L'indagine è stata condotta su 240 campioni di latte di massa, prelevato mensilmente per un anno da 20 allevamenti di piccola (10) e di media (10) dimensione in provincia di Parma. Il tempo di rassodamento del coagulo (k_{20}) varia significativamente ($P < 0.0001$) nel corso dell'anno. I valori medi mensili più bassi si hanno durante il periodo invernale (8.5 min) e quelli più elevati nei mesi estivi (13.8 min). Conseguentemente, il latte di luglio, agosto e settembre fornisce coaguli di scarsa consistenza ($a_{30} = 17.2$ mm) rispetto agli altri periodi stagionali (inverno = 25.1 mm). Il tempo medio annuo di rassodamento del coagulo varia significativamente ($P < 0.001$) da allevamento ad allevamento (*min.* 7.6 min; *max.* 14.2 min). Il tempo di rassodamento del coagulo risulta più lungo per il latte degli allevamenti di piccola rispetto a quelli di media dimensione, specie durante i mesi caldi del periodo estivo (15.1 min vs 12.4 min).

SUMMARY - Monthly variations of the main rennet-coagulation properties of Friesian herd milks with particular regard to the rate of curd formation. Monthly variations of the "rate" of curd formation (= curd firming time) in relation to season and herd size were studied. The study was carried out on 240 bulk milk samples, taken monthly during a year from 10 small size and 10 medium size herds in the province of Parma. Curd firming time (k_{20}) varies significantly ($P < 0.0001$) during the year. Lowest monthly medium values were obtained during winter (8.5 min) and highest in summer period (13.8 min). Consequently, July, August and September milks gives lowly curd firmness ($a_{30} = 17.2$ mm) in comparison to the other seasonal periods (winter = 25.1 mm). Medium annual curd firming time varies significantly ($P < 0.001$) from herd to herd (*min.* 7.6 min; *max.* 14.2 min). Small size herds curd firming time is longer than medium one, especially during hot months of summer period (15.1 min vs 12.4 min).

BIBLIOGRAFIA

- RUFFO G., MAFFEO G. (1974). La produzione del latte in rapporto al periodo stagionale e all'alimentazione. Riv. Zootecnica e Vet., 2, 317-344.
- NG-KWAI-HANG K.F., HAYES J.F., MOXLEY J.E., MONARDES H.G. (1982). Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. J. Dairy Sci., 65, 1993-1998.
- MAHIEU H. (1985). Facteurs de variation de la composition du lait. In "Laits et produits laitiers. 1" (Coord. M. Luquet), 119-183. Technique et Documentation Lavoisier, Paris.
- VERMEULEN G.T.J. (1987). Heat stress and its effect on milk production, milk quality and reproduction. In "Nat. Dairy Cattle Performance and Progeny Testing Scheme". Ann. Report, South Africa, 7, 79-101.
- MARIANI P., ZANZUCCHI G., BLANCO P., MASONI M. (1993). Variazioni stagionali del contenuto in fosforo del latte di massa di singoli allevamenti. L'Industria del Latte, 29(1), 39-53.
- DECAEN C., JOURNET M. (1966). Influence saisonnière sur la production et la composition du lait. Ann. Zootech., 15, 259-277.
- BRUHN J.C., FRANKE A.A. (1977). Monthly variations in gross composition of California herd milks. J. Dairy Sci., 60, 696-700.
- PHELAN J.A., O'KEEFFE A.M., KEOGH M.K., KELLY P.M. (1982). Studies of milk composition and its relationship to some processing criteria. I. Seasonal changes in the composition of Irish milk. Ir. J. Fd Sci. Technol., 6, 1-11.
- SOMMERFELDT J.L., BAER R.J. (1986). Variability of milk components in 1705 herds. J. Food Protection, 49, 729-733.
- LIBERATORI J., MARINUCCI V., NAPOLITANO L., ZONARI D., LUZZATI A., SIRAGUSA N. (1987). Alimentazione e produzione del latte. Azoto totale e caseinico nel latte di bovine Frisone e Piemontesi alimentate con foraggi aziendali. Sci. Tecn. Latt.-cas., 38, 87-103.
- COULON J.B. (1994). Effets du stade physiologique et de la saison sur la composition chimique du lait de vache et ses caractéristiques technologiques. Rec. Méd. Vét., 170, 367-374.
- FOSSA E., PECORARI M., MARIANI P. (1984). Variazioni stagionali dell'acidità e delle caratteristiche di coagulazione del latte. L'Industria del Latte, 20 (1), 87-97.
- MARIANI P., ZANZUCCHI G., POZZATTI A., SUMMER A., FOSSA E., PECORARI M. (1994). Variazioni mensili dell'acidità e delle caratteristiche di coagulazione del latte nel corso di un triennio. Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma, 14, 133-148.
- FOSSA E., SANDRI, MARIANI M.S., SUMMER A., MARIANI P. (1996). Il comportamento tecnologico-caseario del latte prodotto durante il periodo estivo: osservazioni su lattini individuali di vacche di razza Frisone. Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma, 16, 103-112.
- AURIOL P., MOCQUOT G. (1957). Variations saisonnières de la composition des laits d'étable et de fromagerie dans la région du Gruyère. I. Plateau de Nozeroy (Jura). Ann. Zootech., 6, 95-120.
- CHAPMAN H.R., BURNETT J. (1970). Variations saisonnières des propriétés physiques du lait destiné à la production du fromage. XVIII Congrès Inter. de Laiterie 1F, 531.

17. O'KEEFFE A.M., PHELAN J.A., MULHOLLAND E. (1981). Effect of seasonality on the suitability of milk for cheesemaking. *Ir. J. Fd Sci. Technol.*, 5,73.
18. OHASHI T., HAGA S., YAMAUCHI K., KATAYAMA H., OLSON N.F. (1982). Seasonal variations in physical properties of milk rennet curd. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 53, 445-447.
19. O'KEEFFE A.M. (1984). Seasonal and lactational influences on moisture content of Cheddar cheese. *Ir. J. Fd Sci. Technol.*, 8, 27-37.
20. RESMINI P., VOLONTERIO G., ANNIBALDI S. (1971). Alcune caratteristiche chimico-fisiche di lattici destinati alla produzione di formaggio Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 22, 63-90.
21. RESMINI P., VOLONTERIO G., PRATI F., PAZZAGLIA C., MOTTI G. (1982). Caratteristiche del latte e fenomeni rilevati in caldaia nella lavorazione a formaggio Grana Padano. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 33, 229-264.
22. MARIANI P., PECORARI M., FOSSA E. (1982). Le caratteristiche di coagulazione del latte in rapporto allo stadio di lattazione ed ai livelli di produzione. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 33, 409-425.
23. GRANDISON A.S., FORD G.D., OWEN A.J., MILLARD D. (1984). Chemical composition and coagulating properties of renneted Friesian milk during the transition from winter rations to spring grazing. *J. Dairy Res.*, 51, 69-78.
24. FRANZINI G., GATTI R., NIGRELLI A.D., PECCHINI A., GENOVESI G., CANNISTRÀ S. (1985). Variazione stagionale di alcuni parametri qualitativi del latte di massa nel Mantovano. *Il Latte*, 10, 494-499.
25. MARIANI P., BRIZZI S., PECORARI M., FOSSA E. (1985). Le caratteristiche acidimetriche e di coagulazione del latte in rapporto al cambio primaverile di alimentazione. *Sci. Tecn. Latt.-cas.* 36, 143-159.
26. MARTIN B., COULON J.B. (1991). Aptitude à la coagulation du lait de vache: influence de l'alimentation. *INRA Prod. Anim.*, 4, 209-218.
27. BIANCA W. (1965). Cattle in a hot environment. *J. Dairy Res.* 32, 291-345.
28. THOMPSON G.E. (1973). Climatic physiology of cattle. *J. Dairy Res.*, 40, 441-473.
29. COLLIER R.J., BEEDE D.K., THATCHER W.W., ISRAEL L.A., WILCOX C.J. (1982). Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. *J. Dairy Sci.*, 65, 2213-2227.
30. CALAMARI L., ABENI F. (1995). Influenza dello stress termico sui parametri riproduttivi e produttivi della bovina da latte. In "Vacca da latte e stress da caldo". 4-65 (Ed. C.E.R.A.S., A.A.S.V.T. e C.R.P.A.). Tipografia Italia, Piacenza.
31. CALAMARI L., MARIANI P. (1998). Effects of the hot environment conditions on the main milk cheesemaking properties. *Zoot. Nutr. Anim.*, 24, (in press).
32. ANON. (1963). Determinazione del grado di acidità del latte secondo Soxhlet-Henkel. *Milchwissenschaft*, 18, 520.
33. ANNIBALDI S., FERRI G., MORA R. (1977). Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: tipizzazione lattodinamografica. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 28, 115-126.
34. MARIANI P., MEAZZA M., RESMINI P., PAGANI M.A., PECORARI M., FOSSA E. (1986). Osservazioni su tipi di beta-caseina e caratteristiche di coagulazione del latte. *L'industria del Latte*, 22(1), 35-58.
35. ASCHAFFENBURG R., DREWRY J. (1959). New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. XVth Int. Dairy Congr., 3, 1631-1637.
36. BROWN H.H. (1959). Determination of blood urea with p-dimethylaminobenzaldehyde. *Analyt. Chem.*, 31, 1844-1846.
37. McDOWELL A.K.R. (1972). Seasonal variations in the total nitrogen, non-protein nitrogen and urea nitrogen contents of Friesian and Jersey milk. *J. Dairy Res.*, 39, 27-33.
38. BIGGS D.A. (1978). Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61, 1015-1034.
39. SAVINI E. (1946). Analisi del latte e dei latticini. Ed. Hoepli, Milano.
40. ALLEN R.J.L. (1940). The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, 34, 858-865.
41. SCHMIDT MADSEN P. (1975). Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk. *J. Dairy Res.*, 42, 227-239.
42. STATGRAPHICS 1993. Statistical graphics system by statistical graphics corporation. Ref. manual Vers. 7 DOS. Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA.
43. MARIANI P., ZANZUCCHI G., SUMMER A., FOSSA E., PECORARI M. (1997). Rapporti tra contenuto di caseina e consistenza del coagulo in lattici individuali di vacche di razza Bruna. *Atti S.I.S.Vet.*, 51, 407-408.
44. CAPPALÀ V., CALAMARI L., VAZHAPILLY P., FRAZZI E. (1991). Effect of high temperature on production and quality of milk. In "Animal husbandry in warm climates". (Ed. EAAP, pubbl. no. 55/91). Pudoc, Wageningen, Netherlands, 93-97.

CONTENUTO DI GRASSO E COMPOSIZIONE IN ACIDI GRASSI DEL LATTE DI CAVALLE NUTRICI PRODOTTO NEL PRIMO MESE DI LATTAZIONE(1)

P. Mariani⁽²⁾, F. Martuzzi⁽²⁾, A. Summer⁽²⁾, A.L. Catalano⁽²⁾

(2) Istituto di Zootecnica Alimentazione e Nutrizione, Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma.

(1) Lavoro eseguito con contributo MURST 60%

Introduzione

Le notevoli capacità di accrescimento del puledro durante il primo mese di vita si fondano pressoché esclusivamente sull'apporto energetico, proteico, minerale e vitaminico del latte materno (1-4). Il latte è determinante non soltanto sotto il profilo quantitativo, ma anche da un punto di vista qualitativo, in rapporto al tipo genetico ed al regime alimentare della nutrice. Uno sviluppo non equilibrato del puledro, specie in questa fase particolarmente delicata sotto il profilo metabolico, può favorire l'insorgenza di disordini di tipo muscolare e scheletrico (Developmental Orthopedic Disease), tali da compromettere le performance dell'animale adulto (5, 6). Le diverse anomalie legate a questa sindrome si ritengono siano verosimilmente dovute in buona misura ad errori di natura alimentare (7), caratterizzati da eccessi o carenze di energia, di sali minerali e di vitamine, in grado di interessare indifferentemente il puledro e la nutrice.

Sotto questo profilo, ad esempio, la forzatura alimentare della nutrice mediante l'impiego di razioni ricche di concentrato, pur non determinante ai fini della produzione, può esercitare un'influenza significativa sulla qualità del latte, in particolare attraverso una diminuzione del contenuto lipidico (8). Non soltanto, ma tale regime alimentare appare in grado di modificare significativamente anche la composizione acidica del grasso, che nel caso specifico tende ad impoverirsi di acido linolenico (9), acido grasso compreso tra i polinsaturi (ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA) considerati essenziali per la maggior parte dei mammiferi (10-12), in grado di svolgere un ruolo importante anche nei processi di osteogenesi (13).

La composizione in acidi grassi del grasso del latte di cavalla risulta molto variabile (14), specie con riferimento al contenuto di quegli acidi grassi polinsaturi che tendono a caratterizzarlo e a renderlo, entro certi limiti, abbastanza simile al latte di donna e, in ogni caso, interessante nell'alimentazione dei neonati e, più in generale, dei convalescenti e degli anziani (15, 16).

Lo scopo della ricerca è stato quello di studiare la composizione in acidi grassi del grasso del latte di cavalla prodotto nel primo mese di lattazione nelle condizioni manageriali dell'allevamento italiano e di confrontarla, per quanto possibile, con quella relativa ad altre realtà zootecniche differenti soprattutto sotto il profilo del regime alimentare.

Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta su 18 campioni di latte individuale prelevati tra il 5° e il 35° giorno di lattazione (17.7 ± 8.7 d) da altrettante giumente di tre differenti razze cavalline (9 Sella Italiano, 6 Bardigiano e 3 Quarter Horse), di 8 allevamenti delle provincie di Parma, Piacenza e Cremona. Il latte è stato estratto manualmente da una sola ghiandola mammaria munta, per quanto possibile in modo completo, in presenza del puledro, cui per due ore è stata impedita la suzione mediante applicazione di museruola. Le cavalle, di età compresa tra 3 e 22 anni (1+ 16 parti) e del peso variabile tra 420+ 490 kg (Bardigiano) e 500+ 600 kg (Sella Italiano) erano alimentate con fieno di prato stabile e medica *ad libitum* (10-13 kg circa) e in prevalenza con 4-5 kg di mangime del commercio, oppure, come nel caso del Bardigiano, con 1-1.5 kg di avena.

Il grasso è stato estratto con etere etilico ed etere di petrolio secondo la metodica Mojonnier modificata (17). La determinazione degli acidi grassi è stata effettuata mediante gascromatografia capillare degli esteri metilici. La derivatizzazione degli acidi grassi è stata fatta seguendo le indicazioni di Knapp (18). Si è operato con gascromatografo PU4400 munito di colonna SP(TM)2330 Supelco di 30 m (i.d. 0.25 mm; d.f. 0.20 μ m) nelle seguenti condizioni: carrier Elio 1 ml/min; temperatura iniziale colonna 80°C (8°C/min fino a 260°C, isoterma 20 min); iniettore PTV 80-250°C; detector FID 300°C; tempo analisi 35 minuti. Nella elaborazione dei dati sono stati presi in esame i 10 principali acidi grassi, da C8 a C18, saturi ed insaturi, quasi sempre riportati in letteratura; sono stati, invece, esclusi alcuni acidi grassi (C6:0, C14:1, C15:0, C17:0, C17:1 e C20:4) non sempre rilevabili, ovvero presenti in piccolissime quantità o in traccia.

Sugli stessi campioni di latte sono state effettuate anche le seguenti determinazioni di base: pH con potenziometro; acidità titolabile con NaOH 0.25N secondo Soxhlet-Henkel (19); densità a 15°C con lattodensimetro Quevenne; punto di congelamento con crioscopio a termistori; sostanza secca su 20 g di latte a 102°C per 6 ore; grasso e lattosio mediante letture nel medio infrarosso IR (20) con Milko-Scan 134A/B; N totale, N non caseinico e N non proteico mediante Kjeldahl (21); ceneri su 20 g di latte inceneriti e calcinati in muffola a 530°C. L'energia grezza è stata calcolata secondo Doreau *et al.* (1), utilizzando i coefficienti 8.97, 5.25 e 4.10 rispettivamente per grammo di grasso, proteina e lattosio.

Risultati e discussione

I risultati sono riportati nelle tabelle 1 + 6 e in parte illustrati nelle figure 1 e 2. I valori medi delle caratteristiche chimico-fisiche di base e della composizione acidica del grasso del latte delle 18 cavalle nutrici utilizzate nella prova sono mostrati, rispettivamente, nelle tabelle 1 e 2.

a) *Contenuto di grasso.* - Il contenuto di grasso, mediamente pari a 1.18%, manifesta un'ampia variabilità (coefficiente di variazione = 33%) contraddistinta da valori individuali compresi tra 0.76% e 2.10% (Tab. 1), variabilità forse in parte legata anche alle difficoltà di operare una mungitura manuale completa, tale da consentire la raccolta di tutto il latte contenuto nella ghiandola mammaria. Il lattosio, fattore determinante la pressione osmotica, rappresenta il costituente meno variabile (CV = 2%), quantitativamente più importante, il cui contenuto risulta mediamente pari a 6.61% e, con riferimento al periodo di lattazione considerato (5+ 35 d), oscilla moderatamente tra 6.23% e 6.78%.

Tabella 1 - Contenuto di grasso e valori medi delle principali caratteristiche del latte di cavalle nutrici (n=18)

		Media	DS ⁽¹⁾	CV % ⁽²⁾	min.	max.
Densità	a 15°C	1.036	0.001	0.10	1.035	1.038
Punto congelamento	Δ °C	0.529	0.008	1.46	0.512	0.542
pH	unità	6.84	0.15	2.15	6.52	7.07
Acidità titolabile	°SH/100 ml	3.86	0.87	22.65	2.44	5.54
Sostanza secca	g / 100 g	10.76	0.64	5.94	10.08	12.70
Grasso mid-IR	g / 100 g	1.18	0.39	33.46	0.76	2.10
Proteina (N*6.38)	g / 100 g	2.48	0.39	15.88	1.92	3.61
Caseina	g / 100 g	1.35	0.23	17.42	0.90	1.96
Siero proteina grezza	g / 100 g	1.13	0.19	17.27	0.87	1.65
Numero caseina ⁽³⁾	—	54.43	3.69	6.78	46.84	60.23
N non proteico	mg / 100 g	36.56	4.91	13.44	30.00	47.00
Lattosio mid-IR	g / 100 g	6.61	0.13	2.04	6.23	6.78
Ceneri	g / 100 g	0.53	0.09	16.67	0.39	0.76
Energia grezza ⁽⁴⁾	kcal / 100 g	50.64	4.61	9.11	45.87	63.34

⁽¹⁾ Deviazione standard

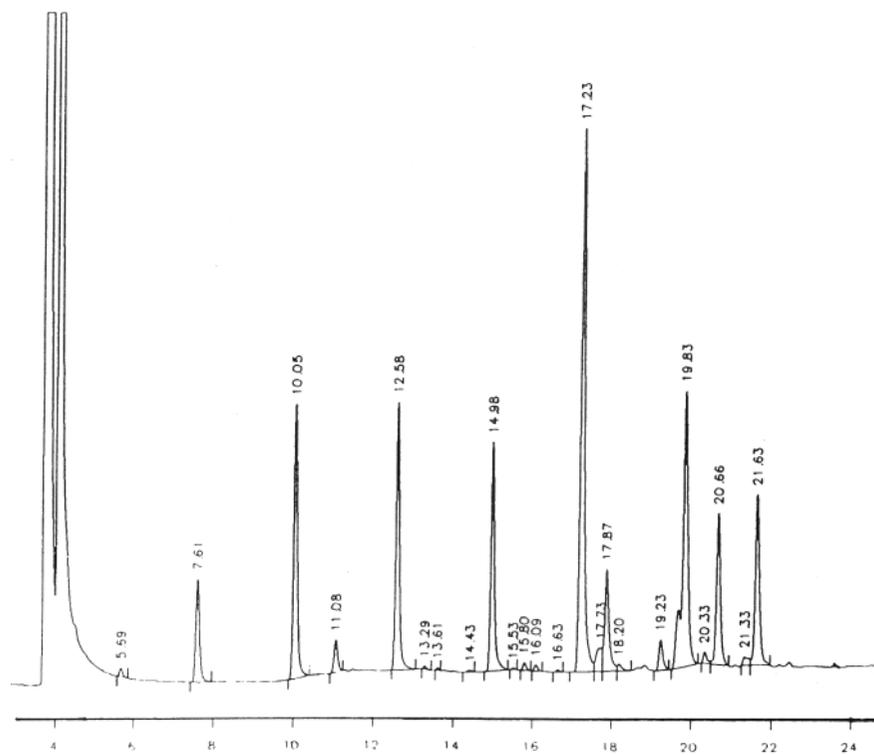
⁽²⁾ Coefficiente di variazione

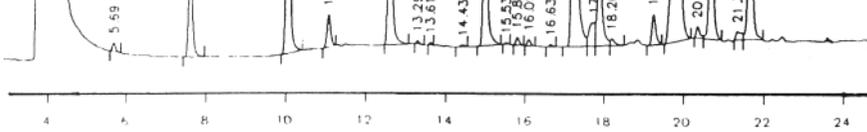
⁽³⁾ Caseina in % della proteina grezza

⁽⁴⁾ Secondo Doreau *et al.* (1986) (1)

Figura 1 - Profilo degli acidi grassi del latte di una singola cavalla nutrice: gascromatografia su colonna capillare (vedere testo). Tempi di ritenzione (min) dei principali acidi grassi: 7.61 = caprilico; 10.05 = caprinico; 12.58 = laurico; 14.98 = miristico; 17.23 = palmitico; 17.87 = palmitoleico; 19.23 = stearico; 19.83 = oleico; 20.66 = linoleico; 21.63 = linolenico.

[Figura 1 - alta risoluzione (78kb)]





Il contenuto di proteina grezza, caratterizzato da una variabilità intermedia (CV = 16%), risulta mediamente pari a 2.48%; fatta eccezione per una cavalla (3.61%), molto probabilmente ancora in fase colostrale, il latte delle altre presenta valori proteici compresi tra un minimo di 1.92% ed un massimo di 2.86%. La caseina, che varia secondo lo stesso ordine di grandezza, rappresenta circa la metà della proteina grezza (54.43%) e risulta pari a 1.35%. Il valore energetico del latte risulta di entità moderata, mediamente pari a circa 506 kcal per chilogrammo.

Il contenuto di grasso osservato in questa ricerca, da ritenere mediamente basso, concorda abbastanza bene con diversi valori riportati da altri Autori (9, 22-27), anche se il confronto è da considerare come puramente indicativo, in quanto non omogeneo, specie con riferimento al periodo di lattazione. In letteratura si trovano anche valori di contenuto in grasso di entità inferiore (2, 3, 28-36), nonché altrettanti valori superiori (37-42) o sensibilmente più elevati (43, 44) rispetto a quello trovato nella presente indagine.

b) *Composizione in acidi grassi.* - Nella figura 1 viene mostrato il profilo gascromatografico degli esteri metilici del grasso del latte di una cavalla di razza Sella Italiano di 18 anni (14 parti) prelevato al 13° giorno di lattazione. Gli acidi grassi presenti in quantità costantemente apprezzabili sono circa 10, tra saturi ed insaturi, tutti con numero pari di atomi di carbonio (Tab. 2), a partire dall'acido caprilico (C8:0) fino all'acido linolenico (C18:3).

Tabella 2 - Valori medi della composizione in acidi grassi (% peso) del grasso del latte di cavalla (n=18)

	Media	DS	CV %	min.	max.	Vacca ⁽¹⁾
C 8:0 ac. caprilico	2.58	1.00	38.77	1.12	4.49	0.96
C 10:0 ac. caprinico	8.77	2.48	28.23	3.85	12.28	2.84
C 12:0 ac. laurico	9.84	3.10	31.52	3.09	16.77	3.72
C 14:0 ac. miristico	9.62	2.33	24.26	3.61	13.61	13.33
C 16:0 ac. palmitico	27.95	2.79	9.99	23.51	31.89	35.64
C 16:1 ac. palmitoleico	5.35	1.15	21.45	3.52	7.86	1.80
C 18:0 ac. stearico	1.72	0.39	22.95	1.16	2.41	12.64
C 18:1 ac. oleico	21.11	6.37	30.19	13.75	34.79	26.29
C 18:2 ac. linoleico	7.44	3.58	48.15	2.03	13.77	2.06
C 18:3 ac. linolenico	5.62	2.45	43.56	2.14	11.56	0.72
Totale	100					100
Ac. grassi saturi	60.48	8.24	13.62	40.96	76.03	69.13
Ac. grassi insaturi	39.52	8.24	20.84	23.97	59.04	30.87
a) ac. grassi monoinsaturi	26.46 (67) ⁽²⁾	6.95	26.26	17.43	41.27	28.09
b) ac. grassi polinsaturi	13.06 (33) ⁽²⁾	4.91	37.56	5.88	19.31	2.78

⁽¹⁾ Ripartizione % degli acidi grassi C8 → C18 di due campioni di latte di massa, ciascuno di tre allevamenti di razza Frisone.

⁽²⁾ Ripartizione % degli acidi grassi insaturi, tra acidi monoinsaturi e acidi polinsaturi.

Gli acidi grassi maggiormente rappresentati sono il palmitico (27.95%) e l'oleico (21.11%); quest'ultimo nettamente più variabile (CV = 30%) rispetto al primo (CV = 10%), che tra tutti gli acidi grassi risulta il meno variabile. Il contenuto di acido palmitico, infatti, oscilla tra 23.51 e 31.89%, mentre l'acido oleico varia tra 13.75 e 34.79% (Tab. 2).

Nettamente inferiori, ma pur sempre discretamente rappresentate, risultano le quantità degli acidi grassi saturi a corta e media catena (8.77% caprinico; 9.84% laurico; 9.62% miristico), cui si contrappongono proporzioni altrettanto significative di acidi grassi insaturi a media e lunga catena (5.35% palmitoleico; 7.44% linoleico; 5.62% linolenico). Gli acidi grassi linoleico e linolenico si contraddistinguono per la più elevata variabilità (CV = 48% e 44% rispettivamente), in quanto compresi tra 2.03 e 13.77% il primo e tra 2.14 e 11.56% il secondo.

Gli acidi grassi insaturi sono mediamente il 40% circa del totale, rappresentati per i 2/3 da acidi grassi monoinsaturi (palmitoleico e oleico) e per 1/3 da acidi grassi polinsaturi (linoleico e linolenico) (Tab. 2). Soltanto in due casi su 18 (cavalle 3 e 10) gli acidi grassi insaturi risultano complessivamente superiori agli acidi grassi saturi (Tab. 3). In un solo caso (cavalla 16) gli acidi grassi polinsaturi risultano complessivamente superiori agli acidi grassi monoinsaturi (Tab. 3).

Tabella 3 - Dati individuali: composizione in acidi grassi (% peso) del grasso del latte di cavalle nutrice (n=18)

Cavalla	Ac. grassi saturi	Ac. grassi insaturi	Ac. grassi monoinsaturi	Ac. grassi polinsaturi
1	76.03	23.97	17.43 (73) ⁽¹⁾	6.54 (27) ⁽¹⁾
2	69.06	30.94	23.54 (76) ⁽¹⁾	7.40 (24) ⁽¹⁾
3	49.27	50.73	37.57 (74) ⁽¹⁾	13.16 (26) ⁽¹⁾
4	58.91	41.09	32.62 (79) ⁽¹⁾	8.47 (21) ⁽¹⁾
5	58.85	41.15	22.83 (55) ⁽¹⁾	18.32 (45) ⁽¹⁾
6	57.23	42.77	23.46 (55) ⁽¹⁾	19.31 (45) ⁽¹⁾
7	74.86	25.14	19.26 (77) ⁽¹⁾	5.88 (23) ⁽¹⁾
8	64.04	35.96	23.16 (64) ⁽¹⁾	12.80 (36) ⁽¹⁾
9	60.05	39.95	30.35 (76) ⁽¹⁾	9.60 (24) ⁽¹⁾
10	40.96	59.04	41.27 (70) ⁽¹⁾	17.77 (30) ⁽¹⁾
11	57.27	42.73	35.19 (82) ⁽¹⁾	7.54 (28) ⁽¹⁾
12	62.38	37.62	22.35 (59) ⁽¹⁾	15.27 (41) ⁽¹⁾
13	62.61	37.39	22.36 (60) ⁽¹⁾	15.03 (40) ⁽¹⁾
14	54.40	45.60	26.62 (58) ⁽¹⁾	18.98 (42) ⁽¹⁾
15	61.81	38.19	30.61 (80) ⁽¹⁾	7.58 (20) ⁽¹⁾
16	63.58	36.42	18.20 (50) ⁽¹⁾	18.22 (50) ⁽¹⁾
17	62.04	37.96	19.81 (52) ⁽¹⁾	18.15 (48) ⁽¹⁾
18	55.28	44.72	29.60 (66) ⁽¹⁾	15.12 (34) ⁽¹⁾
Media	60.48	39.52	26.46 (67) ⁽¹⁾	13.06 (33) ⁽¹⁾

(1) Ripartizione % degli acidi grassi insaturi, tra acidi monoinsaturi e acidi polinsaturi.

Tra i monoinsaturi l'acido oleico predomina nettamente sull'acido palmitoleico (Tab. 2). Tra i polinsaturi prevale l'acido linoleico che, però, in tre casi (cavalle 3, 8 e 14) risulta ben controbilanciato e in sette casi (cavalle 2, 4, 7, 9, 10, 12 e 13) sopravanzato dall'acido linolenico.

c) *Confronto con il grasso del latte di vacca.* - Il grasso del latte di cavalla contiene una maggiore quantità di acidi grassi insaturi rispetto a quello di vacca (Tabb. 2 e 4; Fig. 2). La differenza è legata soprattutto alla elevata proporzione di acidi grassi polinsaturi che caratterizza il latte di cavalla (13.06%), in misura tale da differenziarlo nettamente da quello di vacca (2.78%). Le differenze tra le due specie interessano anche altri aspetti del profilo acido del grasso.

Figura 2 - Profili degli acidi grassi del latte di una singola cavalla (sopra) e di un campione di latte bovino di massa (sotto): gas cromatografia capillare (vedere Fig. 1). I tempi di ritenzione di 17.00 min (sopra) e di 16.89 min (sotto) corrispondono all'acido stearico.

[\[Figura 2 - alta risoluzione \(108kb\)\]](#)

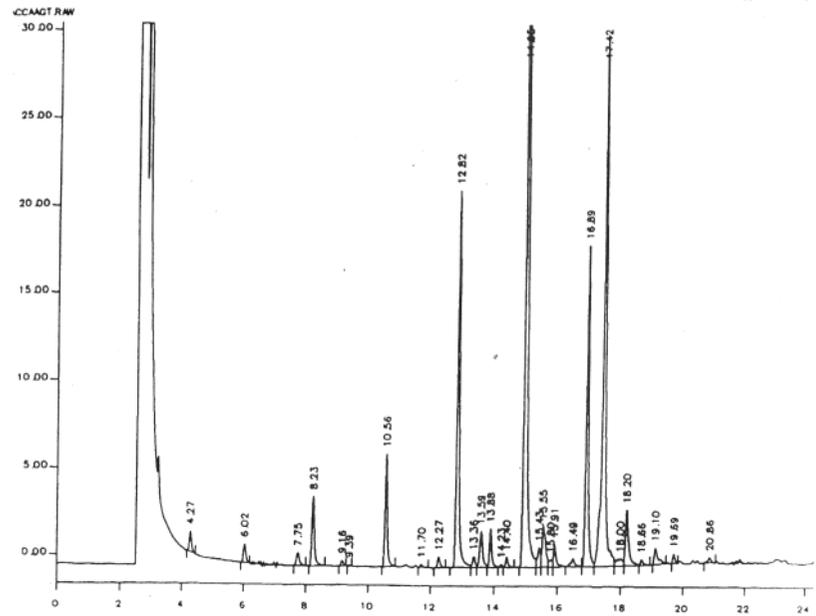
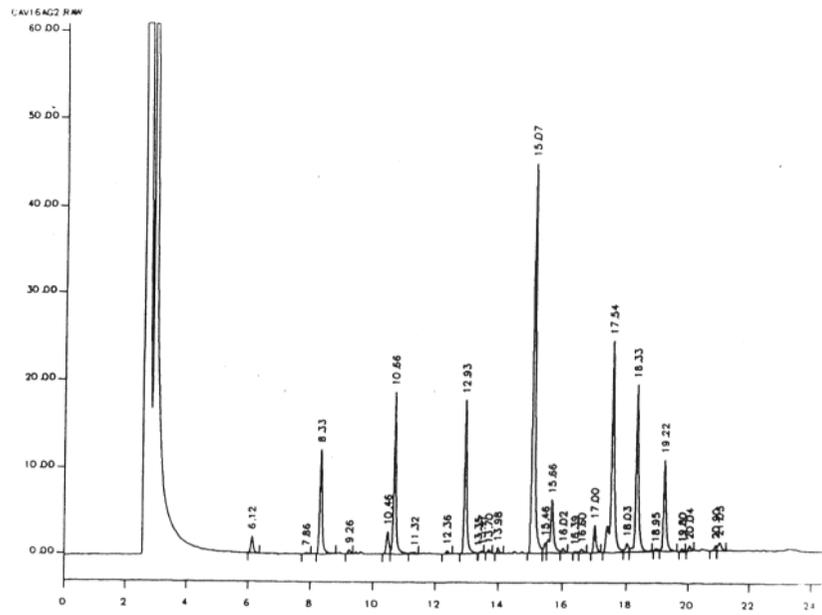


Tabella 4 - Confronto, in parallelo, tra gli acidi grassi (% peso) del latte di cavalle nutrici (v. Tab. 2) e del latte di vacca (2 campioni di massa, I e II, ciascuno ricavato dal latte di 3 allevamenti di razza Frisone).

	Latte vacca I		Latte vacca II		Latte cavalla ⁽¹⁾
	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	
C 4:0 ac. butirrico	2.43	—	1.65	—	—
C 6:0 ac. capronico	0.70	—	0.97	—	—
C 8:0 ac. caprilico	0.75	0.81	1.04	1.11	2.58
C 10:0 ac. caprinico	2.66	2.88	2.62	2.80	8.77
C 12:0 ac. laurico	3.76	4.08	3.16	3.37	9.84
C 14:0 ac. miristico	12.78	13.85	11.99	12.81	9.62
C 14:1 ac. miristoleico	0.41	—	0.43	—	—
C 15:0 ac. pentadecanoico	1.56	—	1.22	—	—
C 15:1 ac. pentadecenoico	1.33	—	1.25	—	—
C 16:0 ac. palmitico	32.56	35.30	33.67	35.97	27.95
C 16:1 ac. palmitoleico	2.08	2.26	1.26	1.34	5.35
C 17:0 ac. eptadecanoico	0.87	—	0.57	—	—
C 17:1 ac. eptadecenoico	0.46	—	0.29	—	—
C 18:0 ac. stearico	10.87	11.79	12.63	13.50	1.72
C 18:1 ac. oleico	23.42	25.39	25.45	27.18	21.11
C 18:2 ac. linoleico	2.49	2.70	1.33	1.42	7.44
C 18:3 ac. linolenico	0.87	0.94	0.47	0.50	5.62
Totale	100	100	100	100	100
Ac. grassi saturi	—	68.71	—	69.56	60.48
Ac. grassi insaturi:	—	31.29	—	30.44	39.52
a) ac. grassi monoinsaturi	—	27.65 (88) ⁽⁴⁾	—	28.52 (94) ⁽⁴⁾	26.46 (67) ⁽⁴⁾
b) ac. grassi polinsaturi	—	3.64 (12) ⁽⁴⁾	—	1.92 (6) ⁽⁴⁾	13.06 (33) ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Ripartizione % sulla base di 17 acidi grassi

⁽²⁾ Ripartizione % dei 10 principali acidi grassi

⁽³⁾ Valori medi dei latti individuali di 18 cavalle nutrici (v. Tab.2)

⁽⁴⁾ Ripartizione % degli acidi grassi insaturi, tra acidi monoinsaturi e acidi polinsaturi

Per quanto riguarda gli acidi grassi saturi, il grasso del latte di cavalla contiene minori quantità di acido stearico, controbilanciate, però, almeno in parte, da maggiori quantità di alcuni acidi grassi a più "basso" numero di atomi di carbonio, precisamente caprinico e laurico. Rimarchevole è la differenza riguardante l'acido stearico (1.72% cavalla vs 12.64% vacca), che nella vacca, ovviamente, si forma in maggiori quantità soprattutto in conseguenza della idrogenazione a livello ruminale degli acidi grassi polinsaturi di origine alimentare.

Per quanto riguarda gli acidi grassi monoinsaturi, il grasso del latte di cavalla contiene una minore quantità di acido oleico (21.11% cavalla vs 26.29% vacca), perfettamente controbilanciata da una quantità decisamente più elevata di acido palmitoleico (5.35% cavalla vs 1.80% vacca). Per gli acidi grassi polinsaturi, infine, il grasso del latte di cavalla risulta oltre che in termini "assoluti" anche relativamente più ricco di acido linolenico nei confronti di quello di vacca: il rapporto linoleico/linolenico, infatti, è pari a 1.32 nella cavalla e a 2.86 nella vacca.

d) *Confronto con i dati riportati in letteratura.* - Un primo confronto può essere fatto con i dati raccolti da Doreau e Boulou nel 1989 (14), eccetto nei casi in cui (45-48) la sommatoria degli acidi grassi considerati è diversa da 100 (Tab. 5). I dati utili, riportati nella tabella 5 - fatta eccezione per gli acidi palmitico e stearico, che insieme rappresentano da un minimo di 19.4% ad un massimo di 27.8% del totale - risultano tutti molto variabili: gli acidi monoinsaturi (palmitoleico + oleico) oscillano tra 17.3 e 46.2%; l'acido linoleico tra 3.6 e 17.6%; l'acido linolenico tra 1.5 e 26.2%.

Tabella 5 - Composizione in acidi grassi (%) del grasso del latte di cavalla: dati ripresi da Doreau e Boulot (1989) (14).

Autore	< C ₁₆ (1)	C _{16:0} + C _{18:0}	C _{16:1} + C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	Totale	
Presente ricerca	30.81 ⁽¹⁾	29.67	26.46	7.44	5.62	100	
Hilditch e Jasperson (1944)(45)	(25.7)	(19.0)	(26.4)	(7.8)	(16.0)	(94.9) ⁽²⁾	
Breckenridge e Kulsis (1967)(49)	24.8	25.2	25.7	17.6	6.7	100	
Glass et al. (1967)(50)	18.8	23.8	28.7	14.9	12.6	98.8	
Goyyaev et al. (1970)(46)	Luglio	(25.8)	(20.9)	(16.5)	(6.5)	(85.9)	
	Dicembre	(35.0)	(13.0)	(20.3)	(6.8)	(9.3)	(84.4)
Intrieri e Minieri (1970)(47)	(26.6)	(24.5)	(24.1)	(10.5)	(10.2)	(95.9)	
Jamranjav e Grigor'eva (1973)(51)	Estate	19.3	22.0	24.5	8.0	25.2	99.0
	Autunno	15.9	23.4	33.7	15.0	10.7	98.7
Jamranjav e Rabinovich (1974)(52)	18.8	20.8	23.5	10.5	25.7	99.3	
Nakae et al. (1976)(55)	27.4	25.5	17.3	12.4	17.2	99.8	
Peltonen et al. (1980)(30)	29.2	27.8	29.3	10.9	2.2	99.4	
Base e Zadrzil (1982)(48)	(23.5)	(19.6)	(27.1)	(15.9)	(8.5)	(94.6)	
Jamranjav (1982)(53)	19.1	21.4	24.1	8.1	26.2	98.9	
Jaworski et al. (1982)(54)	33.0	20.3	26.4	12.9	6.6	99.2	
Orlov e Servetnik-Chalaya (1982)(57)	Estate	25.2	23.5	33.9	8.2	10.0	100.8
	Inverno	18.6	27.8	46.2	5.2	1.5	99.3
Pastukhova e Gerbeda (1982)(56)	37.6	19.4	21.3	3.6	16.6	98.5	

⁽¹⁾ Acidi grassi indicati come inferiori a C₁₆, mentre nella presente ricerca sono rappresentati da C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0} e C_{14:0}

⁽²⁾ La sommatoria degli acidi grassi considerati è diversa da 100 e quindi riportata tra parentesi.

Il valore degli acidi grassi monoinsaturi della presente ricerca (26.46%) risulta abbastanza simile a quelli trovati da altri Autori (30, 49-54); in due casi (55, 56), però, esso è superiore, mentre in altri due (51, 57) risulta inferiore in misura consistente.

Il valore dell'acido linoleico della presente ricerca (7.44%) risulta per lo più inferiore rispetto ai valori osservati da altri Autori (30, 49-52, 54, 55); in tre casi (51, 53, 57), però, esso è simile, mentre in un caso (56) risulta superiore. Anche il valore dell'acido linolenico (5.62%), qui osservato, risulta per lo più inferiore (50-53, 55-57), ma in due casi (49, 54) esso è simile e in altri due (30, 57) considerevolmente superiore rispetto a quanto riportato in letteratura.

I valori della tabella 6 consentono di fare, entro certi limiti, un confronto più omogeneo, basato sui 10 principali acidi grassi, tenuto conto dello stadio di lattazione delle cavalle; in alcuni casi, fatto di fondamentale importanza, anche con riferimento immediato alla composizione acidica del grasso del latte di vacca.

Tabella 6 - Dati riportati in letteratura: ripartizione % dei 10 principali acidi grassi del grasso del latte di cavalla e confronto con il grasso del latte di vacca.

Autore *	N. cavalle	Periodo lattazione	N. lattati	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	Ac. gr. saturi	Ac. gr. insaturi	Ac. gr. monoins.	Ac. gr. polins.
I	18	5+35 d	18	2.58	8.77	9.84	9.62	27.95	5.35	1.72	21.11	7.44	5.62	60.48	39.52	26.46	13.06
				0.96	2.84	3.72	13.33	35.64	1.80	12.64	26.29	2.06	0.72	69.13	30.87	28.09	2.78
II	6T ⁽¹⁾	7 d	6	4.26	10.62	11.58	9.63	24.74	7.14	1.67	14.60	9.80	5.96	62.50	37.50	21.74	15.76
				5.60	12.02	12.84	9.48	21.66	6.28	1.31	16.68	8.76	5.37	62.91	37.09	22.96	14.13
III	5F ⁽²⁾	28 d	5	4.74	11.71	12.46	10.07	22.12	5.85	1.47	13.69	5.08	12.81	62.57	37.43	19.54	17.89
				5.90	15.08	14.67	10.22	20.13	5.29	1.75	12.06	8.70	6.20	67.75	32.25	17.35	14.90
IV	?	1° mo	?	presunto C ₈ , C ₁₀ , C ₁₂ , C ₁₄ → (20.89)				29.59	7.18	1.37	28.30	9.88	2.79	(51.85)	48.15	35.48	12.67
				presunto C ₈ , C ₁₀ , C ₁₂ , C ₁₄ → (16.61)				27.35	7.91	1.10	31.73	11.85	3.45	(45.06)	54.94	39.64	15.30
V	15	?	15	2.95	3.66	3.54	4.60	19.72	9.68	1.06	28.10	15.47	11.22	35.53	64.47	37.78	26.69
				1.93	3.73	3.97	12.88	30.20	2.65	12.03	27.80	3.61	1.20	64.74	35.26	30.45	4.81
VI	7	5 d	7	0.99	6.39	6.95	7.72	24.59	5.95	3.09	18.30	13.67	12.35	49.73	50.27	24.25	26.02
				1.83	5.71	7.09	8.34	25.14	3.89	2.74	20.80	11.77	12.69	50.85	49.15	24.69	24.46
VII	29	2+5 d	29	2.59	8.70	10.02	9.79	25.96	5.13	1.65	13.95	6.48	15.73	58.71	41.29	19.08	22.21
				2.83	8.16	9.09	8.83	23.59	4.01	1.57	13.90	7.63	20.39	54.07	45.93	17.91	28.02
				0.31	2.76	4.61	14.83	46.68	2.20	8.41	18.28	1.82	0.10	77.60	22.40	20.48	1.92
VIII	2	2°e 4°mo	32?	2.48	5.95	7.15	7.94	22.68	7.95	1.75	22.25	11.91	10.30	47.95	52.05	29.84	22.21

* Autori: I = Presente ricerca; II = Doreau *et al.*, 1993 (58); III = Doreau *et al.*, 1992 (9); IV = Kulisa, 1977 (59); V = Antila *et al.*, 1971(29); VI = Intrieri e Minieri, 1970 (47); VII = Csapó *et al.*, 1995 (27); VIII = Salimei *et al.*, 1996 (35).

⁽¹⁾ Cavalle definite "magne" al parto; ⁽²⁾ Razione: 95% foraggio 5% concentrato; ⁽³⁾ Razione: 50% foraggio 50% concentrato

Il valore degli acidi grassi insaturi della presente ricerca (39.52%) è in accordo con quelli di Doreau *et al.* (9), Doreau *et al.* (58) e Csapó *et al.* (27), mentre risulta inferiore rispetto ai valori di Intrieri e Minieri (47), Kulisa (59) e Salimei *et al.*

(35). Antila *et al.* (29) trovano, invece, un valore molto più elevato; cosa che si verifica, però, anche per il latte di vacca.

Il valore degli acidi grassi monoinsaturi della presente ricerca (26.46%) è sufficientemente in accordo con quelli di Inrieri e Minieri (47), Doreau *et al.* (58) e Salimei *et al.* (35), mentre risulta sensibilmente inferiore rispetto ai valori di Antila *et al.* (29) e di Kulisa (59). Doreau *et al.* (9) e Csapó *et al.* (27) osservano, invece, un valore più basso, intorno al 20%; i secondi, però, trovano un valore di monoinsaturi piuttosto basso anche per il latte di vacca.

Anche in questo caso, i dati degli acidi grassi polinsaturi risultano piuttosto variabili, in particolare quelli riguardanti l'acido linolenico, che oscillano tra il 2-3% (59) ed il 15-20% (27), contro il 5.62% trovato nella presente ricerca. Zeyner *et al.* (60) per il grasso del latte di cavalle alimentate al pascolo (con bassa integrazione di avena) e con dieta tipicamente invernale, senza verde (con elevata integrazione di avena) trovano, rispettivamente, valori di 4.43 e 1.25% di acido linolenico.

In diverse ricerche, l'acido linolenico prevale nettamente sull'acido linoleico, come indicano chiaramente i dati riportati in tabella 5 (45, 46, 51-53, 55, 56), nonché in tabella 6 (27) ed altrove (61,62); mentre in qualche caso (43), curiosamente, entrambi gli acidi grassi vengono completamente ignorati, insieme all'acido oleico. Il confronto, infine, può essere istituito anche con i risultati di altre ricerche (34, 60, 63-66).

e) *Variazione degli acidi grassi in rapporto alla fase di lattazione.* - Il grasso del latte prodotto tra il 5° ed il 15° giorno *post-partum* contiene una minore quantità di acidi grassi insaturi (38.59%) rispetto a quello della seconda metà del primo mese di lattazione (40.68%). La differenza è dovuta agli acidi grassi polinsaturi, il cui valore nella prima fase risulta mediamente inferiore (11.77%) rispetto a quello che caratterizza il grasso della seconda parte del mese (14.68%); mentre non variano gli acidi grassi monoinsaturi. Il fenomeno interessa in ugual misura sia l'acido linoleico sia l'acido linolenico.

Le variazioni qui osservate concordano abbastanza bene con quanto riportato da Kulisa (59) nel confronto tra 1° e 2° mese di lattazione e da Csapó *et al.* (27) nel confronto tra le fasi 2+ 5 e 8+ 45 giorni di lattazione, come indicano chiaramente i dati illustrati nella tabella 6. Inrieri e Minieri (47) confrontando il latte di 5 giorni con quello di 2 mesi trovano variazioni limitate e contrarie (più acidi grassi polinsaturi a 5 giorni) rispetto a quelle osservate nella presente ricerca.

Lo stesso vale per Doreau *et al.* (58) nel confronto tra il latte di 7 giorni e quello di 28 giorni, prodotto da cavalle "magre" al parto, ma con variazioni molto più limitate (Tab. 6). Questi ultimi Autori (58), sempre nel confronto tra 7° e 28° giorno, trovano, invece, variazioni molto importanti per quanto riguarda la composizione acidica del latte prodotto da cavalle "grasse" al parto (più insaturi, più monoinsaturi, più polinsaturi e più acido linoleico nel latte di 7 giorni) e contrastanti rispetto a quanto osservato in questa ricerca.

f) *Variazione degli acidi grassi in rapporto all'alimentazione.* - Il grasso del latte delle cavalle (n=6) alimentate pressoché esclusivamente con fieno (F) tende ad essere maggiormente provvisto di acidi grassi insaturi (41.15%) rispetto a quello delle cavalle (n=12) alimentate con fieno e concentrato (F+C) (38.71%). La differenza a favore del regime "fieno" è legata ad una maggiore proporzione di acidi grassi monoinsaturi (30.77% F vs 24.30% F + C), in parte controbilanciata da una minore proporzione di acidi grassi polinsaturi (10.38% F vs 14.41% F + C). Gli acidi grassi maggiormente interessati sono due: l'acido oleico, che risulta più presente nel grasso del latte delle cavalle alimentate pressoché esclusivamente con fieno (25.12% F vs 19.10% F + C) e l'acido linoleico, nettamente più rappresentato, invece, nel grasso del latte delle cavalle alimentate con fieno + concentrato (4.45% F vs 8.93% F + C).

Variazioni analoghe, anche se non sempre della stessa entità, sono riportate da Doreau *et al.* (9), che mediante alimentazione a base di fieno trovano più acido oleico e meno acido linoleico, oltre che minori proporzioni degli acidi grassi caprinico e laurico (Tab. 6). In particolare, però, gli Autori francesi (9), rispetto ad un regime costituito da 50 parti di fieno e 50 parti di concentrato osservano che il regime a solo fieno determina una proporzione pressoché doppia di acido linolenico, cosa che non si verifica nella presente ricerca.

I dati rilevati da Doreau *et al.* (9) appaiono in accordo con la composizione acidica dei lipidi alimentari: il fieno in generale, infatti, è decisamente più ricco di acido linolenico (30-40% F vs 8-10% C) e più povero di acido linoleico (20-25% F vs 50-55% C) rispetto al concentrato (67). Non c'è riscontro, invece, per l'acido oleico, in quanto, pur essendo normalmente più presente nel concentrato (8-10% F vs 20-25% C), risulta ugualmente più contenuto nel grasso del latte delle cavalle alimentate prevalentemente a base di fieno.

Anche le forti variazioni stagionali osservate da alcuni Autori (46, 51, 57), soprattutto a carico dell'acido linolenico, sono molto probabilmente dovute all'influenza dei fattori alimentari, il cui ruolo sotto questo profilo è preponderante, come si ricava anche dalle recenti osservazioni sperimentali di Zeyner *et al.* (60).

Conclusioni

I risultati della ricerca indicano che il latte di cavalla del primo mese di lattazione - prodotto in alcuni allevamenti del nord Italia - risulta moderatamente provvisto di grasso e caratterizzato dalla presenza di una discreta ma non ottimale proporzione di acidi grassi polinsaturi. Il contenuto di grasso appare sufficientemente in accordo con quanto riportato in letteratura per i diversi tipi genetici e le più disparate condizioni alimentari, mentre non può dirsi altrettanto per quanto riguarda la sua composizione acidica.

La moderata proporzione degli acidi grassi insaturi, in particolare di quelli polinsaturi, trova riscontro soltanto con quanto osservato nelle condizioni di allevamento praticate in Francia, mentre significativamente diverso risulta il profilo acidico del grasso del latte delle cavalle allevate nei paesi dell'est europeo e dell'ex Unione Sovietica, probabilmente in relazione alla maggiore diffusione del pascolo.

Nelle condizioni praticate presso alcuni allevamenti nazionali l'impiego di quantità significative di concentrato, in proporzioni variabili intorno al 30-35% della sostanza secca, sembra essere in grado di determinare una diminuzione del contenuto in grasso del latte ed una minore presenza di acidi grassi polinsaturi, in particolare di acido linolenico. Questo dato specifico e, più in generale, un impoverimento biotrofico-nutrizionale del latte prodotto durante il primo mese di lattazione potrebbe essere non privo di conseguenze nei riguardi dello sviluppo armonico e dello stato di salute del puledro.

Parole chiave: latte cavalla, grasso, acidi grassi, acidi grassi insaturi, acido linolenico.

Key words: mare milk, fat, fatty acids, unsaturated fatty acids, linolenic acid.

RIASSUNTO - Sono stati analizzati 18 latti individuali prelevati tra il 5° e il 35° giorno di lattazione da altrettante cavalle nutrice, di età compresa tra 3 e 22 anni (1+16 parti), alimentate con fieno *ad libitum* e in prevalenza con 4-5 kg di concentrato del commercio. Il grasso è stato determinato con Milko-Scan 134A/B; gli acidi grassi mediante gascromatografia capillare. Il contenuto di grasso, variabile tra 0.76 e 2.10%, risulta mediamente (\pm DS) pari a $1.18 \pm 0.39\%$. Gli acidi grassi insaturi rappresentano il $39.52 \pm 8.24\%$ del totale: valore discretamente inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura. Ciò a causa di una moderata presenza degli acidi grassi polinsaturi C_{18:2} e C_{18:3} ($13.06 \pm 4.91\%$), in particolare di acido linolenico ($5.62 \pm 2.45\%$); mentre le proporzioni degli acidi grassi monoinsaturi appaiono nella norma ($5.35 \pm 1.15\%$ ac. palmitoleico; $21.11 \pm 6.37\%$ ac. oleico). Le variazioni osservate sono molto probabilmente da mettere in relazione con l'impiego nell'alimentazione delle cavalle nutrici di abbondanti quantità di concentrato.

SUMMARY - *Fat content and fatty acid composition of nursing mare milk produced in the first month of lactation.* Eighteen individual milk samples from the same number of nursing mares, taken between the 5th and the 35th lactation day were analysed. The mares, from 3 to 22 years of age (1+ 16 parturitions) were fed with hay *ad libitum* and mostly with 4-5 kg of commercial concentrate. Fat was determined with Milko-Scan 134A/B; fatty acids by GC with glass capillary column. Fat content results on average (\pm SD) 1.18 \pm 0.39%. Unsaturated fatty acids represent 39.52 \pm 8.24% of the total. The value results quite lower than that reported in literature, due to a low presence of the PUFA C_{18:2} and C_{18:3} (13.06 \pm 4.91%), in particular of linolenic acid (5.62 \pm 2.45%); while the proportions of the monounsaturated fatty acids appear as norm (5.35 \pm 1.15% palmitoleic acid; 21.11 \pm 6.37% oleic acid). The observed variations are most probably related to the massive use of concentrate in the mares diets.

BIBLIOGRAFIA

- 1) DOREAU M., BOULOT S., MARTIN-ROSSET W., ROBELIN J. (1986). Relationship between nutrient intake, growth and body composition of the nursing foal. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 26 (2B), 683-690.
- 2) SMOLDERS E.A.A., VAN DER VEEN N.G., VAN POLANEN A. (1990). Composition of horse milk during the suckling period. *Livest. Prod. Sci.*, 25, 163-171.
- 3) MARTIN R.G., McMENIMAN N.P., DOWSETT K.F. (1992). Milk and water intakes of foals sucking grazing mares. *Equine Vet. J.*, 24, 295-299.
- 4) MUNDY G.D. (1993). Nutrient requirements for the growing horse. *Vet. Clin. Nutr.*, 1 (3), 142-146.
- 5) THATCHER C.D. (1991). Nutritional aspects of developmental orthopedic disease in growing horses. *Veterinary Medicine*, 7, 743-747.
- 6) MAGNI L. (1997). L'alimentazione del puledro. *Obiettivi e Doc. Vet.*, 17 (6), 27-31.
- 7) JEFFCOTT L. (1997). Osteochondrosis in horses. *Equine Pract.* 43, 64-71.
- 8) DOREAU M. (1994). Le lait de jument et sa production: particularités et facteurs de variation. *Lait*, 74, 401-418.
- 9) DOREAU M., BOULOT S., BAUCHARTE D., BARLET J.-P., MARTIN-ROSSET W. (1992). Voluntary intake, milk production and plasma metabolites in nursing mares fed two different diets. *J. Nutr.*, 122, 992-999.
- 10) SARDESAI V.M. (1992). Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem.*, 3, 154-166.
- 11) SALIMEI E., BONTEMPO V., FANTUZ F., CHIOFALO B., ZIINO M., TOPPINO P.M., DELL'ORTO V. (1995). Somministrazione di olio di pesce a cavalle in lattazione: effetti sulle caratteristiche qualitative del latte. *Atti S.I.S.Vet.*, 49, 939-940.
- 12) MUSSA P.P., MEINER G. (1997). Acidi grassi polinsaturi. *Obiettivi e Doc. Vet.*, 18 (10), 13-19.
- 13) WOLTER R. (1996). Osteocondrosi e alimentazione nel cavallo. *Riv. Soc. Ital. di Ippologia*, 2 (2), 27-32.
- 14) DOREAU M., BOULOT S. (1989). Recent knowledge on mare milk production: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 22, 213-235.
- 15) DOREAU M. (1992). Le lait de jument. *Equ'idée*, 6, 55-63.
- 16) SOLAROLI G., PAGLIARINI E., PERI C. (1993). Composition and nutritional quality of mare's milk. *Ital. J. Food. Sci.*, 5 (1), 3-10.
- 17) AOAC (1990). Fat in milk: Modified Mojonnier ether extraction method. In "Official Methods of analysis". (ed. by K. Helrich). Assoc. Off. Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia, USA 811-812.
- 18) KNAPP D.R. (1987). Handbook of analytical derivatization reactions. John Wiley & Sons, New York, USA 154.
- 19) ANON. (1963). <<Determinazione del grado di acidità del latte secondo Sokhlet-Henkels>>. *Milchwissenschaft*, 18, 520.
- 20) BIGGS D.A. (1978). Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61, 1015-1034.
- 21) ASCHAFFENBURG R., DREWRY J. (1959). New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. *XVth Int. Dairy Congr.*, 3, 1631-1637.
- 22) INTRIERI F., MINIERI L. (1969). Sulla composizione chimica del latte di cavalla: indagini su soggetti di razza Avelignese. *Atti S.I.S.Vet.*, 23, 558-561.
- 23) KULISA M. (1977). <<Composition of milk from mares of three breeds with special reference to N-acetylneuraminic acid>>. *Acta Agraria Silvestria. Zootechnica*, 17, 25-37.
- 24) GIBBS P.G., POTTER G.D., BLAKE R.W., McMULLAN W.C. (1982). Milk production of Quarter Horse mares during 150 days of lactation. *J. Anim. Sci.*, 54, 496-499.
- 25) OTTEDAL O.T., HINTZ H.F., SCHRYVER H.F. (1983). Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. *J. Nutr.*, 113, 2096-2106.
- 26) MARIANI P., MARTUZZI F., CATALANO A.L. (1993). Composizione e proprietà fisico-chimiche del latte di cavalla: variazione dei costituenti azotati e minerali nel corso della lattazione. *Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma*, 13, 43-58.
- 27) CSAPO J., STEFLER J., MARTIN T.G., MAKRAY S., CSAPO-KISS Zs. (1995). Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. *Int. Dairy Journal* 5, 393-402.
- 28) LINTON R.G. (1937). The composition of mare's milk. II. The variation in composition during lactation. *J. Dairy Res.*, 8, 143-172.
- 29) ANTILA V., KYLÄ-SIUROLA A.L., UUSI-RAUVA E., ANTILA M. (1971). Untersuchungen über die finnische Pferdemilch. *Suomen Kemistilehti*, B 44, 193-196.
- 30) PELTONEN T., KOSSILA V., ANTILA V., HUIDA L. (1980). Effect of protein supplementation on milk composition of the mare and growth rate of their foals. *XXXIst Annu. Meet. Europ. Assoc. Anim. Prod.*, München, Germany, 6 pp.
- 31) STORCH G. (1985). <<Composition and properties of mare's milk and Koumiss with particular regard to dietetic aspects>>. Thesis, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany, 98 pp.
- 32) DAVISON K.E., POTTER G.D., GREENE L.W., EVANS J.W., MCMULLAN W.C. (1991). Lactation and reproductive performance of mares fed added dietary fat during late gestation and early lactation. - *J. Equine Vet. Sci.*, 11, 111-115.
- 33) KUBIAK J.R., EVANS J.W., POTTER G.D., HARMS P.G., JENKINS W.L. (1991). Milk yield and composition in the multiparous mare fed to obesity. *J. Equine Vet. Sci.*, 11, 156-162.
- 34) PAGLIARINI E., SOLAROLI G., PERI C. (1993). Chemical and physical characteristics of mare's milk. *Ital. J. Food Sci.*, 5 (4), 323-332.
- 35) SALIMEI E., BONTEMPO V., DELL'ORTO V. (1996). Nutritional status of the foals related to the age and to mare's feeding. *Pferdeheilkunde* 12, 245-248.
- 36) SMITH R.S. (1974). The composition of mares' milk as affected by dietary fat and stage of lactations. Thesis. The Ohio State Univ., Columbus. Cit. da Gibbs *et al.* (1982) (24).
- 37) NESENI R., FLADE E., HEIDLER G., STEGER H. (1958). <<Yield and composition of mare's milk in the course of lactation>>. *Arch. Tierzucht.*, 1, 91-129.
- 38) ULLREY D.E., STRUTHERS R.D., HENDRICKS D.G., BRENT B.E. (1966). Composition of mare's milk. *J. Anim. Sci.*, 25, 217-222.
- 39) LUKAS V.K., ALBERT W.W., OWENS F.N., PETERS A. (1972). Lactation of Shetland mares. *J. Anim. Sci.*, 34, 350.
- 40) BOUWMAN H., VAN DER SCHEE W. (1978). Composition and production of milk from Dutch warmblooded saddle horse mares. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkd.*, 40, 39-53.
- 41) DOREAU M., BOULOT S., BARLET J.-P., PATUREAU-MIRAND PH. (1990). Yield and composition of milk from lactating mares: effect of lactation stage and individual differences. *J. Dairy Res.*, 57, 449-454.
- 42) WILLICH J. (1997). <<Effect of activity of amylase and lipase activity on total protein, glucose and lipids in mare milk during lactation>>. Thesis, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany, V+182 pp.
- 43) TSUJII H., OTANI H., HOSONO A. (1985). Characteristics of body measurements and milk composition of Kiso horse. *Japan. J. Dairy Food Sci.*, 34(5), A117-A122.
- 44) FUENTES-GARCIA F., GONZALO ABASCAL C., DE CASTILLO CARACUEL A., QUILES SOTILLO A., VINUESA SILVA M. (1991). <<Preliminary study on composition of the colostrum from mares of Spanish (Andalusian) breed and its evolution to milk>>. *Archivos de Zootechnia*, 40, 153-160.
- 45) HILDITCH T.P., JASPERSON H. (1944). The component acids of milk fats of the goat, ewe and mare. *Biochem. J.*, 38, 443-447.
- 46) GORYAEV M.I., SHAFIEVA L.K., DENISOVA L.G. (1970). Fatty acid composition of fat in mares milk and Koumiss. *Molotshnaya Promyshlennost*, 31, 22-24.
- 47) INTRIERI F., MINIERI L. (1970). Sul contenuto in acidi grassi della quota lipidica del colostro e del latte di cavalla. Indagini su soggetti di razza Avelignese. *Acta Medica Veterinaria*. 16 (1-2), 89-98.
- 48) BASE J., ZADRAZIL K. (1982). Fatty acids of milk fat in mare's milk. *XXIst Int. Dairy Congr.*, 1 (2), 621-622.
- 49) BRECKENRIDGE W.C., KUKSIS A. (1967). Molecular weight distribution of milk fat triglycerides from seven species. *J. Lipid Res.*, 8, 473-478.
- 50) GLASS R.L., TROOLIN H.A., JENNESS R. (1967). Comparative biochemical studies of milks. IV. Constituent fatty acids of milk fats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 22, 415-425.
- 51) JAMSRANJAV N., GRIGOR'eva V.N. (1973). Distribution of fatty acids in glycerides of mare's milk lipids. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Pishch. Tekhnol.*, 5, 34-36.
- 52) JAMSRANJAV N., RABINOVICH P.M. (1974). Fatty acid composition of mare milk fat. *Molochnaya Promyshlennost*, 1, 45-46.
- 53) JAMSRANJAV N. (1982). Cow and mare milk fatty acid composition. *XXIst Int. Dairy Congr.*, 1 (2), 195-196.
- 54) JAWORSKY J., JAWORSKA H., TOMCZYNSKI R., SMOCZYNSKI S. (1982). Skład kwasow tłuszczowych tłuszczu mleka klaczy w okresie laktacji. *Zesz. Nauk. Akad. Roln. Tech. Olsztynie*, 17, 85-94.
- 55) NAKAE T., KATAOKA K., MIYAMOTO T. (1976). <<Studies on chemical properties of milk and milk products produced in Mongolia>>. *Bull. Fac. Agric. Okayama Univ.*, 48, 63-67.
- 56) PASTUKHOVA Z.M., GERBEDA V.V. (1982). <<Comparative study of the lipid composition of mare's milk and Koumiss mixture prepared on the basis of cow's milk>>. *Voprosy Pitania*, 1, 34-36.
- 57) ORLOV V.K., SERVETNIK-CHALAYA G.K. (1982). Some physicochemical characteristics of fat and fatty acid composition of mare's milk and shubath lipids. *Voprosy Pitania*, 2, 59-61.
- 58) DOREAU M., BOULOT S., CHILLIARD Y. (1993). Yield and composition of milk from lactating mares: effect of body condition at foaling. *J. Dairy Res.*, 60, 457-466.
- 59) KULISA M. (1977). <<The contents of certain free amino acids and fatty acids in the milk of Arabian Malopolski and Huculski mares>>. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 4, 79-89.
- 60) ZEYNER A., GEISSLER C., PESCHKE I., JOPE R., KNY G. (1996). <<Investigation on fatty acid composition in mare milk>>. *Pferdeheilkunde*, 12, 213-219.
- 61) HILDITCH T.P. (1956). The chemical constitution of natural fats. Chapman & Hall, Ltd., London (da Ling *et al.*, 1961) (62).
- 62) LING E.R., KON S.K., PORTER W.G. (1961). The composition of milk and the nutritive value of its components. In "Milk: the mammary gland and its secretion" Vol.2 (ed. by S.K. Kon & A.T. Cowie) Academic Press. Inc., New York, USA 195-263.
- 63) DELL'ORTO V., SALIMEI E., BONTEMPO V., FANTUZ F., TOPPINO P.M., CONTARINI G. (1993). Produzione e composizione di latte equino: osservazioni sperimentali. *Atti S.I.S.Vet.*, 47, 2073-2077.
- 64) SEITOV Z.S., HLYBOVA' G.K. (1982). Fatty acid content of mare milk. *XXIst Int. Dairy Congr.* 1 (2), 630.
- 65) PARODI P.W. (1982). Positional distribution of fatty acids in triglycerides from milk of several species of mammals. *Lipids*, 17, 437-442.
- 66) STOYANOVA L.G., ABRAMOVA L.A., LADODO K.S. (1988). Freeze-dried mares' milk and its potential use in infant and dietetic food products. *Voprosy Pitania*, 2, 64.
- 67) MORETTI V.M., MAGGI G.L., POLIDORI P., VALFRE' F. (1993). Isomeri di acidi grassi insaturi nel latte. *Atti Congr. Naz. Assoc. Sci. Prod. Anim.*, 10, 235-240.

FONTI DI VARIAZIONE DEL BODY CONDITION SCORE IN BOVINE DI RAZZA FRISONA ITALIANA, BRUNA ITALIANA E REGGIANA. (1)

Sabbioni A.(2,3), Superchi P.(2), Bonomi A.(2), Fontana F.(2), Maggiali A.(2)

(1) Ricerche effettuate con il contributo finanziario del M.U.R.S.T. (fondi locali per la ricerca).

(2) Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Parma. Direttore : Prof. A.Bonomi. Il piano, l'esecuzione delle indagini e le conclusioni spettano in parti uguali agli AA. (Prof. A.Bonomi)

(3) Indirizzo per corrispondenza - Corresponding author (e-mail sabbioni@unipr.it).

Introduzione

E' noto che la bovina da latte, nelle fasi iniziali della lattazione, deve far ricorso alle proprie riserve energetiche, costituite essenzialmente dai grassi di deposito. Tale lipomobilizzazione determina, da un lato, una riduzione del peso vivo e, dall'altro, un peggioramento dello stato di condizione corporea dell'animale. Poiché la variazione del primo non appare correlata con l'adiposità ($r = 0,42$), a differenza di quella della seconda ($r = 0,97$) (Butler-Hogg e coll., 1985), sono stati messi a punto diversi sistemi di punteggio dello stato di ingrassamento (body condition score, BCS) che fanno appunto riferimento alla entità dei depositi adiposi sottocutanei della bovina per esprimere una stima della adiposità globale (E.S.C.A., 1976; Bazin, 1984; A.D.A.S., 1986; Edmonson e coll., 1989). Tali metodi risultano di facile apprendimento e di pratico utilizzo in azienda, non solo da parte del veterinario, ma anche dell'allevatore, a patto che la scala di riferimento del punteggio e le regioni interessate dalla valutazione siano uguali.

Il BCS risente fortemente della azione di fattori di variazione legati all'ambiente di allevamento, alle condizioni manageriali e di alimentazione, oltre che di fattori individuali, quali età, stadio fisiologico e tipo genetico.

Il presente lavoro ha avuto quindi la finalità di individuare le principali fonti di variazione del body condition score nell'ambito di un allevamento di bovine da latte. Poiché, in parte, questi sono stati anche gli obiettivi di una nostra precedente indagine (Sabbioni e coll., 1997), la presente, accanto ad una conferma dei risultati già ottenuti, ha inteso ampliare gli obiettivi, estendendo i rilievi a soggetti appartenenti ad una razza a duplice attitudine, la Reggiana, allevati in purezza o incrociati con soggetti delle razze Frisona e Bruna. Un secondo obiettivo è stato quello di valutare la convenienza e la fattibilità di una semplificazione della metodica, attraverso l'esame mirato di un numero ristretto di regioni.

Materiali e metodi.

La prova è stata condotta su 63 bovine da latte, allevate presso una azienda della provincia di Reggio Emilia, nel periodo compreso fra maggio 1995 e febbraio 1996. Le bovine appartenevano alle razze Frisona italiana (F), Bruna italiana (B) e Reggiana (R). Erano inoltre presenti bovine meticce, originate dagli incroci Frisona x Bruna, Bruna x Frisona, Reggiana x Bruna e Reggiana x Frisona. Data l'esiguità del loro numero, i quattro tipi genetici incrociati sono stati raggruppati in due classi (FB/BF, comprendente i primi due e RB/RF comprendente gli ultimi due).

L'azienda, nella quale la prova è stata condotta, presentava la stabulazione fissa e, producendo latte destinato alla trasformazione in formaggio Parmigiano-Reggiano, l'alimentazione era costituita solo da fieno e/o foraggio verde, oltre che da mangimi complementari del commercio, forniti attraverso autoalimentatori a programmazione individuale.

La valutazione del BCS è stata condotta da parte di due operatori, adottando il metodo proposto da Bazin (1984), che prevede l'esame visivo dell'animale posteriormente e di fianco. Il criterio di valutazione posteriore (PO) prende in considerazione: a) la base della coda e la punta della natica (PO1); b) il legamento sacro-tuberale (PO2); c) la fossa caudale (PO3); d) la spina dorsale (PO4). L'esame del fianco destro (F1) è rivolto: a) alla punta dell'anca (F11); b) alle apofisi trasverse e spinose (F12).

A ciascuna delle sei zone considerate si può attribuire un punteggio da 0 a 5 con scatti di 0,5 punti; quindi si ottiene la media dei punteggi per ciascun dei due criteri di posizionamento (posteriore e di fianco) e successivamente il valore del BCS dalla media di questi ultimi. In tale modo il BCS tiene conto di eventuali deposizioni "preferenziali" di tessuto adiposo fra una regione ed un'altra, permettendo così di correggere la valutazione finale sulla base delle differenze individuali fra un soggetto ed un altro (Speroni e coll., 1991). Le valutazioni sono state effettuate a cadenza mensile, su tutte le bovine, nei giorni immediatamente precedenti o successivi ai controlli funzionali operati dall'Associazione Provinciale Allevatori, in modo tale da usufruire del dato produttivo di ciascun animale. La prova è stata preceduta da un periodo di addestramento dei valutatori alla applicazione del metodo.

I dati sono stati elaborati ricorrendo a due modelli distinti a seconda della fase fisiologica degli animali (in asciutta o in lattazione), attraverso la procedura GLM del SAS (1989). La tabella n.1 riporta la numerosità delle osservazioni per ciascun livello dei fattori razza e ordine di parto e per ciascun modello. In particolare sugli animali in asciutta è stato applicato il seguente modello lineare:

$$Y_{ijkl} = \mu + V_i + R_j + OP_k + (VR)_{ij} + b_1 X1_{ijkl} + b_2 X1^2_{ijkl} + b_3 X1^3_{ijkl} + b_4 X2_{ijkl} + \epsilon_{ijkl}$$

ove: Y_{ijkl} = singola osservazione;

• = media generale;

V_i = effetto fisso del valutatore ($i = 1,2$);

R_j = effetto fisso della razza ($j = B, F, BF/FB, R, RB/RF$);

OP_k = effetto fisso dell'ordine di parto ($k = 1,2,3,= 4$);

$(VR)_{ij}$ = interazione valutatore * razza;

b_1, b_2, b_3, b_4 = coefficienti di regressione con la durata del periodo di asciutta ($X1$) al momento della valutazione, in forma lineare, quadratica e cubica, e con la produzione equivalente vacca matura (EVM) ($X2$);

Sugli animali in lattazione il modello lineare adottato è stato il seguente:

$$Y_{ijklm} = \mu + V_i + R_j + OP_k + (VR)_{ij} + M_l + b_1 X1_{ijklm} + b_2 X2_{ijklm} + \epsilon_{ijklm}$$

ove: M_l = effetto fisso dei mesi di distanza dal parto ($l = 1, \dots, 10$);

b_1, b_2 = coefficienti di regressione con l'EVM ($X1$) e con la produzione di latte al momento del controllo ($X2$).

Sono state calcolate le medie stimate per ciascun livello di ogni fattore sia per il BCS, sia per ciascuna delle valutazioni relative alle sei aree anatomiche citate in precedenza (PO1, PO2, PO3, PO4, F11, F12), che per i criteri di posizionamento del valutatore (PO, F1). Inoltre

sono state calcolate le correlazioni semplici fra il BCS e le valutazioni a livello di ciascuna regione e di ciascun criterio di posizionamento, nonché fra il BCS e le principali variabili temporali e produttive legate alla fase fisiologica degli animali (giorni di distanza dal parto, produzione al momento del controllo, produzione EVM, giorni di asciutta).

Risultati e discussione

Il campione delle bovine sottoposte a valutazione era costituito essenzialmente da soggetti appartenenti alle razze Bruna italiana (42%) e Frisona italiana (28%). Le bovine di razza Reggiana rappresentavano il 13% delle osservazioni e le meticce, nel complesso, il 18% (tabella n.1).

Tabella n.1 - Numero delle osservazioni in relazione allo stadio fisiologico delle bovine, all'ordine di parto e alla razza.

Table 1 - Observations number in relation to the physiological stage of cows, parity and breed.

	Fase di asciutta - <i>Dry period</i>					Fase di lattazione - <i>Lactation period</i>				
	1	2	3	≥4	Totale	1	2	3	≥4	Totale
Ordine di parto - <i>Parity</i>										
Razza - <i>Breed</i>										
F	10	4	14	22	50	38	40	46	124	248
B	30	26	2	12	70	120	106	70	86	382
FB/BF	4	4	-	-	8	12	20	-	2	
R	8	28	4	-	40	8	74	18	-	100
RB/RF	16	12	4	-	32	34	42	42	-	118
TOTALE - <i>All</i>	68	74	24	34	200	212	282	176	212	882

Legenda : F = Frisona it. - *It. Friesian*; B = Bruna it. - *It. Brown* ; FB/BF = incroci fra le razze F e B - *Crosses between F and B* ; R = Reggiana ; RB/RF = incroci fra le razze R, B e F - *Crosses between R, B and F*.

E' da notare che la metodica adottata per la valutazione è stata inizialmente proposta per bovine di razza Frisona, dalle spiccate caratteristiche lattifere. Già nostre precedenti indagini (Sabbioni e coll., 1997) avevano messo in luce la buona flessibilità del metodo, adattabile anche a soggetti di razza Bruna. Nella presente indagine è stato possibile verificare che, anche su soggetti di razza Reggiana, caratterizzati da una struttura e da una copertura muscolare sicuramente maggiori, non sono stati messi in evidenza particolari limiti metodologici. Gallo e coll. (1997) hanno applicato il sistema di valutazione, proposto da Edmonson e coll. (1989) per bovine di razza Frisona, a bovine di razza Rendena, giungendo alla conclusione che le seconde presentano una lipomobilizzazione di entità inferiore rispetto alle prime e che, pertanto, per le razze a duplice attitudine dovrebbero essere individuati valori di riferimento specifici.

Nella tabella n.2 sono riportati i valori medi (\pm d.s.) dei parametri oggetto di rilevazione sulle bovine in lattazione e in asciutta. E' necessario notare che i due campioni di animali si riferiscono in realtà alla stessa popolazione, valutata in momenti diversi del proprio ciclo produttivo, dal momento che, nell'arco dei dieci mesi di prova, la quasi totalità dei soggetti è passata da un campione all'altro. L'esame della tabella ci permette di mettere in evidenza le principali differenze legate allo stadio fisiologico degli animali. I valori medi riferiti a ciascuna localizzazione, nelle bovine in lattazione, sono risultati più bassi dei corrispondenti rilevati su quelle in asciutta, con differenze oscillanti dal 27% della localizzazione FI2 al 50% delle PO2 e PO3. Il valore finale del BCS ha presentato una variazione, dalla lattazione all'asciutta, pari al 38%.

Tabella n.2 - Parametri rilevati ($\bar{x} \pm d.s.$) e coefficienti di correlazione con il BCS (r).
 Table 2 - Mean ($\bar{x} \pm s.d.$) of recorded parameters and correlation coefficients with BCS (r).

Parametro - item	Bovine in lattazione - Lactating cows		Bovine in asciutta - Dry cows	
	media \pm d.s.	r	media \pm d.s.	r
	mean \pm s.d.		mean \pm s.d.	
PO1	2.10 \pm 0.88	0.822	2.99 \pm 0.71	0.755
PO2	2.28 \pm 0.93	0.814	3.41 \pm 0.82	0.764
PO3	2.21 \pm 0.90	0.839	3.31 \pm 0.89	0.850
PO4	2.27 \pm 0.85	0.853	3.07 \pm 0.78	0.840
FI1	2.13 \pm 0.84	0.890	2.91 \pm 0.74	0.832
FI2	2.30 \pm 0.85	0.829	2.91 \pm 0.81	0.871
PO	2.22 \pm 0.80	0.928	3.20 \pm 0.69	0.926
FI	2.21 \pm 0.79	0.925	2.91 \pm 0.71	0.930
BCS	2.21 \pm 0.74	-	3.05 \pm 0.65	-
DIM	171 \pm 97	0.128	-	-
DIM'	-	0.197	-	-
DIM''	-	0.220	-	-
DD	-	-	56 \pm 40	0.343
DD'	-	-	-	0.267
DD''	-	-	-	0.187*
EVM kg	6421 \pm 903	-0.090*	6538 \pm 1117	-0.230
MILK kg	18.41 \pm 6.34	-0.158	-	-

* = $P < 0.01$. Tutti gli altri coefficienti di correlazione sono significativi ($P < 0.001$) -
 All others coefficients are significative ($P < 0.001$).

Legenda : PO1, PO2, PO3, PO4, FI1, FI2, PO, FI : vedi testo - see text ; DIM : giorni di distanza dal parto - days in milk ; DD : giorni dall'inizio dell'asciutta - days dry ; EVM : produzione equivalente vacca matura - mature equivalent milk production ; MILK : produzione di latte (kg) al momento della valutazione - actual milk production.

In una nostra precedente indagine (Sabbioni e coll., 1997) le valutazioni della condizione corporea erano state più basse nelle bovine in lattazione, rispetto a quelle in asciutta, con differenze oscillanti, a seconda della regione, fra il 24% e il 30%.

E' da rilevare che i valori di BCS delle bovine in lattazione si riferiscono a soggetti già in fase di recupero della condizione corporea (171 \pm 97 d di lattazione) e che quindi le differenze con quelle in asciutta potrebbero raggiungere valori più elevati, se si facesse riferimento a momenti del ciclo produttivo più vicini al picco di lattazione.

La stessa tabella n.2 mette in luce le correlazioni semplici, sempre molto elevate ($P < 0.001$), fra BCS e valutazioni effettuate a livello di singole regioni e quelle fra BCS e distanza in giorni dal parto o dall'inizio dell'asciutta. E' interessante notare come la correlazione con i giorni di distanza dal parto (DIM) nel campione delle bovine in lattazione sia positiva e che la significatività dei coefficienti aumenti, passando dalla forma lineare della variabile indipendente alla cubica. Ciò conferma l'andamento curvilineo del BCS ed è in accordo con precedenti indagini (Waltner e coll., 1993; Gallo e coll., 1996; Sabbioni e coll., 1997). Al contrario, nel campione delle bovine in asciutta, la significatività del coefficiente di correlazione fra BCS e giorni di asciutta diminuisce, passando dalla forma lineare della variabile indipendente alla cubica. Anche questo reperto conferma i risultati di precedenti indagini (Bittante e coll., 1994; Hady e coll., 1994; Sabbioni e coll., 1997) e si presta alla interpretazione di una sostanziale linearità del valore, ben inteso nell'ambito di una durata normale del periodo di asciutta (56 d \pm 40).

Circa i rapporti fra BCS e livello produttivo, essi sono risultati negativi e di maggiore entità nel campione con produzione EVM più alta.

La tabella n.3 riporta i risultati delle valutazioni effettuate sul campione delle bovine in asciutta, suddivisi in base agli effetti fissi del valutatore, della razza e dell'ordine di parto e agli effetti continui della distanza in giorni dall'inizio dell'asciutta e della produzione EVM. Il modello adottato spiega una quota della varianza oscillante dal 38% di PO1 al 58% del BCS.

Tabella n.3 - Variazione delle valutazioni nelle diverse regioni e del BCS in relazione ad alcuni fattori nelle bovine in asciutta (medie stimate).
 Table 3 - Partial scores and BCS changes in relation to some factors in dry cows (least square means).

Parametro		PO1	PO2	PO3	PO4	FI1	FI2	PO	FI	BCS
VALUTATORE - OPERATOR	1	2.89	3.23	3.05	2.90	2.63	2.67	3.02	2.65	2.83
	2	2.77	3.26	3.04	2.89	2.58	2.75	2.99	2.67	2.83
RAZZA - BREED	B	2.51b	2.73a	2.63b	2.71b	2.64b	2.78b	2.65b	2.71b	2.68b
	F	3.16c	3.54b	3.42c	2.88b	2.89bc	2.60b	3.25c	2.75b	3.00c
	FB/BF	1.93a	2.26a	1.75a	2.10a	1.37a	1.79a	2.01a	1.58a	1.79a
	R	3.34c	3.93c	3.50c	3.52c	2.94bc	3.19c	3.57d	3.06c	3.32d
	RB/RF	3.21c	3.75bc	3.92d	3.27c	3.18c	3.19c	3.54d	3.18c	3.36d
ORDINE DI PARTO - PARITY	1	3.10b	3.58c	3.34b	3.33c	3.00c	3.19b	3.34c	3.09c	3.21c
	2	2.87a	3.35b	3.37b	2.84b	2.74b	2.58a	3.11b	2.66b	2.88b
	3	2.65a	2.96a	2.65a	2.36a	2.27a	2.41a	2.66a	2.34a	2.50a
	≥4	2.70a	3.08ab	2.82a	3.05b	2.41a	2.66a	2.91ab	2.54ab	2.72ab
DD (x10 ⁻⁴)		-5.79	3.97	-1.98	-15.75**	5.74	-9.09	-4.89	-1.68	-3.28
DD ² (x10 ⁻⁵)		1.96*	0.72	1.63	2.82***	0.34	2.58**	1.78*	1.46	1.62*
DD ³ (x10 ⁻⁸)		-9.24**	-4.45	-7.82*	-10.39***	-3.51	-10.81***	-7.98**	-7.16*	-7.57**
EVM (x10 ⁻⁵)		-1.88***	-2.16***	-2.93***	-3.97***	-1.33**	-2.86***	-2.73***	-2.10***	-2.42***
DSE - <i>RSD</i>		0.58	0.62	0.63	0.54	0.60	0.57	0.49	0.51	0.44
R ²		38.29	46.63	53.86	55.17	39.71	55.31	54.91	51.96	58.49

a, b, c, d : P< 0.05 ; * = P< 0.10 ; ** = P< 0.05 ; *** = P<0.01.

Legenda: PO1, PO2, PO3, PO4, FI1, FI2, PO, FI : vedi testo - see text ; B, F, FB/BF, R, RB/RF : vedi tabella n.1 - see table 1 ; DD, EVM : vedi tabella n.2 - see table 2.

Con riferimento agli effetti dei diversi fattori presi in considerazione, è possibile affermare che :

1) - l'effetto del valutatore non è mai risultato significativo (P>0,05); inoltre le lievi differenze di valutazione messe in evidenza dagli operatori a livello delle singole regioni, in virtù della metodologia di calcolo del BCS si sono praticamente annullate. Ciò collima con i risultati ottenuti in precedenza da noi e da altri (Mantovani e coll., 1992; Sabbioni e coll., 1997);

2) - la razza ha sempre influito in modo significativo sui risultati delle valutazioni, non solo a livello di singole regioni, ma anche a livello di punteggio finale del BCS. Con riferimento a quest'ultimo parametro, è possibile mettere in evidenza che le bovine di razza Reggiana e gli incroci RB e RF hanno raggiunto i valori più alti, seguite dalle Frisone, dalle Brune e dagli incroci BF e FB.

Particolare è il comportamento delle bovine di razza Bruna, che sono risultate significativamente più magre delle Frisone, con ciò contraddicendo i risultati di nostre precedenti indagini (Sabbioni e coll., 1997). Tale fatto appare però legato ad una precisa scelta genetica dell'allevatore, che da anni ha impostato la selezione delle bovine di razza Bruna, ma non delle Frisone, attraverso l'impiego sistematico di seme di tori americani;

3) - l'ordine di parto ha sempre determinato significative variazioni delle valutazioni a livello delle singole regioni e del BCS. Con riferimento solo a quest'ultimo, valori significativamente (P<0,05) più alti sono stati raggiunti dalle primipare (3,21); significativa è pure la differenza fra secondipare (2,88) e terzipare (2,50), ma non fra queste e le bovine di quarto parto e oltre (2,72).

In precedenza, Bittante e coll. (1994) avevano messo in luce, nelle secondipare, i valori più alti di BCS, mentre Waltner e coll. (1993) non avevano notato differenze significative legate all'ordine del parto;

4) - la durata del periodo di asciutta non ha influito significativamente sul BCS, se utilizzata come variabile continua lineare, mentre ha avuto effetto significativo in forma quadratica (P<0,10) e cubica (P<0,05). L'applicazione dei coefficienti di regressione riportati nella tabella n.3 comporta una variazione di 0,39 punti di BCS per durate dell'asciutta superiori di 2 volte la deviazione standard rispetto al valore medio. Ciò conforta nell'ipotesi, già proposta da altri (Bittante e coll., 1994; Hady e coll., 1994) che il valore del BCS non si modifichi sostanzialmente nel corso dell'asciutta, se non per durate anomale della stessa;

5) - il merito produttivo degli animali è risultato altamente significativo rispetto al BCS (P<0,01), comportando una riduzione di 0,24 punti di BCS ogni 1000 kg di latte EVM in più rispetto al valore medio. Tale reperto è in sostanziale accordo con quanto da noi già rilevato in precedenza su bovine Frisone e Brune (-0,1 punti/1000 kg EVM; Sabbioni e coll., 1997) e con i risultati ottenuti da Bittante e coll. (1994) su bovine Frisone (-0,03 punti/1000 kg EVM).

La tabella n.4 mostra i risultati dell'elaborazione dei dati riferiti al campione delle bovine in lattazione. Rispetto al modello relativo agli animali in asciutta, quello adottato per le vacche in lattazione spiega una quota inferiore di variabilità (R² da 28,40% per FI1 a 43,41% per PO4). Per il BCS l'R² è risultato pari a 40,62%.

Tabella n.4 - Variazione delle valutazioni nelle diverse regioni e del BCS in relazione ad alcuni fattori nelle bovine in lattazione (medie stimate).
 Table 4 - Partial scores and BCS changes in relation to some factors in lactating cows (least square means).

Parametro		PO1	PO2	PO3	PO4	FI1	FI2	PO	FI	BCS	Latte (kg/d)
VALUTATORE - OPERATOR	1	2.06	2.25	2.17	2.20	2.07	2.22	2.17	2.14	2.16	-
	2	2.04	2.30	2.16	2.12	2.05	2.22	2.16	2.14	2.15	-
RAZZA - BREED	B	1.89b	1.99b	1.95b	2.40c	2.09c	2.49b	2.06c	2.29b	2.17c	17.96a
	F	1.84b	2.01b	1.98b	1.69b	1.79b	1.72a	1.88b	1.76a	1.82b	20.07c
	FB/BF	1.19a	1.52a	1.34a	1.40a	1.39a	1.64a	1.36a	1.51a	1.44a	22.55d
	R	2.97d	3.21d	2.99d	3.03d	2.75e	2.78c	3.05e	2.77c	2.91e	21.92d
	RB/RF	2.36c	2.65c	2.57c	2.27c	2.29d	2.47b	2.46d	2.38b	2.42d	18.93b
ORDINE DI PARTO - PARITY	1	2.05ab	2.26a	2.29b	2.52c	2.20b	2.56b	2.28b	2.38c	2.33b	19.85b
	2	2.19b	2.45b	2.36b	2.16b	2.23b	2.19a	2.29b	2.21b	2.25b	19.16a
	3	2.01a	2.13a	2.02a	1.86a	1.92a	2.06a	2.01a	1.99a	2.00a	20.76a
	≥4	1.96a	2.25a	1.98a	2.09b	1.89a	2.07a	2.07a	1.98a	2.03a	21.37c
MESE DI LATTAZIONE - MONTH OF LACTATION (le lettere sono state omesse) (letters were omitted)	1	2.55	2.74	2.45	2.35	2.29	2.34	2.52	2.31	2.42	28.10
	2	2.01	2.12	1.89	1.92	1.77	1.93	1.99	1.85	1.92	27.13
	3	1.52	1.65	1.61	1.68	1.55	1.80	1.61	1.67	1.64	25.47
	4	1.72	1.92	1.87	1.81	1.81	2.02	1.83	1.92	1.87	22.70
	5	1.63	1.81	1.89	2.02	1.85	1.96	1.84	1.91	1.87	19.98
	6	1.84	2.10	1.95	2.15	1.96	2.21	2.01	2.08	2.05	18.10
	7	1.95	2.22	2.13	2.13	2.04	2.33	2.11	2.19	2.15	17.42
	8	2.12	2.45	2.42	2.33	2.33	2.48	2.33	2.40	2.37	16.70
	9	2.46	2.75	2.64	2.59	2.51	2.57	2.61	2.54	2.57	14.56
	10	2.69	3.00	2.80	2.62	2.49	2.57	2.78	2.53	2.66	12.68
EVM ($\times 10^{-3}$)		-1.85***	-2.15***	-2.25***	-2.33***	-2.05***	-1.81***	-2.15***	-1.93***	-2.04***	-
MILK ($\times 10^{-3}$)		1.17	1.69	3.46***	2.80***	1.62	2.73***	2.28**	2.17**	2.22***	-
DSE - RSD		0.71	0.76	0.77	0.66	0.74	0.70	0.63	0.66	0.58	3.28
R ²		37.24	36.04	29.74	43.41	28.40	36.03	39.82	34.52	40.62	73.75

a, b, c, d, e : P < 0.05 ; ** = P < 0.05 ; *** = P < 0.001.

Legenda: PO1, PO2, PO3, PO4, FI1, FI2, PO, FI : vedi testo - see text ; B, F, FB/BF, R, RB/RF : vedi tabella n.1 - see table 1 ; EVM, MILK : vedi tabella n.2 - see table 2.

Con riferimento ai diversi fattori, è possibile ammettere che :

- 1) - il valutatore non è mai risultato fonte di variabilità per la registrazione dello stato di condizione corporea e per le valutazioni fatte a livello di singole regioni. Le differenze fra le medie relative a ciascun valutatore sono risultate molto ridotte e comunque si sono annullate nel computo finale del BCS; questo reperto conferma quanto osservato nel campione delle bovine in asciutta ed induce a ritenere il metodo di valutazione dello stato di ingrassamento un sistema utile ai fini dello scambio di informazioni fra il veterinario e l'allevatore. In pratica, essendo le differenze legate al valutatore estremamente ridotte, si possono utilizzare le informazioni provenienti da diversi operatori, purché il metodo di valutazione sia lo stesso ed il grado di esperienza sovrapponibile;
- 2) - circa l'effetto della razza, e limitando l'attenzione al solo BCS, i valori più elevati sono stati riscontrati nelle bovine di razza Reggiana (2,91) e negli incroci RB e RF (2,42), nonostante che il loro livello produttivo sia risultato di poco diverso da quello delle altre razze. Ciò significa che la razza a duplice attitudine (in purezza o incrociata) porta ad una valutazione del BCS più alta, rispetto alle razze da latte, indipendentemente dal livello produttivo e che quindi negli allevamenti con presenza contemporanea delle diverse razze è quanto mai necessario operare le valutazioni su tutte;
- 3) - con riferimento all'ordine del parto, esso è risultato sempre altamente significativo. Primipare e secondipare hanno messo in luce valori di BCS più elevati (P < 0,05) rispetto alle terzipare ed oltre; in questo caso le differenze possono essere messe in relazione con la produzione di latte al momento della valutazione;
- 4) - nel passaggio dal 1° al 3° mese di lattazione, si assiste ad una riduzione del BCS di 0,78 punti, pari al 32% del valore iniziale; successivamente avviene il recupero della condizione corporea, tale da riportare, in corrispondenza dell'8°-9° mese di lattazione, il BCS a valori sovrapponibili a quelli iniziali ed al 10° mese a valori superiori del 10%.

Tale andamento, raffigurato anche nel grafico n.1 in relazione alla corrispondente produzione latte, è in sostanziale accordo con quanto da noi già riportato in una precedente indagine (Sabbioni e coll., 1997) anche se superiore nella entità della variazione, probabilmente a motivo del maggior livello produttivo del campione di bovine della presente indagine (produzione al picco superiore del 6,8%). Infatti, come riportato da Smith e McNamara (1990), nella prima fase della lattazione le bovine con elevato valore genetico, e quindi produttivo, presentano un maggior grado di lipomobilizzazione, rispetto a quelle meno produttive, probabilmente per una più intensa attività della lipasi ormonale sensibile a livello degli adipociti delle prime. Gallo e coll. (1996), operando su bovine di razza Frisona italiana hanno messo in luce riduzioni di 0,31-0,53 punti a 98-102 d dal parto e incrementi di 0,01-0,24 punti a 297-342 d dal parto rispetto al punteggio di BCS al momento del parto. Le variazioni più intense sono sempre state osservate nelle pluripare, sia per il più alto livello produttivo nelle fasi iniziali della lattazione, come messo in luce anche da Pedron e coll. (1993), sia perché le primipare, dovendo soddisfare anche i fabbisogni di accrescimento, tendono ad un minor recupero della condizione corporea nelle fasi finali della lattazione. Ciò dimostra inoltre che il rischio di un eccessivo ingrassamento al termine della lattazione è maggiore nelle pluripare rispetto alle primipare.

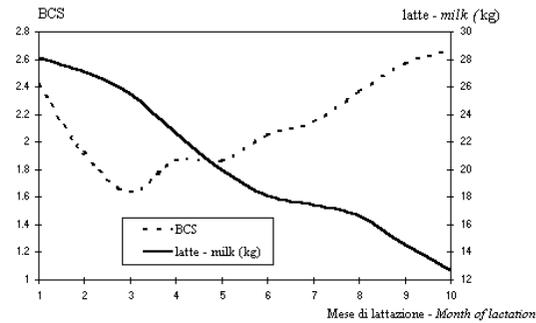


Grafico 1 - Relazione fra BCS e produzione di latte.
Figure 1 - Relationship between BCS and milk production.

Conclusioni

Nell'allevamento bovino è necessario disporre di un metodo di facile applicazione, poco costoso, immediato e quanto più oggettivo possibile per stimare l'entità delle riserve adipose degli animali. Ciò è utile all'allevatore, che, essendo quotidianamente a contatto con gli animali, segue con maggiore attenzione l'evoluzione del loro adattamento alle diverse condizioni di allevamento, al tecnico alimentarista, che è messo in condizione di valutare l'adeguatezza di una razione ai fabbisogni degli animali ed al veterinario d'azienda, che è così in grado di prevedere situazioni anomale a carico dello stato di salute delle bovine e della loro efficienza riproduttiva (Bertoni e Trevisi, 1992).

La ricerca da noi condotta, con lo scopo di valutare le principali fonti di variabilità del BCS su bovine di razza Frisone, Bruna e Reggiana, ha messo in luce che numerosi fattori intrinseci ed estrinseci agli animali influenzano tale parametro. L'esame della tabella n.5, che riassume i risultati dell'analisi della varianza condotta sui dati sperimentali, ci mostra che, dei fattori fissi inclusi nei modelli statistici, solo l'effetto del valutatore non è mai risultato significativo. Ne deriva che, operando un opportuno addestramento ed utilizzando lo stesso metodo, diversi operatori possono giungere ad una analoga valutazione. Ciò può essere di notevole importanza nei rapporti fra allevatori, tecnico alimentarista e veterinario (qualora questi ultimi due non siano la stessa persona), che possono scambiarsi informazioni e suggerimenti utilizzando un linguaggio comune. Il fatto che anche l'interazione fra valutatore e razza degli animali non sia risultata significativa, indica una sostanziale oggettività del metodo e l'assenza di valutazioni personali condizionate dal genotipo degli animali.

Tabella n.5 - Analisi della varianza del BCS.
Table 5 - Analysis of variance of BCS.

Fonte di variazione - Source of variation	Bovine in asciutta - Dry cows			Bovine in lattazione - Lactating cows		
	g.l. - d.f.	Varianza - Mean Square	P	g.l. - d.f.	Varianza - Mean Square	P
Valutatore - Operator	1	0.001	>0.05	1	0.012	>0.05
Razza - Breed	4	5.539	<0.01	4	19.449	<0.01
Ordine di parto - Parity	3	2.966	<0.01	3	3.413	<0.01
Mese di lattazione - Month of lactation	-	-	-	9	5.138	<0.01
Valutatore*Razza - Operator*Breed	4	0.019	>0.05	4	0.033	>0.05
DD	1	0.053	>0.05	-	-	-
DD ²	1	0.708	=0.0156	-	-	-
DD ³	1	1.106	<0.05	-	-	-
EVM	1	7.354	<0.01	1	9.593	<0.01
MILK	-	-	-	1	2.489	<0.01
Residua - Residual	183	0.192	-	717	0.336	-

Legenda : DD, EVM, MILK: vedi tabella n.2 - see table 2.

Tutti gli altri fattori fissi hanno assorbito quote significative di variabilità. In particolare è interessante notare l'importanza del fattore razza. La ricerca ha previsto il confronto fra Frisone, Brune e Reggiane. E' stato possibile mettere in evidenza, nelle bovine in lattazione, valori di BCS sempre più bassi nelle prime due. E' quindi necessario, negli allevamenti, peraltro sempre più frequenti, con presenza anche di soggetti di razza Reggiana, allevati al fine di migliorare le caratteristiche qualitative del latte di massa, operare su tutti gli animali.

Circa il secondo obiettivo che ci eravamo prefissi, e cioè la possibilità di utilizzare le informazioni derivanti dall'esame di un numero minore di regioni, nell'ottica di una semplificazione del metodo, la ricerca ha messo in luce che tutte le regioni coinvolte nella valutazione del BCS, sia quelle legate ad una visione dell'animale dal fianco, sia quelle ottenute a seguito della visione posteriore, sembrano ben correlate con il BCS, mentre in altre precedenti indagini (Sabbioni et al., 1997) era emerso che le valutazioni delle riserve adipose alla base della coda, alla punta della natica e al legamento sacro tuberale, con visione posteriore dell'animale, lo erano meno. Il motivo di ciò è probabilmente da ricercare nella presenza delle bovine Reggiane, che, avendo presentato sempre buoni valori di condizione corporea,

anche in presenza di alte produzioni di latte, hanno di fatto determinato un appiattimento delle differenze fra le diverse regioni. Ciò aumenta la convinzione della necessità di valutare gli effettivi delle diverse razze separatamente.

In conclusione, quindi, l'esame della bibliografia consultata e i risultati dell'indagine condotta, indicano l'importanza di una corretta valutazione dello stato nutrizionale nella gestione dell'allevamento della bovina da latte, in particolare modo di quelle ad elevata produzione. Se questo è l'obiettivo, lo strumento della rilevazione, in virtù della elevata correlazione fra spessore del grasso sottocutaneo e l'adiposità dell'animale, può essere riconosciuto nel Body Condition Score, che quindi si configura come uno strumento rapido e affidabile di valutazione. Indipendentemente dal metodo utilizzato (scala di 5 o di 6 punti; valutazione visiva o con palpazione) è necessario che il veterinario prenda confidenza sempre con lo stesso ed eviti di operare confronti con valutazioni ottenute attraverso altri metodi, se non correggendo opportunamente i valori. Inoltre non è sufficiente una sola valutazione del BCS ma è necessario avere un quadro della dinamica dello stesso nel corso della lattazione, effettuando le rilevazioni almeno nei punti critici della stessa (al momento del parto, al picco, alla messa in asciutta); il risultato della valutazione deve poi essere valutato criticamente dal veterinario, sulla base della conoscenza dell'effetto di diversi parametri genetici ed ambientali (razza, ordine e stadio di lattazione, stadio fisiologico, ecc.) nei confronti della valutazione stessa.

Sarebbe, infine, auspicabile che il veterinario con responsabilità nella gestione alimentare dell'allevamento, coinvolgesse nell'apprendimento del metodo le persone che sono a contatto con gli animali più di frequente, soprattutto l'allevatore, in modo da poter intervenire con tempestività sulla formulazione della razione in presenza di cambiamenti non giustificati dello stato di ingrassamento degli animali.

Parole chiave : bovina da latte, Frisona Italiana, Bruna Italiana, Reggiana, body condition score.

Key words : dairy cow, Italian Friesian, Italian Brown, Reggiana, body condition score.

RIASSUNTO - Gli Autori hanno valutato mensilmente, nel corso di 10 mesi, il BCS di 63 bovine da latte di razza Frisona Italiana, Bruna Italiana, Reggiana e incroci fra le stesse. L'effetto del valutatore e l'interazione fra valutatore e razza non sono mai risultati significativi ($P > 0,05$). Il BCS ha risentito degli effetti della razza, dell'ordine di parto ($P < 0,01$) e, nelle bovine in lattazione, anche della distanza dal parto, dell'EVM e della produzione di latte al momento della valutazione ($P < 0,01$), mentre, nelle bovine in asciutta, della durata della stessa (in forma quadratica o cubica) ($P < 0,05$) e dell'EVM ($P < 0,01$). Tutti i punteggi relativi alle singole regioni e ai criteri di posizionamento dei valutatori sono risultati ben correlati con il BCS.

SUMMARY - Sources of variation of Body Condition Score in Italian Friesian, Italian Brown and Reggiana dairy cows. Data were monthly recorded, from May 1995 to February 1996, from 63 Italian Friesian, Italian Brown and Reggiana dairy cows and their crosses, scored for body condition by the method of Bazin (1984), with the aim to value the sources of variation of partial scores of the rear and side regions and of BCS in dry and lactating cows. The operator and operator x breed effects were not significant ($P > 0,05$). Regardless to the physiological stage, BCS variations were affected by breed and parity ($P < 0,01$); in lactating cows also by days in milk, mature equivalent (ME) and actual milk production ($P < 0,01$); dry cows have shown a significant effect of days dry, squared and cubic ($P < 0,05$), and ME milk production ($P < 0,01$).

ZUSAMMENFASSUNG - Schwankungsquelle der BCS in Milchkühe der Italian Friesian, Italian Brown und Reggiana Rasse angehören. Die Verfasser haben monatlich, während 10 Monate, die BCS von 63 Milchkühe bewertet die der Italian Friesian, Italian Brown, Reggiana und Kreuzungen zwischen diese Rassen angehören. Der Effekt des Bewerter und die Wechselwirkungen zwischen Bewerter und Rasse haben sich nie bedeutsam ergeben ($P < 0,05$). Die BCS hat die Rasseneffekte, die Entbindungordnungsfolge ($P < 0,01$) und, für Kühe in Stillen, auch der Abstand der Entbindungen, die EVM und die Milchproduktion in Moment der Wertbestimmung verspürt ($P < 0,01$), während, für Kühe die trocken stehen, die Danet der selben (in Quadrat oder dritte Potenz form) ($P < 0,05$) und die EVM ($P < 0,01$). Alle Wertungen bezüglich der einzelnen Regionen und die Einsicht der Aufstellung des Bewerter haben sich mit der BCS entsprechend gut vertragen.

BIBLIOGRAFIA

- A.D.A.S (1986) - Condition scoring of dairy cows, p.612.
- BAZIN S. (1984) - Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches pie noires. RNED bovin, Paris.
- BERTONI G., TREVISI E. (1992) - Il body condition score (BCS) per valutare lo stato nutrizionale delle lattifere. Praxis Veterinaria, 13, 2, 5-8.
- BITTANTE G., GALLO L., CARNIER P., CASSANDRO M., CONTIERO B., MANTOVANI R. (1994) - Fonti di variazione della condizione corporea (BCS) di vacche Frisone in asciutta. Atti S.I.S.Vet., 48, 1555-1559.
- BUTLER - HOGG B.W., WOOD J.D., BINES J.A. (1985) - Fat partitioning in British Friesian cows: the influence of physiological state on dissected body composition. J. Agric. Sci. Camb, 104, 519-528.
- E.S.C.A. - THE EAST OF SCOTLAND COLLEGE OF AGRICULTURE (1976) - Condition scoring of dairy cows. Advisory Leaflet, 100.
- EDMONSON A.J., LEAN I.J., WEAVER L.D., FARVER T., WEBSTER G. (1989) - A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. J. Dairy Sci., 72, 68-78.
- GALLO L., CARNIER P., CASSANDRO M., MANTOVANI R., BAILONI L., CONTIERO B., BITTANTE G. (1996) - Change in body condition score of Holstein cows as affected by parity and mature equivalent milk yield. J. Dairy Sci., 79, 1009-1015.
- GALLO L., MANTOVANI R., CONTIERO B. (1997) - Variazione del body condition score (BCS) in bovine Rendene. Atti 12° Congresso Naz.le ASPA, Pisa 23-26/6, 207-208.
- HADY P.J., DOMECCQ J.J., KANEENE J.B. (1994) - Frequency and precision of body condition scoring in dairy cattle. J. Dairy Sci., 77, 1543.
- MANTOVANI R., COSTA A., CASSANDRO M., CARNIER P., GALLO L. (1992) - Body condition score di vacche da latte e a duplice attitudine: caratterizzazione dell'effetto valutatore. Atti S.I.S.Vet., 46, 1945-1949.
- PEDRON O., CHELI F., SENATORE E., BAROLI D., RIZZI R. (1993) - Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters and milk fatty acid composition in dairy cows. J. Dairy Sci., 76, 2528.
- SABBIONI A., SUPERCHI P., MAGGIALI A., FONTANA F., BONOMI B.M. (1997) - Indagine sui principali fattori che influenzano le variazioni del body condition score nelle bovine da latte. Annali Fac. Med. Vet. di Parma, 17, 271-285.
- SAS Institute Inc. (1989) - SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th ed. Cary NC.
- SMITH T.R., McNAMARA J.P. (1990) - Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 6. Cellularity and hormone - sensitive lipase activity as affected by genetic merit and energy intake. J. Dairy Sci., 73, 772-783.
- SPERONI M., MARCHETTO G., CAPELLETTI M., PIRLO G. (1991) - Valutazione dello stato di ingrassamento delle bovine da latte. L'Informatore Agrario, 47, 16, 53-59.
- WALTNER S.S., McNAMARA J.P., HILLERS J.K. (1993) - Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein dairy cattle. J. Dairy Sci., 76, 3410-3419.

IL CROMO ORGANICO NELL'ALIMENTAZIONE DEI VERRI. EFFETTI SULL'EFFICIENZA RIPRODUTTIVA (1)

Superchi P., Sabbioni A., Bonomi A., Bonomi B.M.(2)

(1) Ricerche effettuate con il contributo finanziario del C.N.R.

(2) Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Parma. Direttore : Prof. A.Bonomi.

INTRODUZIONE

E' noto che un incremento della produttività in suinicoltura è conseguibile anche e soprattutto attraverso l'ottimizzazione dell'efficienza riproduttiva.

Un' evoluzione in tal senso può, tuttavia, trovare ostacolo nel "tipo" di suino attualmente allevato, il quale, essendo il frutto di scelte ben precise, volte principalmente a privilegiare le performance produttive (accrescimenti ponderali, indici di conversione, ecc.), denuncia caratteristiche morfo-costituzionali che non sempre si conciliano con le esigenze di elevata rusticità, fecondità e fertilità richieste agli animali da destinare alla riproduzione.

Per tali soggetti, ogni minima modificazione di ordine ambientale, alimentare, igienico, manageriale, ecc., può rappresentare una fonte di stress che, bene spesso, esita in manifestazioni di ridotta efficienza riproduttiva.

Poiché gli interventi alimentari adottati per prevenire le eventuali risposte negative non forniscono costantemente esiti favorevoli, un particolare interesse viene oggi rivolto al ruolo che alcuni microelementi minerali, non ancora previsti dalla legislazione italiana per l'integrazione delle razioni, possono svolgere sull'attività riproduttiva.

Tra essi figura il cromo, oligoelemento essenziale per l'uomo e per gli animali, il quale, come componente del fattore di tolleranza al glucosio (Glucose Tolerance Factor - GTF), è stato isolato, per la prima volta, dal lievito di birra (Schwartz e Mertz, 1959).

Il cromo, favorendo l'attacco dell'insulina ai suoi recettori specifici, probabilmente attraverso l'iniziazione di legami disolfuro tra l'ormone e le membrane cellulari (Kamen,1994), ne potenzia l'azione trofica, andando ad influenzare positivamente non solo il metabolismo glucidico ma anche quello proteico e lipidico (Anderson,1987).

In corso di eventi stressanti è stata osservata una forte deplezione di tale microelemento che, una volta mobilitato, non può essere riassorbito ma viene eliminato per via urinaria (Anderson et al.,1988,1991).

Grazie quindi alla azione diretta e/o indiretta che esso svolge sul metabolismo animale, è ipotizzabile un suo contributo alla risoluzione delle situazioni di ridotta attività riproduttiva che compaiono nella specie suina a seguito dell'intervento di fattori stressanti.

Le indagini sinora condotte non hanno, tuttavia, portato a risultanze univoche e ciò è da collegare, molto probabilmente, alla mancanza di conoscenze precise circa i reali fabbisogni in cromo degli animali allevati ; è possibile, stando così le cose, che l'integrazione di diete già di per sé carenti dell'oligoelemento non possano evitare in risposte soddisfacenti.

In linea di massima è stato comunque osservato che allorquando viene utilizzato in razioni per scrofe in gestazione e/o in lattazione, sotto forma di piccolinato o di lievito esso si dimostra capace di influenzare favorevolmente la prolificità (Lindemann et al.,1995, Superchi e Sabbioni,1995) , la fertilità (Polidori et al.,1997) e la resistenza organica dei suinetti durante la fase dell'allattamento (Savoini et al.,1996).

Da verificare sono invece gli effetti dell' oligoelemento sulla capacità riproduttiva dei verri ed è per tale motivo che è stata istituita la presente indagine .

Materiale e metodi

La prova, che ha avuto una durata di 4 mesi (luglio-ottobre 1997), ha interessato 28 verri appartenenti alle razze Duroc (n.10), Large White (n. 12) e Landrace (n.6) in attività riproduttiva. I soggetti, suddivisi in due gruppi, omogenei per razza ed età (18,5±4,08 mesi), hanno ricevuto un mangime base, la cui composizione chimica centesimale è riportata in tab.1, addizionato (gruppo T) o non (gruppo C) di cromo organico alla dose di 400 p.p.b.

Tabella n. 1 -Composizione chimica centesimale e contenuto in macro e microelementi minerali del mangime (sulla s. t. q.).

Umidità	%	10.76
Ceneri gregge	%	5.67
Proteina greggia	%	14.92
Cellulosa greggia	%	4.61
Grasso greggio	%	3.35
EM	Kcal/Kg	3087
Calcio	g/Kg	8.60
Fosforo	g/Kg	6.79
Magnesio	g/Kg	2.03
Sodio	g/Kg	0.70
Potassio	g/Kg	9.51
Ferro	mg/Kg	530.73
Zinco	mg/Kg	269.10
Rame	mg/Kg	36.99

Ferro	mg/K.g	530.73
Zinco	mg/K.g	269.10
Rame	mg/K.g	36.99
Manganese	mg/K.g	89.28
Cobalto	mg/K.g	0.90
Cromo	mg/K.g	0.13

È stato utilizzato cromo sotto forma di lievito, nel quale l'elemento è presente nella misura di 1000 p.p.m.⁽¹⁾.

Il mangime, in pellet, è stato somministrato in quantità pari, mediamente, a 2,5 Kg/capo/giorno.

I soggetti, allevati nello stesso stabulario, sono stati mantenuti in condizioni di ambiente controllato (T 22°C- UR 65%).

Dopo 30 d dall'inizio del trattamento, il seme, prelevato da ogni verro con frequenza bisettimanale, sempre alla medesima ora del giorno (09.00 a.m.), è stato utilizzato fresco per l'inseminazione di 214 scrofe pluripare LWxL (ordine di parto:3,78±1,6).

La fecondazione delle scrofe è avvenuta alla comparsa naturale dell'estro ed è stata ripetuta dopo 16 h, effettuando, allo scopo, una fecondazione omospermica.

In corrispondenza di ogni prelievo, si è provveduto ad effettuare una valutazione quanti-qualitativa del seme. Il volume dell'eiaculato, previa eliminazione della frazione gelatinosa, è stato quantificato, facendo ricorso ad una provetta graduata. La concentrazione nemaspermica è stata determinata mediante lettura fotometrica (460 nm), previa diluizione del campione (1 :40) con soluzione fisiologica formolata allo 0,05%. Su una goccia di seme tal quale, posta su un tavolinetto riscaldato a 37°C, si è valutata la motilità di massa al microscopio (80X), attribuendo a ciascuna lettura un punteggio da 0 a 5. La determinazione degli spermatozoi vivi e anormali è avvenuta previa colorazione con eosina e nigrosina mediante lettura al microscopio (1000X) di 150 cellule per ciascun preparato.

Al parto sono stati rilevati i parametri relativi alle performance produttive (n. di suinetti nati vivi e svezzati) e riproduttive (int. svezzamento/1° calore, int. svezzamento/concepimento, n. di interventi/concepimento) delle scrofe.

I dati sono stati sottoposti ad ANOVA secondo il metodo dei minimi quadrati, utilizzando un modello comprendente i fattori fissi gruppo e razza del verro e mese di prelievo.

Le interazioni, inizialmente previste nel modello, sono state poi rimosse poiché non sono risultate significative.

I rilievi temporali e il n.di interventi/concepimento sono stati trasformati in valori logaritmici. Per i dati non parametrici è stata impiegata l'analisi del χ^2 .

Risultati e conclusioni

Dalle indagini condotte sul seme dei verri (tab.2), è possibile rilevare che i soggetti trattati con cromo organico hanno fornito, rispetto ai controlli, un eiaculato che, oltre a risultare quantitativamente superiore (+27%; P<0.001) e caratterizzato da una maggiore concentrazione nemaspermica (+8%; P<0.05), ha denunciato, dal punto di vista qualitativo, una più elevata motilità (+3%; P<0.05) ed una vitalità degli spermatozoi superiore di 2.2 punti percentuali (P<0.05).

Tabella n. 2 - Caratteristiche quanti-qualitative del seme.

	Gruppo		Mese di prelievo			Razza del verro			Significatività				DSE
	controllo	trattato	Agosto	Settembre	Ottobre	Duroc	Landrace	Large White	gruppo	mese	razza verro	interazione	
Volume (ml)	186	237	200	214	220	211	215	208	**	n.s.	n.s.	n.s.	71
Conc.sperm (x10 ⁶ /ml)	159.13	171.75	159.56	169.82	166.94	167.86	160.62	167.84	*	n.s.	n.s.	n.s.	15.20
Motilità (scala 0-5)	4.38	4.52	4.42	4.45	4.48	4.47	4.39	4.49	*	n.s.	n.s.	n.s.	0.08
Sperm. vivi (%)	79.02	81.22	80.00	79.72	80.64	80.82	79.94	79.60	*	n.s.	n.s.	n.s.	2.75
Sperm. anormali (%)	7.01	6.63	6.98	7.02	6.46	6.58	6.89	6.99	n.s.	*	n.s.	n.s.	0.69

* P<0.05 ; **P<0.001.

Il trattamento con cromo non ha invece costituito fonte di variazione (P>0.05) per la percentuale di spermatozoi con alterazioni morfologiche. Su tale parametro un peso ben più determinante è stato svolto dalla stagione; i valori più bassi (6,46%; P<0.05) sono stati infatti osservati in corrispondenza dei prelievi effettuati nel mese di ottobre.

Sono risultanze queste che acquistano particolare significato se si considera il momento stagionale, in cui l'indagine ha avuto inizio.

È noto, infatti, che proprio durante il periodo estivo negli allevamenti suini viene spesso lamentato un calo dell'efficienza riproduttiva, riconducibile essenzialmente all'intervento di eventi stressanti che vanno ad interessare entrambi i sessi, nel cui determinismo, come è stato ormai ampiamente dimostrato, un ruolo fondamentale è svolto dall'aumento della temperatura ambientale e del fotoperiodo. Nei verri, in particolare, è stato osservato che la funzione riproduttiva viene negativamente influenzata dall'aumento delle ore di luce come conseguenza diretta del fotoperiodo sulla produzione steroidea (Levis,1998, Trudeau e Sanford,1986).

A differenza di quanto riscontrato da altri Autori (Cameron, 1987), operando su soggetti Yorkshire, Lacombe, Hampshire, la razza di appartenenza del verro non è risultata fonte di variabilità per i parametri presi in considerazione (P>0.05).

Le migliori caratteristiche denunciate dal seme dei verri trattati, pur avendo indotto una seppure lieve riduzione dell'intervallo svezzamento/concepimento (P=0.08), non hanno determinato nessun significativo miglioramento dei parametri produttivi e riproduttivi delle scrofe (tabella 3).

Tabella n.3 - Performance produttive e riproduttive delle scrofe.

	Gruppo		Mese di prelievo			Razza del verro			Significatività			DSE	
	controllo	trattato	agosto	settembre	ottobre	Duroc	Landrace	Large White	gruppo	mese	razza		
Intervallo :													
-svezz.-1°cal.	d	10.62	9.58	10.01	9.88	10.41	10.28	9.62	10.40	n.s.	n.s.	n.s.	1.16
- svezz.- conc.	d	14.58	12.98	14.12	13.00	14.22	14.48	13.28	13.58	0.08	n.s.	n.s.	1.10
Interventi/concepimento	n.	1.29	1.15	1.18	1.28	1.20	1.15	1.25	1.26	n.s.	n.s.	n.s.	0.36
Durata gestaz.	d	116.14	114.31	115.28	115.78	114.61	114.70	116.07	114.91	n.s.	n.s.	n.s.	4.74
Suinetti:													
- nati vivi	n.	7.44	9.26	7.98	9.11	7.96	9.53	7.80	7.72	n.s.	n.s.	n.s.	3.08
- svezzati	n.	6.96	7.26	6.90	7.52	6.91	8.34	6.69	6.30	n.s.	n.s.	n.s.	2.61

Nonostante ciò, di non trascurabile importanza sono le risultanze relative ai ritorni in calore in rapporto al gruppo di appartenenza dei verri (tabella 4). Accanto ad una minore % dei ritorni nelle scrofe inseminate con verri trattati (P=0.046) è stato possibile osservare, sempre per queste ultime, una marcata riduzione dei ritorni in ciclo (P=0.017).

Tabella n.4 Ritorni in calore delle scrofe in rapporto al trattamento dei verri

	Gruppo		P
	controllo	trattato	
Ritorni %	14.17	10.89	0.046
Ritorni in ciclo (% sui ritorni) (≤ 23 d)	41.67	20.83	0.017

E' questo un dato che, come suggerito da alcuni Autori (Tarocco,1990), deve essere interpretato come conseguenza di una minore capacità fecondante da parte dei verri del gruppo controllo .

Alla luce di quanto esposto sembra di poter concludere che il ricorso al cromo sotto forma di lievito nell'alimentazione dei verri, pur rappresentando un intervento idoneo per migliorare l'efficienza riproduttiva degli stessi, non fornisce risposte di entità tale da influenzare la produttività delle scrofe, parametro questo che, come è noto, è capace di modificare, in senso positivo o negativo, il rendimento economico del comparto riproduttivo.

Ci sembra importante sottolineare la necessità di effettuare ulteriori indagini, il cui scopo dovrebbe essere innanzitutto quello di giungere alla definizione dei fabbisogni , conditio sine qua non per potere valutare con maggiore precisione le risposte che il cromo, nella sua veste di integratore, potrà fornire.

Nota - Il piano, l'esecuzione delle indagini e le conclusioni spettano in parti uguali agli Autori. (Prof.A.Bonomi).

Parole chiave : verri, efficienza riproduttiva, alimentazione, lievito di cromo,

Key words: boars, reproductive efficiency, feeding, chromium yeast,

RIASSUNTO - L'indagine ha interessato 28 verri appartenenti alle razze Duroc (n.10), Large White (n.12) e Landrace (n.6) in attività riproduttiva (18.5± 4.08 mesi di età) i quali hanno ricevuto un mangime base addizionato (gruppo T) o non (gruppo C) con lievito di cromo (Cr : 400 p.p.b.). Il trattamento ha favorevolmente influenzato le caratteristiche quanti-qualitative del seme dei verri. Per le scrofe fecondate con verri trattati oltre ad una minor % dei ritorni in calore (P=0.046) si è avuta una marcata riduzione dei ritorni in ciclo (P=0.017).

SUMMARY - *The chromium yeast in boars feeding. Effects on the reproductive efficiency.* Complete diets, added (group T) or not (group C) with chromium yeast (Cr: 400 p.p.b.) were fed to Duroc (n.10), Large White (n.12) and Landrace (n.6) boars (age 18.5 ± 4.08 months) in reproductive activity. The treatment improved semen production and quality. Sows mated by treated boars have shown a decrease of return to service (P=0.046) and return in cycle percentage (P=0.017)

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON R.A.(1987) - Chromium, In W.Mertz (ed.) Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, New York.
- ANDERSON R.A., BRYDEN N.A., POLANSKY M.M., DEUSTER P.A. (1988) - Exercise effects on chromium excretion of trained and untrained men consuming a constant diet. J.Appl. Physiol., 64,249.
- ANDERSON R.A., BRYDEN N.A., POLANSKY M.M., THROP J.W. (1991) - Effect of carbohydrate loading and underwater exercise on circulating cortisol, insulin and urinary losses of chromium and zinc . Eur. J.Appl. Physiol., 63, 146.
- CAMERON R.D.A. (1987) - Sexual development and semen production in boars. Pig News and Information, 8, 4, 389.

- KAMEN B. (1994) - The chromium connection: A lesson in nutrition. Third Edition Nutr.
- LEVIS D.G. (1998) - L'allevamento del verro in età postpuberale per l'ottimizzazione della fertilità. Large Animals Review, 4, 65.
- LINDEMANN M.D., WOOD C.M., HARPER A.F., KORNEGAY E.T., ANDERSON R.A. (1995) - Dietary chromium picolinate additions improve gain: feed and carcass characteristics in growing- finishing pigs and increase litter size in reproductive sows. J. Anim. Sci., 67, 457.
- POLIDORI F., DELL'ORTO V., SAVOINI G. (1997) - Come viene influenzata l'efficienza riproduttiva. Riv. di Suinicoltura , 38, 3, 41.
- SAVOINI G., CHELI F., FANTUZ F., BONTEMPO V., BALDI A., POLITIS I., BERTOCCHI L., DELL'ORTO V. (1996) - Effect of methionine and chromium-enriched-yeast on performance and immune function in pigs. Proceedings of the 14th Ipv Congress , Bologna 7-10 luglio, 432.
- SCHWARTZ K., MERTZ W. (1959) - Chromium (III) an the Glucose Tolerance Factor. Arch. Biochem,Biophy.,85,292.
- SUPERCHI P., SABBIONI A. (1995) - Effetti della supplementazione delle razioni con cromo sotto forma organica sulle performance riproduttive di scrofe nel periodo estivo. Atti XLIX Conv. Naz. S.I.S.Vet., Salsomaggiore (PR), 27-30 settembre, 909.
- TAROCCO C.(1990) - Fattori di rischio per la fertilità del verro. Rivista di Suinicoltura, 31, 3, 25.
- TRUDEAU V., SANFORD L.N. (1986) - Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace boar, J.Anim.Sci.,63,1211.

LE SINERGIE NELLA RICERCA AGRO-ALIMENTARE

Fausto Cantarelli*

** Istituto di Economia rurale e zoeconomia, Università degli Studi di Parma*

1 - I presupposti

Dieci mila anni fa ebbero origine in Medio Oriente agricoltura e allevamento del bestiame; ci vollero altri 5 mila anni per raggiungere il Centro Europa passando per il Mediterraneo e il corridoio danubiano. Poche erano le piante e gli animali addomesticati: le prime furono erbacee: frumento, orzo, pisello, fagiolino, lenticchia, veccia e lino; gli animali furono il cane, il maiale, la capra, il montone e il bovino.

Ancora prima (circa 3 milioni di anni fa) la questione agro-alimentare era stata risolta al suo sorgere con la raccolta che perdurò fino a quando l'uomo, trasformandosi da predatore in produttore, avviò il lavoro dei campi e la pastorizia, incominciando a costruire i villaggi e a fabbricare utensili per il lavoro e vasellame per la vita familiare.

Fu subito chiaro tuttavia che non era sufficiente produrre, ma occorreva anche accantonare delle scorte per i tempi di attesa dei nuovi frutti; così la famiglia affinò le tecniche per trasformare al suo interno le materie prime agro-zootecniche deteriorabili fino a quando, verso la seconda metà del Secolo scorso, l'industria si appropriò di molte di queste attività grazie al progresso scientifico e tecnologico, sottraendole alla famiglia e modificando il sistema.

Da allora l'evoluzione è proseguita con ritmi variabili in conformità al progredire delle scienze. La ricerca agraria ha avuto inizio in Europa nel 1786 con la prima azienda sperimentale che fu quella di Celle (Braunschweig) e, pochi anni dopo, con la prima scuola agraria ad Amburgo. In Italia l'insegnamento agrario fu attivato nel 1834 dal Marchese Cosimo Ridolfi, in Toscana, a Meleto e sei anni dopo fu trasferito a Pisa presso l'Università come Scuola Superiore di Agricoltura.

Analogamente per l'insegnamento veterinario, il primo sorse a Lione poco prima di quello agrario (1762) per opera di Claude Bourgelat, mentre in Italia si insediava a Torino sette anni più tardi con Giovanni Brugnone; a Parma arrivò dopo, nel 1814, quando con il Ducato di Maria Luigia, fu affidata la prima cattedra al Professore Mario Luigi Melchiorre Benvenuti, diplomato zoiatra nella Scuola di Milano (1810). Sempre a Parma, nei tempi recenti (1990), i docenti della Facoltà, trovandosi in prima linea per essere di origine animale i principali prodotti alimentari del territorio (Parmigiano-Reggiano, altri lattiero-caseari, il prosciutto e altri salumi), decisero di allargare l'insegnamento alla produzione vegetale, per dare vita a un polo agro-alimentare di studi, ricerche e formazione, che Parma reclama per le attività prevalenti nell'hinterland.

Il progetto compì un percorso tortuoso che portò a Reggio Emilia la nuova Facoltà di Agraria sempre dell'Università degli Studi di Parma. Tuttavia Parma ebbe il suo polo di ricerca a raggio nazionale e, con questo, avviò la realizzazione di disegni, tra i quali sono stati già attuati il Dottorato di ricerca in Economia dei sistemi agro-alimentari, il Corso di Perfezionamento in "Storia alimentare d'Italia e d'Europa", le cui lezioni verranno presto pubblicate, la stampa del "*Rapporto sullo stato dell'agro-alimentare in Italia nel 1997*", la nascita della Rivista scientifica "*Economia agro-alimentare*", il collegamento con Montpellier attraverso la figura prestigiosa del Prof. Louis Malassis ecc.

Sono stati confermati ancora una volta, se ce ne fosse stato bisogno, la validità del progetto e la competenza primaria delle Facoltà di Agraria e di Medicina Veterinaria nella ricerca e nell'insegnamento agro-alimentari, almeno fino a che l'uomo non troverà il modo di nutrirsi senza coltivare la terra e allevare il bestiame.

Le ulteriori tappe del cammino del neonato polo agro-alimentare passeranno attraverso la moltiplicazione dei rapporti di collaborazione tra le Facoltà biologiche del Paese e tra queste e altri esperti universitari e esterni in stretto rapporto con le altre istituzioni alimentari nazionali e internazionali.

Oggi la ricerca agro-alimentare in Italia ha potenzialità consistenti, potendo contare su 21 Facoltà di Agraria e su 13 Facoltà di Medicina Veterinaria, a cui si aggiungono per particolari discipline altre Facoltà (Scienze MM FF NN, Economia, Geologia ecc.) e una miriade di altre istituzioni pubbliche (CNR, IRSA, ENEA, Stazioni Sperimentali, Istituti Zooprofilattici ecc.) e private.

Così la ricerca agro-alimentare italiana può contare su quasi 5 mila ricercatori e su poco più di 3.000 tecnici.

Ricercatori e tecnici dei Centri di ricerca agro-alimentare (1998)

	Ricercatori	Tecnici	Totale	%
Facoltà di Agraria	2.081	--	2.081	26,1
Facoltà di Veterinaria	810	--	810	10,8
CNR	212	226	438	5,5
MIPA	541	446	987	12,4
ICRAM	21	15	36	0,4
INFS	9	11	20	0,2
I Zooprofilattici	436	538	974	12,2
Regionali	41	789	830	10,9
Privati	788	1.007	1.795	22,4
TOTALE	4.939	3.032	7.971	100,0

Fonte: nostre elaborazioni su dati delle diverse istituzioni di ricerca.

Se la ricerca del comparto fosse stata meglio organizzata, e avesse puntato a valorizzare le sinergie, di cui si avverte da tempo il bisogno, i risultati sarebbero stati ben maggiori. L'idea di valorizzare le sinergie della ricerca non poteva che nascere a Parma, dove esistono le condizioni più favorevoli, quali le consistenti produzioni di alimenti e di tecnologie alimentari, le adeguate strutture di ricerca e formazione (l'Università degli Studi con le Facoltà di Agraria, di Medicina Veterinaria e altre, la Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari, l'Azienda Sperimentale Stuard, l'Istituto Zooprofilattico ecc.), la presenza dell'Ente Fiere con la più ampia rassegna degli alimenti e delle relative tecnologie del Paese (Cibus e Tecnocibus), delle economie esterne ecc. Questi e altri titoli concorrono a fare del territorio l'area di riferimento più attrezzata per assumere un ruolo di guida del sistema nazionale.

La constatazione è confermata dal "*Rapporto annuale sullo stato dell'agro-alimentare in Italia nel 1997*", contributo alla conoscenza di questo fondamentale settore dell'economia del Paese che è opera di numerosi esperti nazionali coordinati a livello locale presso l'Università di Parma, che

verrà ripetuto anche il prossimo anno.

Il progetto cade in un momento favorevole perchè l'attuale fase di ristrutturazione della ricerca agro-alimentare nel Paese facilita costituzione e operatività di un polo agro-alimentare a Parma quale matrice dell'esistente e dei nuovi progetti al fine di valorizzare le sinergie e di attivare più numerosi e più stretti collegamenti nazionali e internazionali.

La proposta di Parma, oltre a trovare l'adesione delle istituzioni locali di ricerca, dovrebbe incontrare il favore degli operatori economici e delle Amministrazioni Pubbliche territoriali essendo comune l'obiettivo di valorizzare le risorse a beneficio della competitività delle imprese e dello sviluppo economico-sociale del territorio.

2 - La ristrutturazione della ricerca

Motivi di favore a questa proposta si riscontrano anche nelle nuove disposizioni, tra cui la legge 59/97 che, all'art. 11, delega il Governo a "*riordinare e razionalizzare gli interventi diretti a promuovere e sostenere il settore della ricerca scientifica e tecnologica nonché gli organismi operanti nel settore*". Vi è poi il Decreto Legislativo 143/97 che all'art. 3 che prevede la soppressione degli Istituti Sperimentali e di ricerca vigilati dal MiPA, che verranno sostituiti da un unico Organismo nazionale del tipo INRA francese, che meglio corrisponde alle esigenze del mondo della produzione. Anche le altre grandi centrali nazionali di ricerca sono in fase di ristrutturazione.

Più di recente è stato approvato il Decreto legislativo 204/98 che prevede "*Disposizioni per il riordinamento, la programmazione e la valutazione della politica nazionale relativa alla ricerca scientifica e tecnologica a norma dell'art. 11, comma 1 lettera d) della legge 15 marzo 1997 n. 59*"; quest'ultima norma all'art. 2 prevede la preparazione, l'approvazione e l'aggiornamento ogni anno del Programma Nazionale triennale per la Ricerca (PNR), di cui faranno parte anche (art. 3) "*specifici interventi di particolare rilevanza strategica*", finanziati su di "*un apposito Fondo integrativo speciale per la ricerca, istituito nello stato di previsione del Ministero del tesoro, del bilancio e della programmazione economica, a partire dal 1° gennaio 1999, con distinto provvedimento legislativo....*".

C'è voluta l'Europa dell'Euro per indurre il Parlamento ad affrontare seriamente i problemi della ricerca agraria e agro-alimentare. Proprio perchè l'Italia ha accumulato ritardi, l'occasione va utilizzata rapidamente e al meglio con l'obiettivo di ottenere presto risultati concreti che assicurino competitività al sistema e alle imprese. Nel campo agro-alimentare il discorso è duplice perchè si rivolge ai produttori di beni alimentari destinati al consumo di massa, per i quali ricerca e innovazione sono essenziali, e a quelli dei prodotti tipici, per i quali è fondamentale recuperare un livello organizzativo e tecniche adeguati ai mercati di oggi.

Nel prospettare il nuovo progetto è bene tenere presente che l'Italia di domani sarà oggetto di crescente domanda turistica - se ne avvertono già i segnali - sempre che sappia predisporre per tempo idonee strutture alberghiere e infrastrutture e dia ordine alla ristorazione. Il breve cenno a una prospettiva assai complessa dovrebbe agire come stimolo a lavorare in fretta e bene per evitare di perdere un'occasione straordinaria; ci aspettano le prove nel Giubileo di fine Millennio. Anche in campo accademico si sta muovendo qualcosa e dai primi segnali si ha l'impressione che i cambiamenti potranno essere consistenti; lo stesso sta avvenendo per CNR, Enea e altri.

Tra i motivi che a livello nazionale e internazionale concorrono oggi alla concentrazione e al coordinamento della ricerca vi è l'impegno che Governo e Ministero della Ricerca Scientifica e Tecnologica si sono assunti riguardo alla programmazione degli investimenti, delle autonomie e del coordinamento degli enti pubblici di ricerca e di altri soggetti.

Contemporaneamente l'UE ha inviato chiari segnali per accrescere nei singoli Paesi l'impegno organizzativo e finanziario della ricerca, visto che

nessun stato è in grado di investire sufficienti risorse tecniche e umane per realizzare le innovazioni necessarie; di fronte alla concorrenza globale, la Comunità stessa ha assunto l'iniziativa di coordinare la ricerca. E' previsto per quest'anno l'avvio del quinto programma quadro nel campo della ricerca e dello sviluppo tecnologico con una dotazione finanziaria considerevole. Per l'Italia non sono venute meno le difficoltà di coordinare e portare avanti le domande per ottenere i finanziamenti; la partecipazione italiana al quarto programma ha impegnato l'11% delle risorse disponibili contro il 19% della Germania, il 18% della Francia, il 17% della Gran Bretagna ecc. La constatazione è amara se si considera che la ricerca è impegnata su ampi comparti del mondo produttivo, quello agro-alimentare in primis, che è alla ricerca di strategie commerciali che, nelle peculiarità italiane, sono più che necessarie e richiedono soluzioni specifiche.

Gli obiettivi della presente proposta mirano a moltiplicare i risultati senza maggiorazione di spese attraverso lo scambio delle informazioni, la selezione dei programmi e attraverso più stretti collegamenti nazionali e internazionali. Per ottenere il risultato molte cose devono cambiare a cominciare dal riordino delle strutture e delle funzioni, come è stato fatto in Francia, a Montpellier, dove il Prof. Louis Malassis ha dato vita ad Agropolis, di cui è stato fondatore e primo presidente; con questa realizzazione la Francia è riuscita a concentrare in questa città gran parte della ricerca agro-alimentare del Paese e a stabilire numerosi collegamenti nazionali e internazionali, facendone uno dei più importanti crocevia della ricerca europea e mondiale, nonostante che il territorio sia privo di industrie alimentari (vino escluso).

3 - Il contesto

La proposta parmense cade in un momento favorevole anche per il contesto economico-sociale che presenta esigenze nuove per la ricerca agro-alimentare in conseguenza della globalizzazione dei mercati e dell'accentuarsi della concorrenza. Le imprese, quando sorsero le Comunità Europee e, dopo Maastricht, l'Unione per reggere i ritmi di espansione dei grandi blocchi, si sono rafforzate con acquisizioni e fusioni in misura maggiore che in altri comparti con il triplice obiettivo di diversificare il prodotto, migliorare la posizione di mercato ed evitare la sovrapproduzione.

Agli inizi degli anni Ottanta, inoltre, l'industria alimentare del Vecchio Continente ha avviato un processo di intensa e diffusa concentrazione e di sostituzione tecnologica, aumentando l'intensità dei capitali; oggi il valore aggiunto, correlato con il grado di concentrazione, colloca al primo posto la realtà tedesca, seguita da quelle inglese e francese, mentre ancora una volta l'Italia accusa qualche ritardo di troppo, rimanendo ancorata a un sistema polverizzato a tutti i livelli.

Eppure l'industria alimentare italiana ha i suoi punti di forza nella qualità e nella continuità dei consumi; sono questi ultimi che avevano tenuto senza problemi fino ad oggi, a essere messi in discussione dalla globalizzazione dei mercati, che mette a rischio la triade ulivo, vite, grano. Al momento l'equilibrio complessivo regge, mantenendo in vita l'originalità alimentare italiana, impropriamente definita "dieta mediterranea"; ciò che era rimasto compatibile con l'evoluzione del sistema comunitario finora, sia pure con un cammino più lento di quello di altri, oggi è rimesso in discussione. A questo punto è legittima una domanda: fino a quando resisterà il modello mediterraneo di fronte al procedere dell'appiattimento di produzione e consumo?

Nonostante la staticità del modello, l'industria italiana, negli ultimi lustri, si è sobbarcata a un processo di continua, lenta ristrutturazione in vista dell'entrata in funzione dell'Euro: tutto questo non è ancora sufficiente e i mutamenti non sono finiti: I mercati dinamici, già presenti da alcuni lustri, dimostrano che la instabilità è ormai permanente e che le strategie non sono più facoltative.

In questo contesto la ricerca ha acquistato nuovo rilievo perchè produce innovazione assicurando competitività alle imprese. In tempi di "risparmio forzato" per ridurre il debito pubblico l'Italia finirà con il contenere la spesa, compresa quella della ricerca agro-alimentare, senza poter rinunciare ai risultati, traguardo raggiungibile solo con la profonda riorganizzazione del quadro strutturale e funzionale.

La ricerca agro-alimentare italiana è policentrica con basso livello organizzativo, nonostante che il corpo dei ricercatori agro-alimentari, come è noto, non sia indifferente per quantità e qualità.

4 - Agropolis: un esempio

Presentare le vicende che hanno indotto la Francia a reagire alle crescenti provocazioni costituendo a Montpellier l'importante polo internazionale di ricerca e di formazione agro-alimentari, può aiutare a definire il percorso da seguire in Italia.

Il progetto di Agropolis, i cui prodromi risalgono al 1985, nasce con l'accordo tra istituzioni di ricerca, imprese industriali e Amministrazioni Pubbliche territoriali con l'obiettivo di fare parlare a tutti uno stesso linguaggio salvaguardando l'autonomia di ognuno (l'associazione non ha il potere di imporre delle scelte).

Secondo i promotori, Agropolis ha inventato un nuovo tipo di relazioni che, escludendo l'ordine gerarchico, si avvalgono del parternariato e della mediazione. Il potere si esprime nel funzionamento del sistema.

L'originalità dell'iniziativa francese si coglie nella composizione del Consiglio di Amministrazione, che comprende i rappresentanti delle singole istituzioni di ricerca aderenti, più un consigliere eletto dalle imprese, uno dalla comunità scientifica e tre appartenenti alle Amministrazioni Pubbliche territoriali (uno ciascuno al distretto, al consiglio generale e al consiglio regionale).

Il consiglio di amministrazione, a sua volta, propone le attività da svolgere e nomina l'esecutivo, che prende le decisioni e fissa gli ordini del giorno; è costituito da nove membri: il presidente, quattro vicepresidenti, due segretari e due tesorerieri.

Quanto al bilancio attualmente è di 6 milioni di franchi all'anno, pari a circa 1,8 miliardi di lire.

Nei tempi immediatamente precedenti il "Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le développement" (CIRAD), l'"Institut National de la Recherche Agronomique" (INRA), l'"Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux e du Forêts" (ENGREF) ecc. operavano separatamente nello stesso ambito: l'agricoltura in senso lato, con particolare attenzione per le zone tropicali e mediterranee. Il cambiamento è avvenuto quando nel 1986, i collegamenti, che erano occasionali, sono stati istituzionalizzati: *"bisogna facilitare lo scambio di informazioni, le azioni comuni in un mondo dove la scienza è sempre più complessa e implica interdisciplinarietà. Abbiamo voluto sviluppare una sinergia"* ricorda Louis Malassis.

La Confederazione Agropolis è nata il 24 gennaio 1986 per opera di 17 istituzioni di ricerca che hanno deciso di scambiarsi conoscenze e informazioni per lavorare in sinergia e raggiungere un più elevato grado d'efficienza. Oggi, dopo poco più di 10 anni, Agropolis riunisce 2.600 insegnanti-ricercatori, ripartiti in 200 unità.

Questo polo di ricerca, di formazione e di trasferimento tecnologico e culturale è il risultato di una storia che si può fare risalire molto indietro nel tempo, quando, nel lontano 1593, Pierre Richer de Belleval, che era un medico, diede origine per primo a una iniziativa agricola; ottenne dal Re Enrico IV l'autorizzazione di costituire il primo orto botanico di Francia e di sviluppare i rapporti con altre società scientifiche, dando alla Città di Montpellier l'immagine di un importante centro di scienze botaniche.

Qualche secolo più tardi, nel 1872, le Scuole Nazionali d'Agricoltura, che diventeranno nel 1960 le Scuole Nazionali Superiori Agronomiche, abbandonarono le zone rurali e uno dei sei Istituti si insediò a Montpellier. Anche l'INRA, sorta nel 1946, istituì, sempre a Montpellier, un centro di

ricerca in luogo dell'ENSA.M.

Nel 1962, fu presa la decisione di creare il "Centre International des Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes/Institut Agronomique Méditerranéen de Montpellier" (CIHEAM-IAM), per disporre di una struttura formativa qualificante; in seguito a uno studio affidato a Louis Malassis, allora docente all'Università di Rennes, furono costituiti, sotto l'egida dell'OCSDE e del Consiglio d'Europa, due Istituti, uno a Montpellier e uno a Bari.

Un'altra tappa fondamentale fu raggiunta negli anni Settanta con il decentramento degli Istituti dipendenti dal Ministero dell'Agricoltura voluto dal Ministro Pierre Mehaugier (il suo Direttore Generale per l'insegnamento e la ricerca era L. Malassis). Così, nel 1975, il GERDAT, diventato poi CIRAD nel 1985, si insediò a Montpellier e lo stesso fecero il "Centre National du Machinisme Agricole, du Genie Rural, des Eaux et Forêts" (CEMAGREF), il "Centre National d'Etudes Agronomiques des Régions Chaudes", l'"Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires/Section Industries Agro-alimentaires des Régions Chaudes" (ENSIA/SIARC) l'ENGREF ecc. Nacque così il "Complexe Agronomique Méditerranéenne et Tropicale de Montpellier", che venne annunciato ufficialmente dal Presidente della Repubblica Valéry Giscard d'Estaing il 17 novembre 1979 a Mazamet in un discorso dedicato al piano del Grande Sud-Ovest. Il programma era fatto, adesso occorre incominciare a lavorare.

L'incarico fu affidato a Jean-François Breton, direttore de l'ENSA.M., il quale incominciò ad allargare la cooperazione alle istituzioni dipendenti da altri Ministeri. Bisognava vincere le resistenze, superare gli interessi di parte, modificare gli statuti e ridefinire i compiti delle differenti istituzioni e così si succedettero le riunioni fino a raggiungere l'unanimità dei consensi. Durante questo periodo, lo Stato continuò a localizzare a Montpellier proprie strutture: quella del "Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération" (ORSTOM) fu decisa nel 1982; quelle dei Dipartimenti Forestali e dell'"Elevage e Médecine Vétérinaire Tropicale" (EMVT) e del CIRAD furono decise da Edith Gresson nel 1992, sempre con l'appoggio dei responsabili locali.

Nel giugno del 1985 le istituzioni decisero di dare vita a un'associazione. Jean-François Breton, morto poco tempo dopo, venne sostituito da Louis Malassis. Nel settembre del 1985, per iniziativa del Deputato-Sindaco di Montpellier Georges Frêche, i Ministri della Ricerca, della Cooperazione e il Segretario di Stato all'Agricoltura in visita a Montpellier annunciarono il loro sostegno alla creazione di un complesso agronomico mediterraneo e tropicale a Montpellier: Agropolis. Fu l'atto di battesimo.

Firmando il 24 gennaio 1986 la convenzione, le diverse istituzioni che ne fanno parte hanno dato al nuovo nato tre compiti: facilitare la produzione e la diffusione di informazioni tra le istituzioni, contribuire a proporre e a favorire azioni congiunte, assicurare una funzione generale di rappresentanza.

Il gruppo si organizza. Jean-Pierre Fremeaux, distaccato dal CHEAM-IAM.M, viene nominato Segretario generale. Jean Billiemaz diventa delegato generale alle relazioni professionali e industriali. Una segretaria del CIRAD è messa a disposizione. L'ENSA.M. fornisce i locali necessari. E' istituito tra i membri un consiglio di indirizzo e di coordinamento a cui il CIRAD farà da supporto.

Quello che è ancora un club informale non ha fondi propri nè uno statuto. Per prima cosa occorre lo statuto dell'Associazione, che viene deposto in Prefettura nel dicembre 1986. Due anni saranno necessari per perfezionare e decidere la strada da percorrere. Il nuovo modo di funzionare è ratificato il 28 gennaio 1988. Louis Malassis è eletto presidente per due anni e poi sarà rinnovato per altri due. Egli abbandonerà nel 1992, a 73 anni. Nel frattempo, la riunione del "Groupe Consultatif de la Recherche Agricole Internationale" (GCRAI), riunito a Montpellier nel 1987, aveva conferito ad Agropolis la dimensione internazionale.

Durante i due mandati L. Malassis realizza alcuni progetti quali il parco scientifico Agropolis nel 1986 e la città

internazionale nel 1987. Agropolis fonda con l'Università di Wageningen la rete NATURA che riunisce 12 Facoltà di Agraria europee specializzate in questo campo. Nel frattempo è maturata l'idea di costruire un luogo specifico per l'Associazione Agropolis International e per un museo, l'Agropolis-Museum; con il sostegno attivo di Jaques Blanc, presidente del Consiglio regionale Languedoc-Roussillon e dei Prefetti Bentejac e Gérard, l'Europa, lo Stato e la Regione decidono di assegnare 52,6 milioni di franchi alla realizzazione dei fabbricati per le necessità di Agropolis.

Nel 1992 Alfred Philippe Conesa, fino ad allora presidente del Centro INRA di Montpellier, succede a L. Malassis; eletto per 4 anni, Conesa si dedica a trasformare i progetti in realtà. I fabbricati d'Agropolis International e di Agropolis-Museum sono completati. Vengono edificate le sedi del telerilevamento e delle Scienze dell'Acqua. Il luogo di Baillarguet è divenuto un campus specializzato nella lotta biologica e raggruppa laboratori francesi, australiani e americani. Prende forma anche il progetto Vietnam, che consiste nel trasferire in quel Paese l'esperienza Agropolis adattandola.

Luogo di discussione e di sinergia, Agropolis ha conquistato la sua identità. La sua dimensione internazionale è acquisita grazie all'impianto in terra straniera di laboratori, di istituti membri come L'ORSTOM, il CIRAD e altri, alla sua appartenenza a reti, come NATURA, la rete agronomica mediterranea, la CIDEFA ecc, alla presenza di laboratori internazionali e alla costituzione della sede di organizzazioni internazionali, come le "Réseau International pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain" (INIBAP).

La comunità scientifica si regge localmente sulle relazioni tra imprese e ricercatori. Agropolis è membro dell'Associazione Montpellier-Languedoc-Roussillon-Technopole e partecipa alla borsa delle tecnologie. Essa è anche presente nel multipolo tecnologico regionale. Essa apporta ugualmente il suo contributo scientifico e tecnico ai progetti di sviluppo locale, iniziati dal consiglio generale dell'Hérault e dal suo presidente Gérard Saumade.

Presente in tre Campus (ENSAM.M.-INRA La Gaillarde, La Valette e Montferrier-Baillarguet), l'Associazione comprende le seguenti 6 strutture: il "Complexe International de Lutte Biologique Agropolis" (C.I.L.B.A.), "L'Institute Supérieure de la Vigne et du Vin de Montpellier" (ISVVM), "L'Institute des Zones Sèches" (IZS), il "Groupement d'Etudes de Recherches et de Formation Fédératif sur l'Eau" (GERF-FEAU), "L'Institut des Sciences de la Nutrition et de l'Alimentation" (ISNA), "la Maison de la Télédétection".

Nell'ottobre del 1996 Michel de Nucé de Lamothe divenne il nuovo Presidente di Agropolis. Egli osservò: *"Un tale coacervo di esperienze specialistiche sul mediterraneo e i tropici non ha equivalenti al mondo"*. Egli spera di attirare altre istituzioni francesi: *"La diversità di Agropolis rappresenta una opportunità di richiamo per rafforzare il suo ruolo a livello internazionale"*. Egli propose con le istituzioni associate uno studio per determinare le grandi poste in gioco nel secolo prossimo e preparare così un piano strategico *"Noi abbiamo bisogno di prospettive per sviluppare una strategia. A partire da quel punto potremmo presentare dei progetti. Bisogna che ci rendiamo conto, svolgendo azioni comuni, che esistono delle opportunità di sviluppare delle azioni individuali"*.

Dunque l'avventura collegiale continua. A. P. Conesa è fiducioso *"Il direttore dell'ISNAR mi diceva che l'avvenire delle nostre istituzioni passa per Agropolis. E' quando i mezzi sono ridotti, come è il caso di oggi, sono le sinergie che permettono di ottimizzarli. Agropolis è indispensabile e prefigura il modo di funzionare della società futura"*.

5 - Agropolis-Museum

Per meglio chiarire il ruolo di Agropolis come centro di cultura, le istituzioni hanno deciso di dare vita a una esposizione permanente di testimonianze della storia agro-alimentare di Francia e del mondo. Fu dato l'incarico ancora una volta al Prof. L. Malassis che lo presiede; è stato definito "Il banchetto dell'umanità o la lotta storica e le prospettive degli uomini contro la penuria

alimentare e per un'alimentazione sana e conviviale".

L'idea del Museo di Agropolis è nata nel 1986 in seguito a una riflessione dei ricercatori sulla diffusione della cultura scientifica. *"Abbiamo voluto aprire un nuovo dialogo tra comunità scientifica e cittadini"* - spiega L. Malassis -. *"Siccome gli Istituti di Ricerca che compongono Agropolis sono presenti in 70 Paesi, ci siamo accorti di avere una eccezionale rete di informazioni sull'alimentazione e l'agricoltura del mondo"*.

Il fabbricato di Agropolis-Museum è stato costruito con una architettura che simboleggia il sole che feconda la terra. Il Museo, ancora incompleto, è aperto al pubblico dal 1994.

Attualmente sono state realizzate tre sezioni. La prima è un'affresco storico: in 17 tavole, si ricostruisce l'avventura alimentare dell'uomo, dalla caccia e dalla pesca, che hanno più di 3 milioni di anni di età, fino agli alimenti che oggi si trovano sugli scaffali dei supermercati. La seconda sezione riguarda gli agricoltori nel mondo chiarendo il modo con cui l'uomo si organizza per nutrirsi: l'allevatore nomade marocchino, il risicoltore indonesiano, l'imprenditore negli USA ecc.; altrettanti tipi di agricoltura vengono presentati nei loro ambienti familiari. La terza sezione presenta i paesaggi agrari del mondo: uno schermo gigante offre allo sguardo dei visitatori le diversità ambientali.

Le esposizioni in vetrina, le fotografie e i testi sono gli strumenti privilegiati del Museo. In parallelo però sono state sviluppate altre tecniche per la presentazione delle immagini. Così l'inverno scorso commercianti e cuochi d'Africa hanno ricostruito un mercato locale nel pieno centro del Museo. La grande novità comunque resta l'introduzione di Agropolis-Museum nella rete Internet. Con il Cyber-Museum, il visitatore può muoversi in uno spazio virtuale molto ampio.

Al termine della visita del Museo, gli interessati possono sedersi comodamente in un locale dedicato al Cyber-Museum e divertirsi a visitare analoghi musei in tutto il mondo.

Quando sarà completato il Museo il percorso terminerà con il Banchetto dell'Umanità. *"L'uomo non sa nutrirsi senza coltivare la terra"* - spiega Malassis -. *"Nell'ambiente del Museo vi sarà dunque un locale con la terra avente tutt'attorno le tavole dei diversi Paesi: 8 grandi tipi di alimentazione saranno illustrati da un gioco scenico"*.

La seconda sala del Museo, intitolata "Il combattimento incompiuto" sarà dedicata alle risposte che gli scienziati tentano di dare alla sfida alimentare. I temi affrontati saranno collegati alle preoccupazioni dei ricercatori.

La terza sala di esposizione dovrebbe essere terminata nel 2002; è decisamente rivolta all'avvenire e presenterà l'alimentazione futuribile: una prospettiva che deriva dall'analisi delle statistiche e dalla ricerca scientifica.

Altre idee e progetti sono in via di approfondimento: programmi pedagogici sul Cyber-Museum, centri del gusto ecc. In breve si tratta di un Museo vivente, un Museo che non si volge esclusivamente alla storia e al passato, ma fornisce anche la possibilità di nutrire lo spirito.

6 - Una proposta per l'agro-alimentare italiano

La rassegna delle vicende vissute a Montpellier negli ultimi dodici anni dimostrano che i tempi richiesti non sono lunghi e che i finanziamenti non sono elevati nè di difficile reperimento. L'importante è dare largo respiro all'iniziativa, stabilire regole molto semplici come è appunto il confronto diretto dei ricercatori; la società degli uomini trae beneficio dalla dialettica, che è il motore che fa progredire il mondo; così avviene anche per la scienza. Riconoscere il principio significa assegnare valore alla discussione, che è antidoto alla "routine" e rimedio all'immobilismo.

Poichè non esiste ricerca senza dialettica, è costruttiva la tesi di chi, moltiplicando le occasioni di confronto, vuole accelerare il progresso scientifico e ridurre i costi. Questa è l'impostazione scelta dai promotori del progetto di Montpellier poco più di 10 anni fa, quando la Città ha cominciato a chiamare sul territorio nuove attività di ricerca e ad attivare confronti ravvicinati: un polo scientifico (Agropolis) e un polo culturale (Agropolis Museum) di portata internazionale. La singolarità è quella dell'area che non brilla per le produzioni alimentari, ma avverte la necessità di integrare economia e occupazione con l'apertura di un nuovo fronte d'attività, quello scientifico appunto. Proporre un'iniziativa analoga a Parma è più facile perchè il passaggio è lineare, quasi fisiologico, visto che aprirebbe un'ampia consultazione scientifica riguardo al sistema agro-alimentare italiano e internazionale tra Università, Stazione Sperimentale delle Conserve per l'Industria Alimentare e altri centri a vario raggio territoriale sul sistema agro-alimentare italiano e internazionale. Non sono prevedibili opposizioni a una proposta del genere che ha molti requisiti di utilità e nessuna controindicazione.

E' importante non ignorare che la realizzazione richiederà tempo e aggiustamenti in itinere, mantenendo sempre la coerenza stretta con gli obiettivi; i primi passi si muoveranno in sintonia con la ristrutturazione in atto nei centri di ricerca italiani: i 23 Istituti Sperimentali e gli altri (Istituto della Nutrizione, INEA ecc.) vigilati dal Ministero per le Politiche Agricole, le Stazioni Sperimentali del Ministero dell'Industria e del Commercio (la citata Stazione Sperimentale di Parma in primis), il CNR, il MURST ecc. Anche sotto questo profilo il momento è favorevole. D'altro canto lo stesso ingresso dell'Italia nell'area dell'Euro impegnerà il Paese a ottimizzare la spesa per la ricerca scientifica e questa al momento è l'unica via percorribile.

Ci pare di potere affermare che tutto concorre a fare ritenere maturi i tempi e favorevoli le condizioni per avviare in Italia un'iniziativa analoga a quella di Montpellier e per collegare le due organizzazioni scientifiche.

Con l'approntamento del centro per lo sviluppo delle sinergie nella ricerca tra Università degli Studi di Parma e altre istituzioni di ricerca e con la partecipazione delle imprese e delle Amministrazioni Pubbliche territoriali, si aprirebbe una nuova fase nella ricerca agro-alimentare della Città di Parma, della Regione Emilia-Romagna e dell'Italia, allineando il Paese a quanto hanno già realizzato altri nella UE.

In futuro la ricerca pura e quella applicata passeranno attraverso aggregazioni sempre maggiori, che anche l'Italia comincerebbe a realizzare almeno nell'agro-alimentare, partendo al momento giusto, nel posto giusto e in un comparto strategico.

Per quanto riguarda gli aspetti finanziari, inizialmente saranno di modesta portata, mentre cresceranno successivamente. E' possibile prevedere tre tipi di entrate:

- la prima, destinata al funzionamento generale, dovrebbe provenire dalle quote dei soci e da contributi eccezionali (questi ultimi per l'edilizia, per esempio);
- la seconda, destinata alle attività di ricerca locali, regionali e nazionali, dovrebbe provenire dai contratti di ricerca che il Centro riuscirà a stipulare con i committenti pubblici e privati;
- la terza, destinata ad azioni da condurre su progetti specifici di più largo raggio, utilizzerà i fondi internazionali dell'UE e di altre Istituzioni (BEI, World Bank ecc.).

La partenza dell'iniziativa dovrebbe prevedere una serie di interventi presso le Autorità interessate per costituire il Comitato Promotore e per fare entrare l'argomento nella scala di priorità delle cose da fare. A questo scopo l'avvio potrebbe essere scandito, ai vari livelli, da varie forme di

comunicazione.

Una volta accertata e condivisa l'opportunità di procedere alla costituzione del Comitato Promotore, dovrebbe essere questo ad operare; la sua composizione dipenderà dalle adesioni al progetto.

Se si deciderà di imboccare questa strada, Parma raccoglierebbe finalmente i frutti di tanti anni di promozione sul nome della Città e sulla sua economia.

Parole chiave: ricerca, agro-alimentare, sinergia.

Key words: research, agribusiness, synergy.

Mots clé: recherche, agro-alimentaire, synergies.

RIASSUNTO - Viene presentata la proposta di predisporre, approfittando dell'attuale fase di ristrutturazione della ricerca in Italia, un momento per valorizzare le sinergie in campo agro-alimentare, analogamente a quanto è stato fatto a Montpellier. L'iniziativa potrebbe sorgere a Parma per la presenza di maggiori requisiti rispetto ad altri territori.

SUMMARY - Taking advantage of the current restructuring of research in Italy, we propose that a period of time be set aside to evaluate the synergisms in the farm-food sector, much in the same way as occurred at Montpellier. Perhaps this initiative could be undertaken at Parma, given the greater requisites with respect to other areas.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BERTELE' U., CASATI D. (a cura di), 1992 - "L'industria agro-alimentare italiana: primo rapporto annuale", Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, Roma.
- (2) BERRA L., GAIBISSO A.M., GERBI SETHI M., RAGAZZI E., RUTELLI A., VITALI G., 1997 - "L'industria alimentare in Italia e in Europa: diversificazione, innovazione, distribuzione e mercato", CERIS, Torino.
- (3) CANTARELLI F., 1992 - "L'agro-alimentare italiano e mercato unico". In *Atti del 1° Seminario Internazionale di studio "Dalla politica agricola alla politica alimentare in Europa e in Italia"*, Parma, 7-8 maggio.
- (4) CANTARELLI F., 1994 - "I prodotti tipici di qualità sul mercato europeo e internazionale". In *Forum sull'economia parmense: situazione e prospettive*. C.C.I.A.A. di Parma.
- (5) CANTARELLI F., 1995 - "Cultura agro-alimentare e società. Per il Progetto di una sede di dialogo". In *Parma Economica*, n. 4.
- (6) CANTARELLI F., 1996 - "Alimenti della tradizione mediterranea e mercato comunitario". Rivista di Economia Agro-Alimentare, numero zero, SIEA, Parma.
- (7) CANTARELLI F., 1996 - "L'Osservatorio Internazionale per la valorizzazione degli alimenti tradizionali dei paesi mediterranei della UE". Relazione tenuta al *Convegno "L'Osservatorio dei nuovi equilibri agro-alimentari dell'UE"*, Ancarano 7 ottobre 1995. In *Parma Economica*, n. 3.
- (8) CANTARELLI F., 1996 - "Un'idea per Reggio Emilia: Il Parco storico della gastronomia medio-padana". In *Rivista Il Filugello*, n. 2, Camera di Commercio I.A.eA., Reggio Emilia.
- (9) CANTARELLI F., 1996 - "Il Museo Agro-alimentare: un'idea da coltivare". (Bozza) In *Agricoltura*, n.7/8, Bologna.
- (10) CANTARELLI F., 1998 - "Produkty żywnościowe typowo lokalne a rynek globalny: czynniki decydujące i strategię", in *Polish Agricultural Annual*, Vol. 87 n.1, Warszawa Polska Akademia Nauk.
- (11) CANTARELLI F., 1998 - "Enjeux de compétitivité des industries agroalimentaires d'Italie dans l'Europe de demain". In *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, Vol. 84, n. 3, Paris.
- (12) CANTARELLI F., 1998 - (a cura di) - "Rapporto sullo stato dell'agro-alimentare in Italia nel 1997", Franco Angeli Ed., Milano.
- (13) CANTARELLI F., (1998) - "Ricerca agroalimentare: Parma può essere il polo". In *Agricoltura* n. 10, Bologna.
- (14) CAPATTI A., DE BERNARDI A., VARNI A., 1998 - "Storia d'Italia", Annali 13 l'alimentazione, Einaudi Ed., Torino.
- (15) CASATI D., 1994 - "I rapporti agricoltura industria nell'attuale fase evolutiva del sistema agroalimentare italiano". In *Diritto ed Economia*, n. 3.

- (16) CASATI D. (a cura di), 1997 - "Evoluzione e adattamenti nel sistema agro-industriale", pubblicazione RAISA., F. Angeli Ed., Milano.
- (17) CESARETTI G.P., MARIANI A.C., SODANO V., (a cura di), 1994 - "Sistema agro-alimentare e mercati agricoli", Il Mulino Ed., Bologna.
- (18) CUPO C. (a cura di), 1996 - "I sistemi agro-alimentari mediterranei: confronti e prospettive". In *Atti del Convegno Internazionale SIEA*, Ischia, 13-15 giugno.
- (19) DE CASTRO P., DESERTI R., 1995 - "Imprese multinazionali. Strategie di mercato e nuovi scenari del sistema agro-alimentare italiano", In *Rivista di Politica Agraria*, n. 3.
- (20) EUROSTAT, 1997 - "Panorama de l'industrie communautaire", Commission européenne, Luxembourg.
- (21) FANFANI R., MONTRESOR R., 1994 - "Gli strumenti interpretativi del sistema agroalimentare italiano. In *Sistema agroalimentare e mercati agricoli*, a cura di Cesaretti G.P., Mariani A.C. e Sodano V. Il Mulino Ed., Bologna.
- (22) GERBHI SETHI M. (a cura di), 1995 - "Struttura, redditività e sviluppo nelle industrie alimentari in Italia", Quaderni CERIS, pubblicazione RAISA 1/93, Torino.
- (23) LARGO CONSUMO, 1997 - "Agro-alimentare 1997: scenari di settore".
- (24) LEONE F.G., GERBI SETHI M., RUTELLI A., 1995 - "I consumi, il mercato, la struttura distributiva alimentare in Italia", Quaderni CERIS, pubblicazione RAISA 2/93, Torino.
- (25) MALASSIS L., GHERSI G., 1995 - "Economie de la production et de la consommation", Cujas, Parigi.
- (26) PEREZ R., 1995 - "L'internationalisation des industries et des strategies des firmes alimentaires", Académie d'Agriculture de France.
- (27) PIERI R., VENTURINI L. (a cura di), 1995 - "Strategie e competitività nel sistema agroalimentare: il caso italiano", F. Angeli Ed., Milano.

ASPETTI ECONOMICI DELL'ALLEVAMENTO DEL CINGHIALE

A. Salghetti*

** Istituto di Economia Rurale e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.*

1. Introduzione

A partire dagli anni Sessanta, con il miracolo economico, si è innestato l'esodo agricolo e rurale, che ha colpito le zone svantaggiate del Paese a favore della pianura.

Le stesse aree, che nelle epoche passate erano state recuperate all'agricoltura, ora venivano restituite perchè emarginate dal nuovo sviluppo economico.

Contemporaneamente la nuova ricchezza del Paese, eliminate le sacche di sottonutrizione, ha cominciato a selezionare gli alimenti riducendo, ad esempio, i consumi di carni bovine a favore di carni alternative, tra le quali anche quelle degli ungulati selvatici.

Da queste ragioni, all'inizio del decennio scorso, nasce l'allevamento degli ungulati selvatici, nelle aree in cui la domanda turistica si aggiungeva a quella dei residenti e dove il paesaggio medioevale rendeva più naturale l'impatto con queste carni (Umbria).

Da molte parti gli allevamenti vengono indicati come validi strumenti per il recupero delle aree abbandonate in alternativa agli allevamenti zootecnici tradizionali.

Le possibilità di espansione degli allevamenti vengono stimolate anche dall'opportunità di ridurre la nostra dipendenza dalle importazioni e dalle prospettive di aumento dei consumi interni di carni alternative nei prossimi anni.

D'altra parte i consumi attuali di carni di ungulati selvatici sono assicurati in larga prevalenza dai Paesi dell'Est europeo. Quivi le recenti restrizioni all'esercizio venatorio e la necessità di consumare all'interno dei Paesi questi animali, fanno ritenere in diminuzione le esportazioni.

Più recentemente l'area di approvvigionamento di carne di ungulati selvatici si è ulteriormente estesa. In particolare per la carne di cinghiale la quota maggiore proviene dall'Australia. Si tratta di prodotto congelato che viene importato quando non è più disponibile il prodotto fresco nei paesi di importazione più vicini e nei periodi in cui gli ungulati non sono cacciabili.

Infatti, i prodotti di importazione provengono più frequentemente da animali liberi, solo in parte e per alcune specie, come per il cervo, si tratta di animali provenienti dall'allevamento. Di qui la necessità di aumentare l'offerta interna espandendo gli allevamenti.

Altre prospettive di espansione si sono aperte negli ultimi anni per finalità amatoriali, agrituristiche, paesaggistiche e venatorie che hanno richiamato l'interesse di nuovi allevatori, Enti pubblici e singoli cittadini.

Anche le limitazioni produttive (quote) a livello CE hanno indotto gli allevatori a spostarsi su soluzioni alternative, senza vincoli, come è quella delle carni di selvatici.

Pertanto oggi ci troviamo di fronte a buone prospettive per questi allevamenti anche se non mancano le zone d'ombra, provocate dalla mancanza del mercato che, una volta conclusa la fase espansiva degli allevamenti, consenta la collocazione del prodotto al consumo a prezzi remunerativi.

2. Ungulati selvatici ed ambiente

L'ambiente naturale degli ungulati selvatici sono le aree collinari e montane, caratterizzate da aspetti pedo-climatici e biologici favorevoli, dove è diffuso l'abbandono e la sottoutilizzazione delle terre.

I selvatici sono i migliori utilizzatori delle scarse risorse alimentari ivi presenti e i migliori trasformatori di pabulum ricco di cellulosa.

Sono queste le condizioni frequenti nel nostro Paese costituito per il 77% da aree collinari e montane e dove oltre 2 milioni di ettari risultano abbandonati. L'utilizzazione con allevamenti di ungulati selvatici appare una delle alternative possibili, non necessariamente l'unica.

Infatti l'abbandono del territorio antropizzato porta con sé il degrado e il successivo dissesto idrogeologico, anche in conseguenza della particolare giacitura di queste terre. Quivi le attività agricole-zootecniche tradizionali sono state espulse dal circuito economico e sarebbe anacronistico riproporle.

I selvatici hanno la possibilità di utilizzare vaste aree, in cui prevalgono essenze vegetali scarsamente o per niente utilizzabili dalle specie domestiche.

Lo sfruttamento delle produzioni animali, l'innesto di attività artigianali, turistiche e sportive-venatorie può contribuire ad accrescere la domanda, che è il primo stimolo alla rivitalizzazione dell'economia locale.

Non sono da trascurare le possibilità offerte dalla presenza di questi animali sul territorio per promuovere attività di ricerca e didattico-educative.

Il rapporto tra ambiente ed ungulati apre quindi una serie di prospettive, che possono essere colte dall'allevatore, sostenute dagli Enti pubblici, per sfruttare le sinergie e i molteplici interessi legati alla loro presenza, per rendere economica l'attività di allevamento che avrebbe difficoltà ad esserlo in forma autonoma.

3. Consistenza e distribuzione degli allevamenti di cinghiale in Italia

3.1 Premessa

In Italia gli allevatori sono molto attenti alle opportunità produttive emergenti, come dimostrano gli allevamenti di animali da pelliccia, di lombrichi, di chiocchie ecc.; in campo vegetale, la soia, il girasole, il kiwi (in pochi anni siamo diventati i maggiori produttori mondiali) e altre colture esotiche in breve tempo hanno proliferato con una rapidità inimmaginabile solo pochi anni fa. Infatti i mercati ora sono divenuti dinamici e i produttori cambiano colture e allevamenti in funzione del reddito ritraibile.

E' anche il caso degli allevamenti di ungulati selvatici, la cui diffusione ha assunto dimensioni eclatanti in alcune regioni, come la Toscana e l'Umbria, da dove si stanno irradiando gradualmente in altre regioni, grazie alla disponibilità dei riproduttori.

3.2 Consistenza degli allevamenti

In Italia, nel 1991, abbiamo accertato la presenza di 661 allevamenti di cinghiale per complessivi 14.095 capi. La consistenza media per allevamento è di 21 capi.

E' l'ungulato selvatico più allevato in Italia. Infatti esso è presente nel 68% degli allevamenti di ungulati selvatici e raggiunge quasi la metà di tutti i capi. Contribuisce per quasi il 90% alla produzione interna di carne di tutti gli ungulati selvatici allevati.

Lo troviamo presente più diffusamente in allevamenti specializzati, ma anche insieme ad altre specie, in questi casi è sempre la specie più rappresentata.

E' un animale onnivoro, che si ciba di vegetali epigei ed ipogei senza distinzione (ghlande, tuberi, nocciole, noci, castagne, rape, leguminose, radici, frutti selvatici ecc.), e di piccoli animali vivi o morti e di rifiuti organici (immondizie), in analogia con il suino domestico.

Predilige le macchie fitte, ricche di acqua dove abbeverarsi e rotolarsi, e i sottoboschi intricati, dove si può nascondere nelle ore diurne per uscire ad alimentarsi in quelle notturne.

Un'elevata concentrazione di animali comporta la scomparsa del sottobosco, senza contare lo scoperchiamento delle radici delle piante e dei sassi facendo tabula rasa di quanto si trova alla portata del grugno.

Il cinghiale è piuttosto tollerante nei confronti degli altri ungulati e non è molto competitivo nel prelievo degli alimenti spontanei con i ruminanti.

L'affannosa ricerca del cibo porta l'animale a compiere spostamenti anche notevoli in piccoli branchi. La vita di gruppo consente ai piccoli orfani di venire adottati dalle altre femmine in lattazione.

Il problema non si pone negli allevamenti dove il cibo viene somministrato in toto o ad integrazione di quello spontaneo nei periodi di carenza alimentare. In questo non si differenzia dal suino, assumendo i medesimi alimenti (scarti di cucina negli allevamenti familiari).

Si prevede che la tradizione dell'allevamento familiare del cinghiale vada scemando, in analogia con quanto già avvenuto per il suino domestico a causa dell'impegno richiesto, della necessità di spazi idonei ecc. Inoltre la poca pulizia e gli odori sono incompatibili con le condizioni di vita della famiglia agricola che è molto vicina ormai a quella urbana.

La specie si adatta molto bene all'allevamento intensivo, anche in ricoveri in muratura, come per il suino. Gli allevamenti intensivi di cinghiale assicurano i rifornimenti di carne fresca ai ristoranti e alle industrie salumiere, quando la trasformazione non si effettua nello stesso allevamento per la produzione artigianale di salumi e di insaccati.

La carne di cinghiale è molto richiesta dai ristoranti e gode di un notevole apprezzamento tra i consumatori, stimolando anche il flusso turistico, come avviene in Italia Centrale.

Tab. 1 - Allevamenti di cinghiale e capi per classe di ampiezza e regione

Tab. 1 - Allevamenti di cinghiale e capi per classe di ampiezza e regione

REGIONE	Fino a 5		da 6 a 20		da 21 a 50		da 51 a 100		oltre 100		Totale	
	Allev.	Capi	Allev.	Capi	Allev.	Capi	Allev.	Capi	Allev.	Capi	Allev.	Cap.
PIEMONTE	92	259	130	1.422	17	474	3	295	4	594	246	2.904
VALLE D'ACOSTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LOMBARDIA	11	36	8	85	2	71	0	0	0	0	21	172
TRENTINO-ALTO ADIGE	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5
VENETO	3	9	0	0	1	25	1	70	0	0	5	104
FRIULI-VENEZIA GIULIA	0	0	3	33	1	25	0	0	0	0	4	58
LIGURIA	39	94	26	243	3	95	1	92	0	0	69	524
EMILIA-ROMAGNA	31	95	13	136	4	146	0	0	0	0	48	378
TOSCANA	29	89	4	59	5	214	0	0	10	3.832	46	4.194
UMBRIA	49	148	3	43	2	75	2	200	2	330	56	726
MARCHE	14	56	1	12	2	65	0	0	1	210	18	343
LAZIO	20	40	1	10	0	0	0	0	2	1.689	23	1.739
ABRUZZI	57	276	6	71	3	100	1	55	3	490	80	964
MOLISE	20	60	0	0	0	0	0	0	0	0	20	60
CAMPANIA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	120	1	120
PUGLIA	0	0	0	0	1	30	0	0	1	150	2	180
BASILICATA	0	0	0	0	1	40	1	70	2	370	4	480
CALABRIA	0	0	0	0	1	36	1	67	2	700	4	803
SICILIA	0	0	4	49	1	30	1	60	0	0	6	139
SARDEGNA	1	2	0	0	1	50	0	0	0	0	2	52
ITALIA	376	1.172	199	2.143	45	1.476	11	649	28	8.455	661	14.095

Il cinghiale, si ripete, è la specie più allevata tra tutti gli ungulati selvatici. Detiene infatti la maggioranza assoluta negli allevamenti privati (67%), gli Enti pubblici hanno il rimanente 33%. Se si escludono i cinghiali degli Enti pubblici di Siena e Roma, che sono 3.689, rimane solamente il 7% dei capi appartenenti ancora agli Enti pubblici, a dimostrazione che l'interesse per questa specie è prettamente dei privati.

L'analisi per classe di dimensione delle mandrie mette in evidenza che i piccolissimi allevamenti, fino a 5 capi, sono la maggioranza con il 57% e detengono solamente l'8% dei soggetti. Sono gli allevamenti di tipo familiare per l'autoconsumo e gli animali sono collocati nelle porcilaie ed alimentati come i suini, con l'impiego di mangimi e di scarti della cucina. Questo tipo di allevamento è particolarmente diffuso in Piemonte.

Per contro, i grossi allevamenti, con oltre 100 capi, sono solo il 4%, ma arrivano al 60% dei capi, la consistenza media è di 302 unità presenti. Sono più diffusi tra gli Enti pubblici, dove i cinghiali vengono allevati con sistemi estensivi. Le forme intensive si riferiscono più frequentemente agli allevamenti di privati.

Le classi di ampiezza intermedie alle precedenti interessano il 39% degli allevamenti e il 32% dei capi.

3.3 Grado di specializzazione

L'interesse degli allevatori si può rivolgere ad una singola specie o a più specie contemporaneamente (allevamenti promiscui).

Negli allevamenti specializzati di cinghiale è quasi esclusiva la presenza di privati con 613 unità su 616, mentre per il numero di capi gli allevamenti pubblici detengono il 12%. Infatti la consistenza media dei capi per allevamento dei privati è di 11 capi; molto più bassa dei pubblici che arrivano a 310 capi.

E' stato accertato che la consistenza media dei capi per allevamento è sempre più elevata negli Enti pubblici rispetto ai privati, sia negli allevamenti specializzati sia in quelli promiscui.

In sostanza, gli allevamenti di cinghiale in Italia sono quasi tutti specializzati, come è naturale che sia trattandosi di attività nuove, non ancora bene conosciute. Inoltre è specializzato il

93% delle unità complessive degli allevamenti di ungulati selvatici in genere, con una consistenza di capi del 53% del totale.

La forte presenza dei privati è legata al modesto impegno che spesso comportano gli ungulati selvatici, all'interesse che sollevano e alla possibilità di utilizzarli per il consumo familiare. Allevando una sola specie si semplifica la gestione. Sono infatti gli allevatori privati di cinghiali che prevalgono con il 69% di tutte le aziende specializzate delle varie specie di ungulati selvatici.

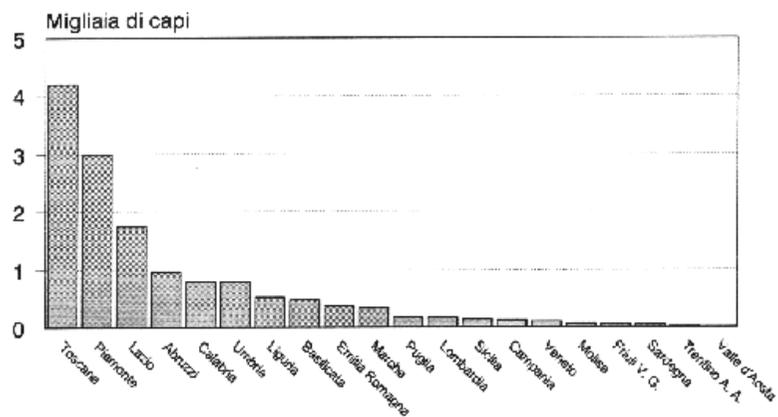
Per quanto riguarda coloro che allevano altre specie assieme al cinghiale in più recinti o in uno solo (anche negli allevamenti specializzati i recinti possono essere più di uno sia per regolare il pascolamento e formare dei gruppi omogenei sia per tenere separati i sessi in certi periodi dell'anno) questi devono disporre di grandi spazi avendo una presenza più numerosa di animali.

3.4 Distribuzione geografica

Il cinghiale può essere equiparato al suino; nei piccoli allevamenti non è infatti inusuale trovare incroci tra suino e cinghiale in porcellaia. Questi allevamenti sono molto diffusi in Piemonte dove se ne contano più di un terzo del totale, con il 21% dei capi; è la Regione al secondo posto in Italia, con una media di 12 capi per allevamento. In testa alla classifica si trova la Toscana, con 4.194 capi (la dimensione media è di 87 capi per allevamento). Qui l'attività zootecnica assume dimensioni industriali mettendo in moto un diffuso mercato delle carni, che vengono cedute alla ristorazione locale, da tempo orientata a valorizzare piatti tipici di selvaggina o insaccati ed altri prodotti a lunga conservazione (prosciutti, spalle, affumicati ecc.).

Seguono in ordine d'importanza la Regione Lazio con 1.739 capi, gli Abruzzi con 964 capi, la Calabria con 803 capi, l'Umbria con 796 capi e la Liguria con 524 capi.

Graf. 1 - Cinghiali allevati per regione



Non risultano allevamenti di cinghiale in Valle d'Aosta e nel 42% delle province italiane, anche se qualche allevamento familiare non è da escludere che sia sfuggito alle nostre ricerche. Il diffuso carattere familiare degli allevamenti di cinghiali è testimoniato dalla presenza del 57% degli allevamenti che non superano i 5 capi.

L'allevamento di maggiori dimensioni è presente nella Provincia di Roma con 1.389 capi, nella Tenuta Presidenziale di Castelporziano.

Negli allevamenti familiari il rifornimento dei cinghialetti è affidato al mercato o alla compravendita di femmine gravide. E' un'economia di autoconsumo molto simile a quella del suino domestico.

Non mancano gli allevamenti condotti da gruppi di amici o parenti, le cui produzioni serviranno a coprire i fabbisogni delle rispettive famiglie.

In Toscana, nonostante la diffusione degli allevamenti di cinghiali, la Regione disincentiva gli allevamenti familiari a scopo di profilassi contro la peste suina classica.

La diffusione allo stato libero è superiore a quanto si potrebbe pensare a motivo della elevata prolificità; questo crea non pochi problemi per i danni che l'animale arreca all'agricoltura delle aree interessate.

Il cinghiale è diffuso in tutto il continente da tempi molto lontani e non ha mai avuto problemi di sopravvivenza, piuttosto di contenimento. Anche nel calendario venatorio la durata della caccia è prolungata di un mese rispetto a quella prevista per gli altri ungulati selvatici.

E' un animale facilmente adattabile all'ambiente e al tipo di alimento disponibile, con l'abbandono della montagna ha esteso il suo spazio vitale e in Italia è oggi in forte espansione. Allo stato libero si sta diffondendo da alcuni anni anche nelle zone alpine.

In alcune province viene disincentivato l'allevamento per i rischi di inquinamento dei ceppi autoctoni e per i pericoli sanitari (peste suina classica, afta). In Provincia di Imperia è proibito l'allevamento del cinghiale per evitare ibridazioni con un ceppo locale puro. Viceversa, non molto lontano, in Provincia di Genova, sono presenti anche allevamenti ibridi con il suino. In genere vengono disincentivati gli allevamenti dove vi sia eccesso di cinghiali in libertà che possono provocare gravi danni all'agricoltura.

La prolificità delle razze di importazione sta creando ulteriori problemi, sono soggetti anche più pesanti che necessitano di maggiori quantità di alimenti che vanno a procurarsi nei campi coltivati, sfidando l'uomo, ciò che non avveniva con le razze autoctone. Il maschio può raggiungere il peso di kg 200, il peso medio si aggira attorno al quintale.

4. Tecnica ed economia dell'allevamento del cinghiale

Gli allevamenti di ungulati selvatici sono sorti in genere al di fuori di interventi pubblici di sostegno, tranne negli ultimi anni, dove alcune regioni hanno inserito normative specifiche per alcune specie, tra cui il cinghiale. Alcune regioni, per altro, non nascondono delle perplessità per i rischi sanitari e la diffusione nel territorio allo stato libero di soggetti che possono inquinare le razze autoctone o addirittura con animali incrociati con il suino domestico

Nelle prime iniziative, più che l'interesse economico, è stata la molla della passione per la natura, che ha stimolato l'apertura degli allevamenti, in un secondo tempo si è posto il problema economico in relazione alle dimensioni delle mandrie.

Infatti è il capitale esterno al mondo agricolo a prevalere nell'avvio di nuove iniziative, anche gli operatori hanno spesso altre attività lavorative, quando non si tratti di pensionati. Lo scarso impegno di lavoro degli allevamenti estensivi bene si adatta a chi svolge altre attività e considera l'allevamento un secondo lavoro (part-time) e un passatempo nel caso di piccole e piccolissime dimensioni.

L'iniziativa assume risvolti economici negli allevamenti di grosse dimensioni per l'entità degli investimenti, l'organizzazione produttiva e l'impegno di lavoro.

Queste aziende si vanno poi differenziando nelle finalità che non sono limitate alla produzione di carne e di soggetti da riproduzione, ma coinvolgono la trasformazione (tagli di carne ed insaccati) e la fornitura di servizi (agriturismo, caccia, ristorazione ecc).

Di frequente vengono adibiti ad allevamento parti di proprietà abbandonate o che non riescono a dare reddito, per le quali l'allevamento di selvaggina rappresenta un modo di utilizzare le magre risorse, in assenza di alternative.

Le strutture utilizzate sono alquanto differenziate, a parte la recinzione che è comune a tutti e che spesso rappresenta l'investimento più consistente. Infatti i piccoli allevamenti hanno solo la recinzione, alcuni utilizzano rustici abbandonati, che svolgono la funzione di ricovero e luogo di somministrazione degli alimenti ad integrazione del pascolo.

Nel caso dei cinghiali, dove vengono allevati alla stregua dei maiali, sono gli stessi rustici la sede dell'allevamento. L'impiego di lavoro è ridotto al minimo, e riguarda l'alimentazione, la pulizia e la sorveglianza.

Per il prelievo dei capi vige a volte il verbo "arrangiarsi", l'utilizzazione domestica avviene secondo le regole di macellazione del suino.

Spesso sono più famiglie che si aggregano per valorizzare al meglio i prodotti ottenuti secondo una tradizione che trova collegamenti con l'esercizio venatorio.

All'opposto troviamo i grossi allevamenti che si pongono finalità economiche. In questo caso, gli aspetti da prendere in considerazione sono molteplici a partire dalla tipologia dell'allevamento, dalle risorse alimentari disponibili, dalla destinazione degli animali ecc.

A seconda della disponibilità totale o parziale degli alimenti all'interno del recinto per l'intero arco dell'anno possiamo avere tre tipi di allevamenti: estensivi, intensivi e semiestensivi.

Gli elementi da prendere in esame nel progettare un allevamento sono molteplici a partire dallo stato dell'ambiente, dagli obiettivi dell'allevatore, dalle disponibilità finanziarie ecc.

Gli inconvenienti spesso lamentati sono quelli riferibili a malattie, parassitosi, stress, fughe volontarie o provocate, bracconaggio, cani e altri predatori, eventi meteorologici, eccessi o carenze alimentari, lotte fra animali ecc.

La scelta dell'area riveste molta importanza negli allevamenti estensivi per la stretta connessione tra ambiente e selvatici; viceversa in quelli intensivi l'area perde di importanza essendo risolto altrimenti il problema alimentare. Nel primo caso vige la legge del minimo tra risorse e fabbisogni alimentari. Nel secondo caso l'area ha una mera funzione di contenitore, come è la stalla per i bovini, salvo assicurare un minimo di ripari naturali o artificiali.

La varietà delle essenze boschive e la presenza di radure a pascolo dovrebbero dare le maggiori garanzie di adattamento e di soddisfacimento dei fabbisogni alimentari.

Il bosco, oltre a fornire alimento prezioso nei periodi senza foraggio, svolge anche funzioni di protezione degli animali dal caldo e dai venti, nonché di rifugio, per tranquillizzare gli animali, che vi si possono rifugiare al minimo allarme.

E' auspicabile la presenza di acqua sorgiva, in ogni caso può esservi apportata anche altra acqua, purchè rinnovata continuamente.

Individuata l'area, questa verrà dimensionata al numero di capi che si intende allevare secondo le regole indicate sopra.

La razione di mantenimento in Unità Foraggere (UF), secondo Perco (1988), è di 237 UF all'anno, pari a 0,65 giornaliere, per un cinghiale di Kg 60.

Il calcolo della disponibilità in UF del recinto è più complessa e varia secondo la composizione floristica, il clima, l'altitudine, la natura dei terreni ecc.

Dimensionata la mandria e l'area da recintare si prendono in esame le spese per le strutture, i capitali e la gestione.

L'investimento di gran lunga più importante è la recinzione, la cui tipologia e altezza varia in relazione alla specie, ma che in ogni caso non deve essere inferiore a 1,20 metri in base alla Legge 157/92, per precludere l'accesso degli estranei.

Oltre alla recinzione perimetrale sarà necessario prevedere anche delle recinzioni per suddivisioni interne, la cui altezza può derogare dalle norme di legge e limitarsi alle esigenze effettive per il contenimento degli animali.

Alla recinzione va aggiunta la spesa per i cancelli il cui numero varia a seconda della estensione del recinto e dalla presenza di recinzioni interne.

La rete adatta per i cinghiali deve essere molto robusta (a maglia sciolta, tipo gabbioni para sassi) e deve avere un'altezza di m 1,5 ed un interrimento di cm 40-50.

Da rilevazioni effettuate in Toscana nel 1996 risulta che una recinzione per cinghiali costa mediamente sulle 20.000-30.000 lire il metro lineare.

I costi possono variare in relazione alle asperità del terreno, ai cancelli di accesso con mezzi meccanici, alla disponibilità di paleria sul posto e di impiego di manodopera familiare.

Va ricordato che la recinzione non impedisce solo la fuoriuscita degli animali, ma serve anche ad impedire l'ingresso di estranei, è inoltre una barriera all'ingresso di cani randagi e predatori.

La seconda struttura, in ordine di spesa, è il recinto di cattura per poter prendere gli animali destinati alla vendita o ai controlli, trattamenti sanitari, smistamento ecc.

Il costo di un recinto di cattura, con box, rotonde, corridoi ecc, si aggira sui 5-8 milioni di lire. Non entriamo nel merito della struttura, basti qui ricordare che per la cattura degli animali da ripopolamento non si può fare a meno della trappola che si completa con la gabbia per una spesa di 600.000-800.000 lire.

Disponendo di manodopera familiare, il recinto di cattura può richiedere le sole spese vive, a cui si deve aggiungere la spesa per la gabbia di cattura e l'eventuale pesa il cui costo va da 1 a 3 milioni di lire.

I costi strutturali incidono sul bilancio per il 5% del valore, considerando una durata ventennale; all'ammortamento vanno aggiunte manutenzione ed assicurazione, valutabili la metà delle precedenti.

Vanno poi considerate le spese variabili per materiali e servizi, spese sanitarie e di trasporto. Le integrazioni alimentari dipenderanno dalle tipologie dell'allevamento.

Negli allevamenti intensivi le spese sanitarie si possono stimare intorno alle 5.000-10.000 lire a capo per anno, dove sono compresi gli antiparassitari, due tre volte all'anno, i narcotizzanti ecc. In genere si può dire che la spesa è di circa 1-2 milioni di lire per una mandria di 150-200 capi.

Le spese di alimentazione, comprensive di foraggio e mangimi concentrati e integrati, sono valutabili in 200.000-250.000 lire annue per il cinghiale in allevamento intensivo. L'alimentazione del cinghiale è equiparabile a quella del suino, anche se l'animale si accontenta di alimenti di scarto con un costo inferiore. Negli allevamenti semintensivi il costo di alimentazione si può dimezzare, mentre in quelli estensivi non esiste l'acquisto di alimenti.

Altre spese possono riguardare l'impiego di trattore o fuoristrada per il controllo dei recinti almeno una volta la settimana e le spese amministrative.

Se aggiungiamo infine il costo della manodopera, gli interessi sui capitali investiti e il prezzo d'uso della terra, otteniamo i costi totali dell'allevamento.

Nel caso in cui l'allevatore disponga della terra e vi lavori con la famiglia, i suoi costi espliciti sono solo le spese di reintegrazione.

Passando ad esaminare l'attivo del bilancio, supponendo che la mandria sia a regime e non si ricorra all'acquisto di capi, la produzione è rappresentata dalla vendita di animali da macello e da riproduzione - giovani e adulti - e dagli animali di scarto, in pratica rappresenta l'utile lordo di stalla che viene calcolato anche per la produzione di carne nei bovini.

Dalla differenza tra l'attivo e i costi espliciti si ottiene il reddito netto dell'allevamento, che va a remunerare i conferimenti di fattori produttivi dell'imprenditore e della sua famiglia: lavoro, terra e capitale d'esercizio.

E' sul reddito netto, in particolare riferito al lavoro familiare, che si misura l'efficienza dell'allevamento e si verificano le condizioni per garantire la continuazione dell'impresa.

Il solo allevamento dei selvatici difficilmente può garantire un'occupazione e un reddito soddisfacente ad una unità lavoratrice a tempo pieno. Di qui la necessità dell'integrazione con altre attività agricole o con occupazioni extragricole.

Più frequentemente l'allevamento del cinghiale, come di altri ungulati selvatici, fornisce una integrazione di reddito, il cui apporto dipende dalle dimensioni della mandria.

Nel caso dei cinghiali è possibile raggiungere rapidamente adeguate dimensioni della mandria grazie alla prolificità degli animali. Il mantenimento di grosse mandrie non può prescindere dalla somministrazione di alimenti, che prefigurano un tipo di allevamento intensivo.

Sono le realtà emergenti per poter assicurare una massa critica di prodotto alle industrie di trasformazione e alle catene di distribuzione, avviando una forma di consumo della carne di cinghiale diluita in un lasso di tempo più lungo.

5. Mercato del vivo e della carne di cinghiale

Il mercato degli ungulati selvatici è caratterizzato da scarsa trasparenza, soprattutto per quanto riguarda gli animali da vita. La dispersione sul territorio degli allevamenti e le scarse informazioni disponibili per coloro che accedono ai nuovi allevamenti lasciano ampi spazi di manovra alla speculazione commerciale.

Riportiamo, a titolo indicativo, alcuni prezzi rilevati nel 1996 in Toscana sulla compravendita di cinghiali da ripopolamento:

Categoria	Lire/capo
Magroni	500.000-600.000
Adulti	700.000-800.000
Femmine gravide	900.000-1.000.000
Maschi da riproduzione	900.000-1.000.000

Per quanto riguarda gli animali da carne si tiene conto che il peso di macellazione del cinghiale si aggira sui 50-70 chilogrammi, corrispondenti a 30-40 chilogrammi di carne. I relativi prezzi vanno dalle 7.000 alle 8.000 lire il chilogrammo per il vivo e dalle 15.000 alle 16.000 lire per il morto.

Orientativamente la resa al macello per il cinghiale può arrivare al 65-70%, mentre è di circa il 50% per gli altri ungulati selvatici.

I pesi degli animali macellati sono generalmente variabili per la presenza di scarti, che abbassano la media, senza contare poi la variabilità dei ceppi: alcuni leggeri, come il cinghiale maremmano, altri più pesanti, come il cinghiale ungherese. La presenza di animali giovani tra quelli macellati contribuisce a ridurre il peso medio.

Notevole variabilità viene riscontrata anche nei prezzi, sono più stabili quelli dei capi da macello, mentre per i soggetti da riproduzione e da trofeo i prezzi si differenziano di molto a seconda del pregio dei soggetti, del sesso, dell'età ecc. Sarebbero questi i prezzi più remunerativi, che rendono interessante l'allevamento sotto l'aspetto economico. I soggetti gravidi, naturalmente, hanno un riconoscimento di prezzo maggiore; così ad esempio le femmine gravide di cinghiale scontano un prezzo di circa un milione di lire a capo. Ai prezzi indicati va aggiunta la spesa per il trasporto dei capi.

In genere, si ripete, il mercato degli ungulati selvatici è ancora poco trasparente, dato il limitato numero e la dispersione dei produttori e degli acquirenti.

La specie di ungulato selvatico con i prezzi più stabili è comunque il cinghiale, per l'entità della produzione e la prolificità rispetto alle altre specie.

Vi sono pertanto nicchie di mercato quando si instaurano rapporti diretti tra allevatore e Comunità locale (ristoranti, macellai, privati consumatori), o quando la trasformazione delle carni avviene all'interno dell'azienda, con produzione di salumi, ed è attivato l'agriturismo, oppure quando si vendono animali vivi a scopo di ripopolamento e caccia.

In altri casi l'eccesso di offerta porta delle difficoltà nella collocazione dei capi sul posto ed estende il mercato fuori delle aree strettamente locali. Tra i primi ed i secondi non è raro riscontrare differenze di prezzo del 30-50%.

Il punto debole degli allevamenti rimane il mercato. L'aumento produttivo non può prescindere da un'espansione del consumo e da una migliore organizzazione dell'offerta per instaurare un rapporto senza scosse tra produttori e domanda finale.

Un rischio che viene lamentato da alcuni è che l'eccesso di offerta possa disturbare, in mancanza di interventi correttivi, le stesse nicchie di mercato.

La situazione del mercato è quindi varia: c'è chi non riesce a vendere e deve disfarsi di animali in eccesso a prezzi bassi e chi pretende prezzi alti sui mercati locali.

Resta comunque elevata la concorrenza del prodotto importato surgelato di cinghiale ad un prezzo che si aggira sulle 11.000 lire il chilogrammo all'ingrosso in tagli con osso, per arrivare a 12.300 il chilogrammo dopo la lavorazione. In effetti il prodotto di importazione è diverso perchè non proviene da allevamenti ma da animali non confinati, cioè in libertà.

Il prodotto d'importazione lascia a desiderare per la qualità, spesso a causa della provenienza da animali vecchi, da scarti di trofei di caccia, da animali abbattuti per problemi di salute o fisici; inoltre il lungo percorso tra luogo di abbattimento e luoghi di lavorazione e surgelazione, in condizioni di igiene non sempre ideali, non depone a favore della qualità.

Ecco perchè i ristoratori delle zone vocate all'allevamento preferiscono la produzione locale fresca, che da maggiori garanzie in tutti i sensi, accontentando i gusti dei consumatori che sono particolarmente attenti soprattutto quando si devono spostare per apprezzare qualcosa di diverso, che non trovano in città.

Quindi non è sufficiente solo produrre ma è ugualmente importante immettere le carni nei canali più idonei a valorizzarle.

Infatti l'entità della produzione interna, pur rimanendo ancora molto lontana dal coprire il fabbisogno, è ormai cospicua anche in conseguenza della elevata prolificità dei cinghiali, che raggiungono quasi la metà degli ungulati selvatici allevati ed il 90% della carne prodotta

Attualmente la produzione di carne di cinghiale, calcolata sulla base degli elementi censiti, è di t 2.550 a peso vivo, corrispondenti a t 1.650 a peso morto.

In termini di valore, la produzione delle carni di cinghiale all'azienda sarebbe di circa 20 miliardi di lire, che arrivano a circa 80 miliardi di lire quando la carne viene consumata nei punti di ristorazione o in famiglia.

In realtà, al di là di questa stima di largo orientamento, occorre considerare che non tutta la produzione viene venduta per il consumo, a differenza di quanto abbiamo previsto nella valutazione precedente, essendo parte del prodotto destinato ad aumentare la dimensione della mandria o ad essere ceduto altrove a scopo di riproduzione.

Alla produzione nazionale di carne di cinghiale vanno aggiunte le importazioni, che vengono calcolate, sempre per il 1996, attorno alle 2.000 tonnellate. Si tratta per circa il 20% di prodotto fresco e per l'80% di prodotto congelato. La lontananza delle fonti di approvvigionamento porta a scegliere il prodotto congelato, viceversa nelle importazioni dai paesi europei, ed in particolare nei periodi di caccia, si tratta più frequentemente di prodotto fresco. Non sono quindi animali allevati ma cacciati allo stato libero. Il prezzo all'importazione si aggira sulle 11.000 lire il chilogrammo (p.m.).

Si stima che la carne importata provenga per il 40% dall'Australia (carne congelata), per il 20% dall'Ungheria e dalla Slovenia, per la rimanente quota da altri paesi dell'Europa dell'Est.

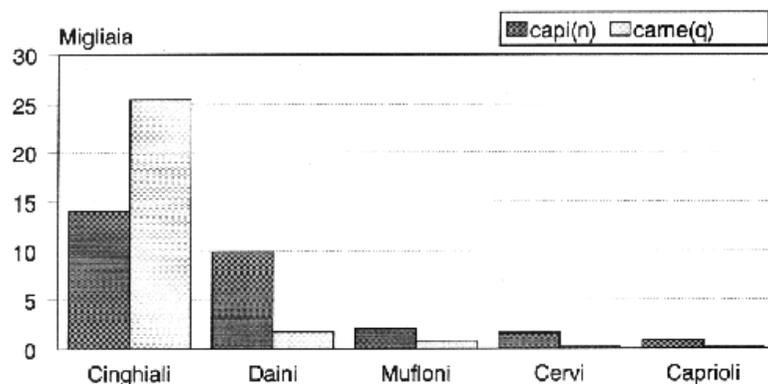
Il prodotto viene importato da poche industrie di trasformazione che si dedicano alle preparazioni e al confezionamento in porzioni adatte per i ristoranti e per la grande distribuzione.

I preparati elaborati per il consumo diretto (precotti) stanno prendendo sempre più piede, per venire incontro alle esigenze delle massaie che dispongono di minor tempo da dedicare alla cucina e per le difficoltà nelle preparazioni domestiche di selvaggina.

Una parte del prodotto importato, dopo la lavorazione, segue la strada dell'esportazione. Si tratta di circa 500 tonnellate di carne che viene venduta ad un prezzo medio all'ingrosso di 12.300 lire il chilogrammo, superiore a quello d'importazione per coprire i costi di trasformazione.

I principali paesi di destinazione sono la Francia, con circa il 40%, la Germania e il Benelux detengono entrambi il 20%, il rimanente 10% è destinato ad altri paesi dell'Europa occidentale. Oggi i mercati esteri sono piuttosto in fase di contrazione per quanto riguarda il consumo della carne di cinghiale.

Graf. 2 - Consistenza dei capi e produzione di carne degli ungulati selvatici allevati



Le grosse industrie di trasformazione sono più propense all'acquisto di carne di importazione che non di prodotto nazionale. Alla carne di cinghiale di produzione nazionale di animali allevati e cacciati sono più interessate le imprese artigianali che riforniscono i mercati locali, che coincidono con quelli di produzione.

Infatti, vi è una sostanziale sovrapposizione tra aree di produzione e aree di consumo. Ed è proprio in queste aree che trova maggiore collocazione anche la carne di importazione. Sono le zone nelle quali affluiscono altri consumatori, nella speranza di trovare il prodotto locale e le preparazioni culinarie più tradizionali.

Pertanto, la carne di importazione, una volta lavorata, riprende la strada della Toscana e dell'Umbria, dove si stima che venga collocato un terzo del prodotto importato. Seguono a pari merito (20%) la Regione Piemonte e l'Emilia-Romagna, quindi la Lombardia con il 10% ed altre regioni collocate nel Centro-Nord.

Le regioni Toscana, Umbria e Piemonte detengono il 53% degli allevamenti di cinghiale e il 57% della carne prodotta, quivi si colloca pure la metà del prodotto di importazione. Non è un fatto casuale, sono le aree nelle quali la crescita dei consumi è legata alla diffusione degli allevamenti e richiama la materia prima per soddisfarli, anche per la concorrenza dei prezzi.

In generale il consumo di carne di cinghiale in Italia si mantiene abbastanza stabile, mentre si va ampliando la richiesta di confezioni pronte all'uso, sia da parte dei ristoranti che delle famiglie.

In conclusione, il consumo di carne di cinghiale in Italia si può quantificare in 11.650 tonnellate (p.m.), che viene calcolato tenendo conto del saldo import-export di 1.500 tonnellate, della produzione degli allevamenti di 1.650 tonnellate e della carne degli animali cacciati (calcolata sulla stima dei capi presenti in Italia fatta da Pergo e attribuendo ai capi liberi una produttività in carne della metà rispetto ai capi allevati) in 8.500 tonnellate. In Italia il consumo medio procapite di carne di cinghiale non raggiunge, quindi, i due ettogrammi all'anno. C'è spazio per una ulteriore espansione dei consumi, dal momento che i gusti dei consumatori sono in evoluzione con una contrazione della carne bovina a favore delle carni alternative, come ci confermano le indagini di mercato.

In sintesi, il consumo di carne di cinghiale in Italia, per provenienza del prodotto, è così ottenuto:

Provenienza	t (p.m.)
Allevamenti	1.650
Importazione	1.500

Caccia	8.500
Totale	11.650

Il giro d'affari ammonta a circa 150 miliardi di lire come valore all'origine, che possiamo moltiplicare per quattro come valore al consumo, pari a 600 miliardi di lire. Non sono cifre di poco conto, considerate le attività indotte che il consumo mette in moto, con richiamo della domanda nelle aree interne e la rivitalizzazione dei territori a rischio di abbandono.

6. Destinazione delle produzioni

L'interesse verso le carni di ungulati selvatici è più presunto che reale, nel senso che i ritmi di crescita dell'offerta vanno a rilento e non sono note neppure le zone dove l'espansione è maggiore, anche se è evidente che queste si trovano all'interno di Umbria e Toscana.

Le carni di importazione fanno una concorrenza spietata alle produzioni interne a causa dei prezzi che sono in grado di offrire.

Le carni di importazione, che - si ripete - provengono da animali non in cattività, hanno un costo di caccia e di lavorazione molto bassi.

Spesso le carni sono già state pagate da chi ha abbattuto l'animale, ma non se lo può portare appresso. Infatti l'interesse del cacciatore, che ha pagato l'intero animale, si limita al trofeo.

Anche per questi motivi le carni sono soggette a lunga permanenza all'aperto e a numerose manipolazioni in ambienti non sempre adatti sotto il profilo igienico-sanitario. Le conseguenze si ritrovano nella qualità delle carni.

Nonostante la concorrenza dei Paesi dell'Est europeo, in particolare dell'Ungheria per i cinghiali, a cui si è aggiunta l'Australia più recentemente, qualcosa si sta muovendo nelle aree più vocate italiane, perchè quivi la domanda comincia a farsi sentire ed i ristoratori hanno capito che le preparazioni alimentari, che utilizzano carni fresche, sono la carta vincente.

Il prezzo della materia prima perde di importanza nella gastronomia di qualità. Rimane comunque elevato lo scarto tra prezzi del prodotto locale e quelli del prodotto importato, che è spesso inferiore del 40-50%

Problemi sorgono quando l'offerta supera la domanda, fenomeno che si verifica spesso quando in una zona circoscritta si apre un nuovo allevamento senza che contemporaneamente aumentino gli sbocchi di mercato.

Infatti, in questi anni, si è verificata una proliferazione degli allevamenti, molti dei quali sono ancora in fase di completamento della mandria.

E' da presumere che, nei prossimi anni, conclusi la produzione e il commercio dei riproduttori, l'aumento della produzione di carne sarà molto forte creando disturbo al mercato attuale.

Il patrimonio censito nel 1991, che è di oltre 14 mila capi in allevamento, va completato con gli animali liberi, che sono pure in crescita.

Pertanto diventa importante sollecitare la domanda per non rischiare di cadere nella "catena degli animali da vita" sul modello dei cincillà. Infatti i buoni prezzi degli animali destinati al ripopolamento, spinge i produttori a privilegiare la vendita del vivo. Solo con la saturazione del mercato dei riproduttori si assesterà quello delle carni.

In verità vi è un altro canale di sbocco che è quello venatorio. La domanda interna di cinghiali cacciabili si è accresciuta recentemente con le difficoltà di recarsi nei Paesi dell'Est, che ha fatto scoprire l'analoga offerta interna.

Le aziende faunistico-venatorie sono in prima fila nell'utilizzare questo lucroso filone. Con le aziende agro-turistico-venatorie, previste dalla Legge n. 157/92, queste opportunità sono destinate ad aumentare.

Alcune limitazioni legislative, quale quella del divieto di caccia nei recinti, hanno rallentato l'espansione delle aziende faunistico-venatorie, ma oggi si stanno moltiplicando rapidamente.

Si ripropone anche per gli ungulati selvatici il tipo di caccia che si è diffusa per i fagiani, le lepri ecc., che vengono allevati in recinto e opportunamente rilasciati nei tempi e nei luoghi richiesti.

I ricavi che se ne traggono sono decisamente superiori rispetto ad altre destinazioni degli animali. Inoltre, sono in fase di organizzazione dei pacchetti di servizi che prevedono l'accompagnamento, la ristorazione, l'alloggio, intrattenimenti di vario genere, che prolungano la permanenza dei cacciatori, a volte accompagnati dalla famiglia.

Gli effetti indotti accrescono così il valore aggiunto dell'allevamento e spostano verso le zone marginali flussi di domanda, che danno un po' di ossigeno alle aree interne.

Maggiore interesse della domanda può dipendere anche dall'accresciuta disponibilità di reddito, dalla ricerca di gusti nuovi, una volta raggiunta la saturazione dei consumi tradizionali, la sanità e la genuinità delle produzioni, che sono tipicamente naturali senza manipolazioni o forzature con estrogeni e anabolizzanti; la stessa composizione delle carni, ricche di proteine e povere di grassi, ne fanno un alimento interessante anche sotto il profilo dietetico.

L'allevamento dei cinghiali, e degli ungulati selvatici in genere, si può far rientrare a pieno titolo nell'agricoltura biologica, in fase di espansione anche nel nostro Paese.

E' illusorio ritenere che queste carni trovino ampia diffusione nel consumo familiare a causa della non facile preparazione. Il consumo pare decisamente orientato sulla ristorazione o nella preparazione di salumi (bresaole, prosciutti, salami ecc.) che sono pronti ed adatti anche al consumo domestico.

In questa direzione sta muovendosi anche la Germania, che è grande importatrice e consumatrice di carni di selvatici. Qualcosa di analogo sta maturando nell'Appennino Centrale, dove la ristorazione si sta qualificando per le preparazioni di selvaggina, sostenuta dai flussi turistici che apprezzano il gusto e la presenza di animali. Per l'arredo al paesaggio si dovrà fare riferimento ad altre specie di ungulati selvatici e meno al cinghiale.

Gli allevatori della zona sono avvantaggiati da queste nicchie di mercato, del richiamo turistico, che consente la vendita ai ristoranti. Le stesse macellerie entrano nella domanda, quando il circuito commerciale si fa più vivace, in vista di rifornire i ristoranti di un'area più allargata. Nel primo caso la macellazione viene fatta sul posto, come per i maiali, nel secondo, provvede il macellaio.

Nell'Appennino Centrale vengono così diffusi e valorizzati questi animali, come si fa anche per le case rurali, che vengono ristrutturate grazie al ritorno in loco di popolazione, anche di stranieri. Quivi gli stessi Enti pubblici, raccolto il segnale, si stanno impegnando ad indirizzare correttamente la fase prettamente produttiva con quella più complessa della rivitalizzazione di aree in via di abbandono o abbandonate da tempo.

7. Alcune conclusioni

Le prospettive di sviluppo degli allevamenti di cinghiale devono tenere presente che, accanto alla produzione di carne, si stanno aprendo altri spazi per la valorizzazione di questi animali.

L'interesse amatoriale suggerisce ai non agricoltori di investire capitali in aree disagiate, che rivitalizzano la domanda riportandovi presenza umana.

Lo sbocco mercantile, legato alla caccia, è quello che riveste maggiore interesse perchè remunera meglio gli animali abbattuti. Sta ritornando la domanda di caccia che si era orientata verso i Paesi dell'Est europeo. Sapendo che in Italia i cacciatori sono oltre un milione, anche se negli ultimi anni si è registrato un notevole calo, le prospettive non mancano, anche se le norme legislative pongono dei limiti. Ridurre le esigenze di gite all'estero significa contenere l'esportazione di valuta.

L'interesse turistico ed agro-turistico sposta la domanda dalle città ai luoghi di produzione delle carni di selvatici. E' la ferma convinzione anche di alcuni studiosi. Rambotti (1991), ben noto studioso di queste tematiche, sostiene che: "Il sistema migliore mi è sembrato portare il consumatore verso il prodotto e non viceversa come avviene normalmente".

E' nell'interesse dell'imprenditore di stimolare la domanda con nuove proposte che vengano incontro alle aspettative dei consumatori, oggi più attenti alle problematiche ambientali e salutistiche.

L'allevamento specializzato di cinghiali per la produzione di carne fresca si è dimostrato poco competitivo con il prodotto d'importazione, che spunta dei prezzi inferiori del 40-50%. Di qui la necessità di valorizzare gli animali e le carni fresche per usi alternativi e d'integrare l'allevamento con altre attività quali: l'agriturismo e l'attività venatoria.

La salvaguardia dell'ambiente, gli aspetti naturalistici, di studio e di didattica hanno ancora molte cose da dire. In definitiva è la domanda di natura, espressa dalle aree urbane che potrà dare prospettive di sviluppo a queste nuove attività, collocate in ambienti suscettibili di richiamo per le bellezze naturali, per la salubrità dell'aria e per la riscoperta della vita in campagna in contrapposizione con gli affannosi ritmi della vita moderna.

Parole chiave: cinghiale, allevamento, mercato

Key words: boar, breeding, market

Mots-clés: sanglier, élevage, marché

RIASSUNTO - Il cinghiale è l'ungulato selvatico più allevato in Italia. E' anche quello che fornisce la maggiore quantità di carne, grazie alla prolificità della specie. Le indagini condotte hanno consentito di quantificare i costi delle strutture per l'allevamento del cinghiale, i prezzi di mercato degli animali vivi e della carne, la produzione, l'import-export e il livello dei consumi. Il cinghiale è la specie che meglio si adatta all'allevamento intensivo e a fornire carne fresca ai punti di ristorazione del territorio, in alternativa alla carne congelata d'importazione. Le prospettive di sviluppo dell'allevamento del cinghiale sono legate alla crescita dei consumi e alla capacità degli allevatori di valorizzare la loro produzione.

SUMMARY - *The economic aspects of boar breeding.*

The boar is the most bred wild ungulate in Italy. The high fertility of the species also makes it the animal which provides the greatest quantity of meat. Investigations undertaken have made it possible to measure the costs relevant to boar breeding structures, the market prices for live animals and for the meat of the animal, together with the production, import-export and consumption figures. The boar is the species which best adapts to intensive breeding and to the supplying of fresh meat to restaurants in the area as an alternative to imported frozen meat. Future boar breeding expansion is linked to increases in consumption and the ability of breeders to increase production.

RÉSUMÉ - *Aspects économiques de l'élevage du sanglier.*

Le sanglier est l'ongulé sauvage le plus élevé en Italie. C'est aussi celui qui fournit la plus grande quantité de viande, grâce à la prolificité de l'espèce. Les études menées ont permis de quantifier les coûts des structures pour l'élevage du sanglier, les prix de marché des animaux vivants et de la viande, la production, l'import-export et le niveau de la consommation. Le sanglier est l'espèce qui s'adapte le mieux à l'élevage intensif et fournit de la viande fraîche aux points de restauration du territoire, à la place de la viande congelée d'importation. Les perspectives de développement de l'élevage du sanglier sont liées à la croissance de la consommation et à la capacité des éleveurs à mettre en valeur leur production.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BIAGIOLI O., CASANOVA P., PONZETTA M.P. (1988). Disponibilità alimentari per gli ungulati selvatici; metodologie di stima e applicazioni pratiche. In Atti del X Convegno "Allevamenti di selvaggina". Bastia Umbra (PG), 7-22.
- 2) DALLA RAGIONE A., RAMBOTTI F. (1986). Allevamenti di selvatici a scopo alimentare in Italia. In Atti VII e VIII Convegno "Allevamenti di selvaggina a scopo alimentare". Bastia Umbra (PG), 103-121.
- 3) GREGORI M. (1995). Agriturismo, turismo rurale e sviluppo rurale. In Atti del XXXI convegno di studi della SIDA. Rivista di Economia Agraria, n. 20, 287-393, INEA-II Mulino.
- 4) LUCIFERO M., GIORGETTI A. (1987). Lo sfruttamento degli ungulati selvatici in ambiente collinare appenninico: possibilità e prospettive. In Atti IX Convegno "Allevamenti di selvaggina". Bastia Umbra (PG), 149-175.
- 5) MENNELLA V. (1983). L'azienda agrituristica venatoria. In Atti IV Convegno "Allevamenti di selvaggina a scopo alimentare". Città di Castello (PG), 175-179.
- 6) PELIZZONI C., SALGHETTI A., VILIANI M. (1994). Ruolo degli ungulati selvatici nelle aziende agrituristiche. In Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Vol. XIV, Parma, 97-120.
- 7) PERCO F. (1988). Ungulati. Carlo Lorenzini Editore, Udine.
- 8) POLIDORI F., TRABALZA MARINUCCI M. (1996). L'allevamento di ruminanti selvatici e domestici a salvaguardia dell'ambiente. In Atti del XIII Convegno Nazionale "Allevamenti di Selvaggina", Nocera Umbra (PG), 37-51.
- 9) RICHETTI F., FERRARA B., INTRIERI F. (1986). Studio comparativo sull'allevamento del cinghiale maremmano e del cinghiale dei Carparzi. In Atti VII e VIII Convegno "Allevamenti di selvaggina a scopo alimentare". Bastia Umbra (PG), 25-35.
- 10) SALGHETTI A. (1991). Elementi strutturali ed economici degli allevamenti di ungulati selvatici in Italia. In Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Parma, XI, 87-173.
- 11) SILLANI S., AGOSTINI P., MAFFEI M., BOVOLENTA S. (1989). Un modello di utilizzazione di aree montane mediante la gestione della fauna selvatica. In Atti XI Convegno "Allevamenti di selvaggina". Bastia Umbra (PG), 3-16.
- 12) TALAMUCCI P., BIAGIOLI O., CARDINALI A., CASANOVA P., CIANI F., DURANTI E., FRATONI F., GIORGETTI A. (1990). Proposta di metodologia per la valutazione delle disponibilità alimentari per ungulati selvatici. In Atti XII Convegno "Allevamenti di selvaggina". Cagliari, 27-44.
- 13) TOZZI G. (1989). La gestione del cinghiale nella Regione Toscana. In Atti XI Convegno "Allevamenti di selvaggina". Bastia Umbra (PG), 143-165.
- 14) Consorzio Nazionale di Iniziativa Agricola (1976). Le terre abbandonate in Italia. Roma.

EFFETTO ANTIOSSIDANTE DELLA VITAMINA E NEL LONGISSIMUS DORSI FRESCO E COTTO DI SUINO

Zanardi E., Novelli E.*, Dorigoni V., Dazzi G., Chizzolini R.

Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma, via del Taglio 8, 43100 Parma, Italy.

** Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Agripolis, 35020 Legnaro, Padova, Italy .*

Ricerca effettuata con il contributo finanziario del Ministero della Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (Cofinanziamento Ric. Ril. Int. Naz. 1997, Progetto Nazionale: Sistemi di allevamento sostenibili e qualità delle produzioni animali).

Si ringraziano i Sigg. E. Campesato e C. Damaschi per la collaborazione prestata.

INTRODUZIONE

Il controllo della quantità di grassi introdotti con la dieta fa ormai parte della cultura alimentare nelle nazioni ricche ove la grande disponibilità di alimenti e la vita sedentaria hanno reso molto facile consumare una quantità eccessiva di calorie. Le ricerche condotte negli ultimi anni hanno aggiunto un ulteriore fattore di rischio dovuto ai fenomeni di ossidazione cui possono andare incontro i grassi, specialmente i polinsaturi, durante la conservazione e la lavorazione.

L'ossidazione dei lipidi genera una ampia gamma di molecole, alcune delle quali importanti per le caratteristiche di qualità dei prodotti alimentari. In particolare, molecole di derivazione ossidativa contribuiscono alla formazione del sapore e dell'aroma caratteristici di alcuni prodotti di salumeria. Alcuni composti, tuttavia, possono essere responsabili pure dell'alterazione delle qualità organolettiche che si manifesta in termini di rancidità. La alterazione dei grassi conseguente alla ossidazione può avere anche delle implicazioni nutrizionali. I fenomeni di ossidazione sarebbero in grado di produrre molecole dotate di elevata tossicità coinvolte in vari processi morbosi tra i quali l'aterosclerosi e i processi d'invecchiamento.

Alcuni prodotti di ossidazione del colesterolo, tra i molti composti derivanti dalla ossidazione dei lipidi, sembra abbiano effetti aterogeni, mutageni, citotossici e carcinogeni (Sevanian e Peterson, 1986; Bö singer et al., 1993; Guardiola et al., 1996). E' stato dimostrato che tali composti possono essere assorbiti dall'uomo con gli alimenti ed entrare in circolo tramite i chilomicroni e alcune lipoproteine (Emanuel et al., 1991). La conoscenza dei fenomeni ossidativi che interessano le carni, al fine di consentirne, se necessario, il controllo, ha assunto, quindi, una importanza notevole che trascende gli aspetti qualitativi e tecnologici per coinvolgere in modo significativo la protezione della salute umana.

MATERIALI E METODI

Sono stati allevati 72 suini femmina, di razza Large White, equamente suddivisi in 3 trattamenti dietetici differenti per contenuto di vitamina E, vale a dire un gruppo di controllo (dieta base), un gruppo in cui la dieta base è stata integrata con 100ppm di tocoferolo acetato e un terzo gruppo in cui la dieta base è stata integrata con 200 ppm di tocoferolo acetato.

Il giorno della macellazione le carcasse sono state sezionate a caldo secondo la metodologia industriale normale. I lombi, dopo un giorno di sosta in cella frigorifera, sono stati disossati e, dopo una settimana, sono stati affettati in braciolo dello spessore di 1,5 cm. Partendo dalla posizione craniale, le braciolo sono state prelevate con ordine e destinate a specifiche analisi chimiche secondo il seguente schema :

Composizione centesimale	2 braciolo
Colesterolo totale	1 braciolo
Vitamina E	4 braciolo
TBARs	2 braciolo
Numero di perossidi	6 braciolo
Aldeidi	2 braciolo
Ossidi del colesterolo	2 braciolo

La vitamina E, le TBARs e il numero di perossidi sono stati determinati sia sulle braciolo crude sia sulle braciolo sottoposte a cottura. Le aldeidi, il colesterolo totale e gli ossidi del colesterolo

sono stati determinati solo sulle bracirole sottoposte a cottura. La composizione centesimale è stata determinata solo sul muscolo fresco.

Le bracirole sono state cotte su piastra riscaldata a 200°C fino al raggiungimento di una temperatura a cuore di 70°C verificata tramite termosonda. La misura dei perossidi, del TBARS e degli ossidi del colesterolo è stata effettuata immediatamente dopo la cottura.

La composizione centesimale (umidità, grasso, proteine e ceneri) è stata determinata secondo le metodiche pubblicate dall'A.O.A.C. (1990).

Le misure del pH sono state effettuate per infissione con elettrodo combinato (Ingold 406M6DXKS7/25) sul muscolo Longissimus Dorsi (ultima vertebra lombare) a 1h e 24h post mortem.

La metodica utilizzata per la determinazione della vitamina E è quella descritta da Buttriss e Diplock (1984).

Il numero di perossidi e le TBARS sono stati determinati come descritto da Novelli et al. (1998).

Il colesterolo totale è stato determinato secondo la procedura di Adams et al. (1986) mentre la procedura di analisi degli ossidi del colesterolo ha richiesto l'estrazione dei lipidi totali (Marmer e Maxwell, 1981), il frazionamento e l'estrazione in fase solida degli ossisteroli (Park e Addis, 1985), la derivatizzazione e la successiva analisi mediante gas-cromatografia e spettrometria di massa. La derivatizzazione è stata effettuata partendo da 1 ml di acetato di etile, contenente gli ossisteroli estratti, che è stato portato a secco in corrente di azoto, addizionato di 50 µl di piridina e 100 µl di bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide (BSTFA). Tale soluzione, agitata su vortex per 30 secondi, è stata posta al buio per 30 minuti dopo di che si è proceduto alla evaporazione in corrente di azoto. Il campione è stato ripreso con 100 µl di acetato di etile.

La determinazione degli ossisteroli è stata effettuata mediante il sistema GC/MS GCQ Finningan Mat, equipaggiato con un iniettore spit-splitless mantenuto alla temperatura di 280°C e una colonna SPB-1 (Supelco 30m x 0,25mm, 0,25µm di spessore del film) rivestita da una fase stazionaria metilsiliconica. Sono state adottate le seguenti condizioni operative: 230°C per 1 minuto, rampa termica di 5°C/minuto fino a 290°C, mantenuti per 12 minuti, e successivo incremento di 8°C/minuto fino a 305°C; elio come gas carrier a 35cm/secondo; iniezione split; frammentazione molecolare mediante impatto elettronico a 70 eV; analisi con ioni positivi; rivelatore settato per temperatura transfer line di 290°C, temperatura sorgente ionica 200°C, intervallo di scansione di 1 secondo/scansione e intervallo di massa di 100-550 daltons.

La determinazione delle aldeidi è stata effettuata seguendo la metodica di Reindl e Stan (1982) basata sulla reazione tra aldeidi e 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNP) per formare i 2,4-dinitrofenilidrazoni che vengono determinati mediante HPLC.

RISULTATI

La composizione centesimale del muscolo Longissimus dorsi fresco (Tab. 1) ha messo in evidenza una sostanziale uniformità tra i gruppi alimentari. L'evoluzione della glicolisi post mortale, espressa dalle misure del pH a 1h e 24h post mortem, presenta caratteristiche di normalità e non ha alcuna relazione con la dieta (Tab. 2). I valori medi del pH 1h e 24h sono compresi, rispettivamente, tra 6,21 e 6,32 e tra 5,58 e 5,63.

TABELLA 1. Composizione centesimale (%) del muscolo Longissimus dorsi fresco. I valori sono espressi come media±dev.stand.

Dieta	Umidità	Proteine	Grasso	Ceneri
1	72,54±1,11	24,19±0,66	2,95±0,97	1,15±0,04
2	72,26±1,48	23,70±0,75	3,61±1,83	1,12±0,05
3	72,47±1,06	23,93±0,86	2,98±1,14	1,15±0,05

TABELLA 2. Valori di pH 1h e 24h post mortem sul muscolo Longissimus dorsi. I valori sono espressi come $media \pm dev. stand.$.

Dieta	1h	24h
1	6,32 \pm 0,16	5,62 \pm 0,09
2	6,27 \pm 0,26	5,58 \pm 0,08
3	6,21 \pm 0,34	5,63 \pm 0,15

La dieta ha avuto conseguenze evidenti sul contenuto muscolare di vitamina E (Tab. 3). Il gruppo di controllo presenta un livello di vitamina significativamente inferiore a quello degli altri gruppi e si nota un graduale aumento dal gruppo supplementato con 100 ppm a quello supplementato con 200 ppm. I risultati del muscolo fresco hanno trovato conferma nei dati ottenuti con i campioni cotti sulla base dei quali è possibile anche ipotizzare un notevole grado di stabilità della vitamina E alle temperature impiegate nella cottura su piastra.

TABELLA 3. Contenuto di vitamina E (mg/kg tessuto tal quale) nel muscolo Longissimus dorsi fresco e dopo cottura. I valori sono espressi come $media \pm dev. stand.$. Valori medi nella stessa colonna con apice diverso differiscono significativamente al test di Scheffè ($p \leq 0.05$).

Dieta	Fresco	Cotto
1	1,44 \pm 0,22 ^c	2,02 \pm 0,38 ^c
2	2,34 \pm 0,68 ^b	3,39 \pm 0,83 ^b
3	2,68 \pm 0,81 ^a	3,83 \pm 0,94 ^a

Se si esprime il contenuto di vitamina E sul tessuto secco (Tab. 4), annullando, quindi, la variabilità dovuta ai diversi tenori di umidità tra i singoli campioni e, soprattutto, tra muscolo fresco e cotto, si nota che la concentrazione di vitamina è sempre maggiore nel muscolo cotto rispetto al fresco. Inoltre, le differenze tra i gruppi sono maggiori nel prodotto cotto e, in particolare, la differenza tra il gruppo 2 e il gruppo 3 diventa significativa. Il risultato è di difficile interpretazione e può essere attribuito alla variabilità della distribuzione della vitamina nel muscolo.

TABELLA 4. Contenuto di vitamina E (mg/kg tessuto secco) sul muscolo Longissimus dorsi fresco e dopo cottura. I valori sono espressi come $media \pm dev. stand.$. Valori medi nella stessa colonna con apice diverso differiscono significativamente al test di Scheffè ($p \leq 0.05$).

Dieta	Fresco	Cotto
1	5,18 \pm 0,69 ^b	5,91 \pm 0,96 ^c
2	8,35 \pm 2,36 ^a	9,60 \pm 2,26 ^b
3	9,74 \pm 2,81 ^a	11,18 \pm 2,25 ^a

Il livello di ossidazione del muscolo fresco appare molto limitato sulla base delle misure relative ai perossidi, TBARS, aldeidi e ossidi del colesterolo. L'analisi del numero di perossidi in molti casi non ha evidenziato la presenza dei prodotti di ossidazione primaria ed anche i valori di TBARS sono risultati al limite inferiore della lettura spettrofotometrica (Tab. 5).

TABELLA 5. Valori di TBARs (mgMDA/kg tessuto) e del numero di perossidi (meqO₂/kg grasso) nel muscolo Longissimus dorsi fresco e sottoposto a cottura. I valori sono espressi come media±dev. stand.

Dieta	L.D. fresco		L.D. dopo cottura	
	TBARs	N.P.	TBARs	N.P.
1	0,111±0,027	0,19±0,58	0,070±0,042	0,16±0,18
2	0,102±0,032	0,27±0,36	0,050±0,023	0,19±0,308
3	0,115±0,058	0,31±0,55	0,042±0,021	0,12±0,22

Per quanto riguarda i perossidi, emerge l'estrema variabilità dei campioni appartenenti allo stesso gruppo dietetico, attribuibile in parte alla non omogeneità intrinseca dei campioni ed in parte alla instabilità del parametro analitico che si va a determinare. La mancanza di differenze significative tra i vari gruppi si ripete nei valori di TBARs. Nei campioni di braciote cotte, tuttavia, appare una tendenza verso una diminuzione dei valori sia di numero di perossidi sia di TBARs in funzione dell'aumento del contenuto di vitamina.

L'analisi delle TBARs evidenzia che i valori assoluti del muscolo sottoposto a cottura sono inferiori a quelli registrati sul muscolo fresco. Tale comportamento può essere spiegato con il fatto che la procedura analitica ha subito alcune modificazioni, rese necessarie dalle problematiche, che di volta in volta si presentavano, legate alla composizione chimica del tessuto. Nel caso del Longissimus dorsi, il distillato del campione sottoposto a cottura si presentava molto più torbido di quello del muscolo fresco e ciò ha indotto ad operare una centrifugazione prima della lettura spettrofotometrica.

I risultati di determinazioni analitiche più fini e sensibili, come quella delle aldeidi mediante HPLC, si allineano a quanto riferito finora (Tab. 6). Nel muscolo sottoposto a cottura su piastra sono state identificate otto aldeidi, cinque sature, due monoinsature e una diinsatura. Queste molecole costituiscono il principale gruppo di composti derivanti dalla degradazione ossidativa degli acidi grassi polinsaturi a 18 (acido linoleico e linolenico) e 20 atomi di carbonio (acido arachidonico) nonché la classe di volatili più numerosa tra quelle identificate nella carne cotta della specie suina (Shahidi et al., 1986).

TABELLA 6. Contenuto di aldeidi (nmol/kg tessuto) nel muscolo Longissimus dorsi sottoposto a cottura. I valori sono espressi come media±dev. stand.

Aldeidi	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Esanale	284,8±76,2	346,3±164,4	265,9±153,7
Eptanale	38,8±29,4	49,6±31,5	48,9±41,3
2-ottenale	21,6±5,9	20,4±6,8	14,7±4,5
Ottanale	44,0±14,8	54,3±26,6	44,1±37,5
2-nonenale	33,2±14,3	39,0±23,9	34,4±23,7
2,4-decadienale	35,1±24,4	51,1±34,2	31,8±18,5
Nonanale	169,5±87,2	206,1±140,8	172,4±161,2
Decanale	32,1±15,2	48,1±27,7	74,5±41,3

Tutte le aldeidi, ad eccezione dell'esanale e del nonanale, sono state osservate in quantità di poco superiori al limite di rilevabilità strumentale. Questo non toglie nulla all'importanza di queste molecole che hanno frequentemente dei valori soglia di percezione olfattiva vicini o al di sotto dei limiti di rilevazione strumentale (Schieberle e Grosch, 1987). L'elaborazione statistica dei risultati non mostra differenze significative. L'analisi dei dati conferma la variabilità biologica dei campioni appartenenti al medesimo trattamento dietetico.

L'effetto antiossidante della vitamina E sembra essere più evidente nei confronti del colesterolo. L'ossidazione di tale composto è stata monitorata attraverso la determinazione quali-quantitativa di cinque dei principali ossidi riscontrabili nelle carni fresche e nei prodotti trasformati (Chizzolini et al., 1995; Zanardi et al., 1995) : il 7 β -idrossicolesterolo, il 5,6 α -epossicolesterolo, il 7-chetocolesterolo (prodotti di ossidazione dell'anello del colesterolo), il 20 α -idrossicolesterolo ed il 25-idrossicolesterolo (prodotti di ossidazione della catena laterale del colesterolo). Gli ultimi due non sono mai stati rilevati nelle braciolate cotte su piastra mentre l'epossido ed il cheto-derivato sono stati regolarmente riscontrati. Saltuariamente è stato osservato il 7 β -idrossicolesterolo (Tab. 7).

TABELLA 7. Contenuto degli ossidi del colesterolo ($\mu\text{g/g}$ tessuto) nel muscolo Longissimus dorsi sottoposto a cottura. I valori sono espressi come $\text{media} \pm \text{dev. stand.}$

Dieta	7 β -idrossi	5,6 α -epossi	20 α -idrossi	7-cheto	25-idrossi
1	n.r.	0,50 \pm 0,12	n.r.	0,30 \pm 0,19	n.r.
2	0,02 \pm 0,01	0,32 \pm 0,10	n.r.	0,20 \pm 0,10	n.r.
3	0,02	0,24 \pm 0,06	n.r.	0,18 \pm 0,16	n.r.

*(1 campione)

I risultati ottenuti concordano con quanto riportato da Monahan et al. (1992) i quali hanno identificato i 7 derivati e l'epossido nella carne suina macinata, cotta e conservata allo stato refrigerato a 4 °C per due giorni. Esistono, invece, notevoli differenze nelle concentrazioni dei singoli composti giacché i sopraccitati autori hanno riportato livelli che raggiungevano i 16 ppm mentre i valori qui osservati (Tab. 7) non hanno mai superato 1 ppm. La ragione di tale discordanza risiede, probabilmente, nel fatto che l'analisi è stata effettuata da Monahan et al. (1992) sulla carne macinata cotta dopo 2 giorni di conservazione mentre in questa sperimentazione la carne non è stata macinata e si è proceduto all'analisi immediatamente dopo la cottura. Come accennato da Paniangvait et al. (1995), il confronto del contenuto di ossisteroli tra i dati della letteratura risulta spesso difficoltoso a causa delle procedure analitiche e delle condizioni sperimentali molto diverse cui il campione sovente viene sottoposto.

Per consentire una percezione più immediata del reale significato dei valori ottenuti e rendere più facile il confronto con altri dati ed altri tipi di carne, il contenuto globale degli ossisteroli è stato espresso in termini percentuali sul colesterolo. Il colesterolo del Longissimus dorsi è compreso tra 71,8 e 74,4 mg/100g circa e la percentuale del colesterolo ossidato varia da 0,06 a 0,11 % (Tab. 8). La percentuale di colesterolo ossidato sembrerebbe essere in relazione inversa al contenuto di vitamina E ma la variabilità di gruppo ha impedito che venissero messe in evidenza differenze significative.

TABELLA 8. Contenuto di colesterolo (mg/100 g tessuto), degli ossidi del colesterolo totali ($\mu\text{g/g}$ tessuto) e percentuale di colesterolo ossidato nel muscolo Longissimus dorsi sottoposto a cottura. I valori sono espressi come $\text{media} \pm \text{dev. stand.}$

Dieta	Colesterolo mg/100 g	Totale ossidi $\mu\text{g/g}$	% colesterolo ossidato
1	71,8 \pm 13,3	0,80	0,11
2	74,3 \pm 13,1	0,54	0,07
3	74,4 \pm 7,3	0,44	0,06

PAROLE CHIAVE: vitamina E, L. Dorsi, suino, ossidazione, lipidi.

KEY WORDS: vitamin E, L. Dorsi, pork, oxidation, lipids.

RIASSUNTO. Sono stati allevati 72 suini suddivisi in 3 trattamenti dietetici differenti per contenuto di vitamina E (un gruppo di controllo, un gruppo con 100ppm e un terzo gruppo con 200

ppm di tocoferolo acetato). Sui lombi sono stati determinati: composizione centesimale, pH, a 1h e 24h post mortem, contenuto di vitamina E, numero di perossidi, TBARS, colesterolo totale, ossidi del colesterolo (COPs) e aldeidi.

I gruppi si sono dimostrati sostanzialmente uniformi per composizione centesimale e per valori di pH a 1h e 24h post mortem. La dieta ha comportato un aumento significativo del contenuto muscolare di vitamina E in funzione della integrazione alimentare.

Il livello di ossidazione appare molto limitato sulla base delle misure relative ai perossidi, TBARS, aldeidi e ossidi del colesterolo. Tutte le aldeidi, ad eccezione dell'esanale e del nonanale, sono state osservate in quantità di poco superiori al limite di rilevabilità strumentale.

L'effetto antiossidante della vitamina E sembra essere più evidente nei confronti del colesterolo. La percentuale del colesterolo ossidato varia da 0,06 a 0,11 % e sembrerebbe essere in relazione inversa al contenuto di vitamina E ma la variabilità tra gruppi ha impedito che venissero messe in evidenza differenze significative.

SUMMARY. An investigation has been conducted on pigs supplemented with vitamin E at 100 and 200ppm. On chops obtained from the loins of the experimental animals the following analyses have been performed: pH at 1h and 24h post mortem, proximate composition, vitamin E content, peroxide number, TBARS values, aldehydes, total cholesterol and cholesterol oxides. The groups were homogeneous for proximate composition and pH values whilst the diet induced significant changes in muscular vitamin E content.

Oxidation was rather limited from the results of peroxide number, TBARS, aldehydes and cholesterol oxides. All the aldehydes which have been determined, with the exception of hexanal and nonanal, were barely above the detection limit.

The antioxidant effect of vitamin E was more evident with cholesterol oxidation. The percentage of oxidised cholesterol varied from 0.11% to 0.06% and there was a tendency for oxidation decreasing with increasing vitamin E content but the low oxidation level and the variation among groups and samples did not allow significant differences to be observed.

BIBLIOGRAFIA

- Adams M.L., Sullivan D.M., Smith R.L., Richter E.F.(1986) Evaluation of direct saponification method for determination of cholesterol in meats. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry*, 69, n. 5, 844-846.
- A.O.A.C.(1990) Meat and meat products, in *Official Methods of Analysis*, 15th Ed., Association of Official Analytical Chemists, vol.2, Washington DC, U.S.A, 931-948.
- Bosinger S., Luf W., Brandl E. (1993) Oxysterols : their occurrence and biological effects. *International Dairy Journal*, 3, 1-33.
- Buttriss J.L., Diplock A.T.(1984) High performances liquid chromatographic methods for vitamin E in tissue. *Methods of Enzymology*, 105, 131-138.
- Chizzolini R., Novelli E., Zanardi E. (1995) Fenomeni ossidativi nei prodotti di salumeria. Atti Workshop "Antiossidanti naturali negli alimenti. Aspetti tecnologici e qualitativi", Udine 5-6 Dicembre 1995, 207-214.
- Emanuel H.A., Hassel C.A., Addis P.B., Beergmann S.D., Zavoral J.H.(1991) Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *Journal of Food Science*, 56, 843-847.
- Guardiola F., Codony R., Addis P.B., Rafecas M., Boatella J.(1996) Biological effects of oxysterols:current status. *Food Chemistry and Toxicology*, 34, n. 2, 193-211.
- Marmer W.N., Maxwell R.J.(1981) Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. *Lipids*, 16, n. 5, 365-371.
- Monahan F.J., Gray J.I., Booren A.M., Miller E.R., Buckley D.J., Morrissey P.A., Gomma E.A.(1992) Influence of dietary treatment on lipid and cholesterol oxidation in pork. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 1310-1315.
- Novelli E., Zanardi E., Ghirelli G.P., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R. (1998) Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella. *Meat Science*, 48, 29-40.
- Paniangvait P., King A.J., Jones A.D., German B.G.(1995) Cholesterol oxides in foods of animal origin. *Journal of Food Science*, 60, n. 6, 1159-1174.
- Park S.W., Addis P.B.(1985) HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods. *Journal of Food Science*, 50, 1437-1441.
- Reindl B., Stan H.J.(1982) Determination of volatile aldehydes in meat as 2,4-dinitrophenylhydrazones using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 30, n. 5, 849-854.
- Schieberle P., Grosch W.(1987) Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extra dilution analysis. *Zeitschrift fuer Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 185, 111-113.
- Sevanian A., Peterson A.R.(1986) The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chemistry and Toxicology*, 24, n. 10/11, 1103-1110.
- Shahidi F., Rubin L.J., D'Souza L.A.(1986) Meat flavour volatiles : a review of the composition, technique of analysis and sensory evaluation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24, 141-243.
- Zanardi E., Novelli E., Chizzolini R., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Ghirelli G.(1995) Conservazione prolungata della materia prima e processi ossidativi nel salame e nella mortadella. Atti Congresso "Grassi e qualita' delle carni : aspetti nutrizionali, organolettici e tecnologici", Parma 24 giugno 1995, 125-131.

LOW-FAT SALAME MILANO: EXPERIMENTAL FORMULATIONS WITH SOME FAT SUBSTITUTES

Zanardi E., Novelli E.*, Dorigoni V., Ghiretti G.P., Barbuti S., Chizzolini R.

Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma, via del Taglio 8, 43100 Parma, Italy.

** Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Agripolis, 35020 Legnaro, Padova, Italy .*

The research has been financed by the European Commission (Contract AIR-CT93-1691).
Thanks are due to Mrs E. Campesato and Mr C.Damaschi for their technical support.

INTRODUCTION

International medical institutions have been recommending for the last 40 years that dietary fat intake should be controlled both as quantity of calories and as type of fatty acids introduced. Nutritional guidelines suggest that dietary fat should provide between 15 and 30% of total calories and that saturated fats should be limited between 0 and 10% of caloric intake (WHO, 1990). Limitation in fat intake is thought to be important for preventing obesity which is considered to predispose to various chronic diseases of the circulatory system. Relationships appear to exist, also, between a high-fat intake and an increased risk of some cancers, especially cancers of the colon, breast and prostate (Flatt, 1993; Reddy, 1995).

Meat and meat products have been accused of being unhealthy for their high content of fat and of saturated fatty acids. There is a growing demand, therefore, for low-fat meat products. However, the development of low-fat products requires modifications to the products which can affect important quality attributes and, therefore, consumer acceptability of such products (Colmenero, 1995).

Raw fermented meat products, such as those known as salame, have fat contents variable from 25 to 35% and fat reduction requires specific adjustments not only of the ingredients but also of processing technology. Moreover, bacterial growth has to be verified since fermentation, which means not only microbial growth but also selection of some specific strains to the expense of others, plays an important role for the appearance of typical organoleptic quality attributes and has, also, strong links with the safety of the final product.

Fat can be reduced by using leaner raw materials and/or by substituting it with substances with a low caloric content. Possible fat substitutes can be proteins (from vegetable and animal sources) and carbohydrates of various nature (starches, dextrans, alginates) used alone and in various combinations.

The research which has been carried out was centred on a typical Italian raw fermented meat product, such as salame Milano, which can be considered representative of most raw fermented meat products. The fat content of salame Milano is normally around 30% and the research aimed at evaluating the possibility of lowering the fat content by using both lean raw materials and fat substitutes maintaining at the same time acceptable quality attributes. The study included a complete microbiological control of the most important bacteria which could be found in traditional salame and the measurement of peroxide number, TBARs and cholesterol oxidation products, due to the importance presently attributed to lipid oxidation for quality and human health reasons.

MATERIALS AND METHODS

Salame Milano was produced as described by Novelli et al. (1998). The trials went through a series of different formulations to end up with three basic levels of fat content: a so called standard level varying from 25 to 30% fat, an intermedium one with about 15% fat and a low one with a fat content around 6-7%. The aim was obtained by gradually reducing the amount of fat cuts: the traditional formulation, based mainly on shoulders as lean cut, was modified increasing the amount of ham trimmings. The latter, compared with shoulders, are characterised by very lean muscles as for intramuscular fat, while most of intermuscular fat can be eliminated.

Other trials were carried out to set up formulations in which fat was substituted by dextrans (Cerestar, 01915 D.E. 18±2), sodium alginate (Sanofi, GFC 640), starch (Tipiak, Tapiocaline CR 521), and soya proteins (Protein Technology International 545).

Processing technology was modified to slow down dehydration during the first processing phases, i.e. fermentation and drying. Starter cultures (*Pediococcus* and *Micrococcus*, employed at the dose of 5 x 10⁶ cfu/g of mince) were used as a warranty against unwelcome fermentations. In all cases the formulation of additives remained constant.

Salami were subjected to the following chemical analyses: proximate composition and NaCl content (A.O.A.C., 1990), non protein nitrogen (NPN) (Bellatti et al., 1983), pH by homogenization in distilled water in a ratio 1/10 sample/water. Lipid stability was evaluated by measuring peroxide value, TBARs and cholesterol oxides (Novelli et al. 1998).

Microbiological controls were also carried out on fresh minces and matured salami of all the formulations tested and official methods were employed for the determination and estimation of total aerobic count, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Micrococcus*, *Staphylococcus*, Lactic acid bacteria, *Enterococcus*, Total coliforms, Fecal coliforms, *E. coli*, *Bacillus* spp., Sulphite reducing clostridia, Yeasts, Moulds, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Yersinia*.

A check has also been performed for the presence of substances inhibiting the growth of bacteria.

Matured salami were subjected to a complete sensory evaluation by a trained panel of 10 members according to a form specifically set up (Table 1)

TABLE 1. Sensory evaluation form of salame Milano.

Firmness (by palpation)	(1= very soft; 5=very hard)
Colour intensity	(1= very light; 5= very dark)
homogeneity	(1= not uniform; 5= very uniform)
Incrustation	(1= not encrusted; 5= very encrusted)
Saltiness	(1= not salty; 5= very salty)
Acidity	(1= not acid; 5= very acid)
Bitterness	(1= not bitter; 5= very bitter)
Greasiness	(1= not greasy; 5= very greasy)
Pungency	(1= not pungent; 5= very pungent)
Aged Taste	(1= not aged; 5= very aged)

RESULTS AND DISCUSSION

The most successful formulations, on the basis of sensory quality attributes, are presented in Table 2. Chemical composition data (Table 3) show the reduction in fat content and derived changes in protein, moisture and salt percentages. Using ham trimmings at increasing levels and thoroughly cleaned from visible fat, and leaving out the belly, allowed the production of salami with a fat content as low as 6.41 in formulation 3. Quality attributes, though, were not completely satisfactory as firmness came out to be excessive and a tendency was observed towards higher encrustation scores (Table 7).

TABLE 2. Formulations of low fat salame Milano

INGREDIENTS	FORMULATIONS								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
%									
Shoulder	45	25					20		
Ham trimmings	25	65	100	90	82	96.5	75	96	96
Belly	30	10			10				
Skimmed milk				2	2	2	4	4	
Dextrins				8	1	1	1		
Starch					1				
Na Alginate						0.5			
Soya proteins									4
Water					4				

TABLE 3. Chemical parameters of low fat salame Milano (NPN: Non Protein Nitrogen % of total nitrogen)

FORMULATIONS	MOISTURE	PROTEIN	FAT	ASH	NaCl	NPN	pH
	%	%	%	%	%	%	
1	40.79	25.40	27.68	5.28	3.98	13.35	5.52
2	48.38	29.93	14.75	6.57	5.05	12.79	5.78
3	55.79	33.58	6.41	6.77	5.49	10.21	5.50
4	42.40	34.81	13.18	6.45	4.91	4.52	5.58
5	42.72	31.65	19.90	5.45	3.97	10.54	5.56
6	43.55	33.99	16.46	6.11	4.86	10.61	5.60
7	53.04	32.14	9.10	6.10	5.15	13.10	5.41
8	53.24	32.75	8.37	5.85	4.91	12.52	5.74
9	54.53	32.01	8.09	5.56	4.62	11.96	5.98

TABLE 7. Panel test scores of the various formulations of salame Milano (Mean±S.D.).

CHARACTER	FORMULATION								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Firmness	2.81±0.51	3.67±0.66	4.62±0.50	2.11±0.59	2.50±0.65	3.28±0.68	2.70±0.56	2.17±0.78	2.61±0.72
Colour-intens.	3.19±0.51	3.24±0.83	3.14±0.73	2.88±0.52	3.04±0.77	3.76±0.60	3.78±0.42	3.96±0.71	3.48±0.59
Colour-homog.	3.57±0.81	3.52±0.87	2.95±1.02	3.00±0.89	2.85±0.83	3.28±0.94	3.35±0.98	3.52±0.95	3.22±1.00
Incrustation	2.19±0.81	2.76±0.44	3.05±0.67	2.42±0.76	2.15±0.61	1.56±0.51	2.74±0.62	2.57±0.79	2.74±0.75
Saltiness	2.14±0.85	3.14±1.35	2.90±1.22	1.85±1.56	1.85±0.92	2.15±1.22	2.35±1.11	2.35±0.88	2.43±1.08
Acidity	2.00±1.00	2.43±0.75	2.29±0.90	1.85±0.92	1.88±0.99	1.88±1.07	2.39±0.89	2.61±0.99	2.48±1.04
Bitterness	1.71±0.78	2.29±1.38	2.05±1.12	1.65±0.85	1.58±0.81	1.73±1.04	1.91±1.08	1.78±0.90	1.78±0.85
Greasiness	3.29±1.10	1.38±0.50	1.19±0.40	1.58±0.76	1.31±0.62	1.38±0.57	1.13±0.34	1.22±0.52	1.22±0.52
Pungency	1.71±0.90	2.48±0.92	2.10±0.89	1.60±0.80	1.81±1.10	1.92±0.49	2.52±0.90	2.35±0.98	2.52±0.73
Aged taste	2.05±0.80	2.09±0.83	2.10±1.04	2.12±0.99	2.96±0.60	2.81±0.69	2.61±0.66	2.61±0.78	2.52±0.73

The use of dextrins at high level (8%) and skimmed milk (2%) (formulation 4) gave useful indications for the control of water loss (firmness and encrustation) but responsible of a slight sweet taste. Other formulations were therefore tried in which dextrins were reduced down to 1% and mixed with other ingredients (starch, sodium alginate, skimmed milk). Starch, tried in various formulations, had to be kept at low levels for sensory reasons (see below). The association of starch (pregelatinised with hot water in the ratio of 1:4) with dextrins, and with 10% belly (formulation 5), gave acceptable results but with a fat content of nearly 20%. Slightly more successful appeared to be the association of dextrins with Na alginate (formulation 6) which, by the way, had the advantage of not requiring the use of belly and, therefore, made possible to reach a fat content of 16.4%.

Fat contents lower than 10% were obtained with formulations 7, 8 and 9 using very lean ham trimmings. The first one included dextrins with a high dose of skimmed milk (4%) and 20% shoulders; the second and the third ones were based simply on 96% ham trimmings plus 4% skimmed milk or 4% soya proteins.

Microbiological analyses did not show any differences between the various formulations neither in the minces nor in the matured products (Table 4) (only the data of matured products are shown). The use of starter cultures has certainly helped in obtaining such a result. The results are in line with

similar analyses carried out by Ghiretti et al. (1997) and are characteristic of salame Milano microflora. Total aerobic count was around 10⁷ and 10⁸, Enterobacteria were nearly absent, the main family was represented by Lactic acid bacteria while Micrococcus+Staphylococcus and Enterococcus varied from minimum values of 10⁴ and maximum values of 10⁶.

TABLE 4. Microbiological analyses of the various formulations of matured salame Milano. The data are expressed as mean probable number(MPN)/g.

MICROORGANISMS	FORMULATIONS								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Total aerobic count	4.70 x 10 ⁷	3.70 x 10 ⁸	5.60 x 10 ⁷	4.50 x 10 ⁸	1.35 x 10 ⁸	2.07 x 10 ⁷	3.10 x 10 ⁷	5.80 x 10 ⁷	4.15 x 10 ⁸
Enterobacteriaceae	<3	<3	<1	<3	<3	<3	<1	<3	<3
Pseudomonas spp	absent	1.80 x 10 ²	absent	1.20 x 10 ²	1.00 x 10	absent	absent	absent	1.30 x 10 ²
Micrococcus+Staphyl	2.40 x 10 ⁶	2.80 x 10 ⁵	6.40 x 10 ⁶	1.30 x 10 ⁶	1.20 x 10 ⁶	9.00 x 10 ⁵	4.50 x 10 ⁶	3.10 x 10 ⁶	7.80 x 10 ⁵
Lactic acid bacteria	3.20 x 10 ⁷	2.10 x 10 ⁸	3.50 x 10 ⁷	1.70 x 10 ⁸	1.60 x 10 ⁸	1.50 x 10 ⁸	2.40 x 10 ⁷	2.80 x 10 ⁷	3.10 x 10 ⁸
Enterococcus	2.80 x 10 ⁴	4.20 x 10 ⁵	7.40 x 10 ⁴	9.30 x 10 ⁶	1.70 x 10 ⁴	5.40 x 10 ⁵	6.70 x 10 ⁴	3.60 x 10 ⁴	4.70 x 10 ⁵
Total coliforms	absent								
Fecal coliforms	absent								
E. coli	absent								
Bacillus spp (spores)	3.20 x 10 ²	6.30 x 10 ³	1.50 x 10 ²	4.80 x 10 ³	2.90 x 10 ²	2.20 x 10 ²	1.20 x 10 ²	2.50 x 10 ²	1.30 x 10 ³
Sulphite reduc. bact.	<1	1	<1	<1	1	<1	<1	<1	1
Yeasts	<300	2.70 x 10 ³	<300	7.20 x 10 ³	3.00 x 10	7.50 x 10 ²	<300	<300	1.20 x 10 ³
Moulds	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
Salmonella	absent								
Listeria	L. innocua	L. innocua	L. innocua	absent	absent	absent	absent	absent	absent
S. aureus	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
B. cereus	absent	<30	<30	<30	<30	absent	<30	absent	<30

Lipid oxidation studies did not show significant changes in the oxidative stability of the low fat formulations compared with the normal ones (Ghiretti et al., 1997, Novelli et al., 1998). Peroxide values (Table 5) appeared rather variable but most of them were lower than 5 meq O₂/kg fat, two formulations had values around 7 meq O₂/kg fat and only one formulation (n° 8) had a high value, i.e. 13.27, the highest observed. TBARS values have been found to be always very low since no formulation gave values higher than 0.3 meq O₂/kg fat (Table 5). Cholesterol oxidation was always very limited (Table 6). The oxide 7keto-cholesterol was found in all samples, 25OH-cholesterol was never observed, 20α OH-cholesterol only once, 5,6α -epoxide and 7β OH-cholesterol in about half the samples. Total cholesterol oxidation was always lower than 0.1%.

TABLE 5. Peroxide (P.V.) (meq O₂/kg fat) and TBARS (meq O₂/kg fat fresh tissue) values of the various formulations of salame Milano (mean values of two samples).

FORMULATION	P.V.	TBARS
1	2.35	0.23
2	3.17	0.18
3	2.67	0.15
4	4.87	0.11
5	7.49	0.31
6	5.75	0.18
7	7.28	0.23
8	13.27	0.25
9	4.25	0.27

Sensory evaluation was the most important parameter for the assessment of the acceptability of low fat formulations. Panel test scores are presented in Table 6.

TABLE 6. Cholesterol (mg/100g of sample) and cholesterol oxides content ($\mu\text{g/g}$) of the various formulations of salame Milano (mean values of two samples) (COPS= Cholesterol Oxides) (N.D.= lower than the detection limit).

FORMULATION	Cholesterol	7 β -OH-	5,6 α -epoxy-	20 α -OH-	7-keto-	25-OH-	Total COPS	Cholesterol oxidation %
1	93.58	0.12	0.21	N.D.	0.46	N.D.	0.79	0.08
2	84.07	N.D.	0.12	N.D.	0.34	N.D.	0.68	0.05
3	78.24	0.36	N.D.	N.D.	0.29	N.D.	1.62	0.08
4	99.57	0.20	N.D.	0.28	0.26	N.D.	0.74	0.07
5	83.37	N.D.	N.D.	N.D.	0.21	N.D.	0.21	0.03
6	75.19	N.D.	N.D.	N.D.	0.09	N.D.	0.09	0.01
7	86.41	N.D.	N.D.	N.D.	0.61	N.D.	0.61	0.07
8	90.71	0.10	0.09	N.D.	0.34	N.D.	0.53	0.06
9	86.05	0.11	0.18	N.D.	0.36	N.D.	0.65	0.07

Salame Milano with about 28% fat content scored similar values to the ones obtained in a previous experiment dealing with formulations based on different antioxidant substances (Ghiretti et al., 1997). Decreasing the fat content, to 14.75 and further to 6.41%, had negative effects on quality attributes such as firmness, which became too high in spite of reduced maturing times, and encrustation, which became more marked. The latter one is due to a higher speed of dehydration of the outer layers compared with the inner ones. The consequence is the hardening of an external ring of about 0.5-1cm which slows down the process of water loss of the inner part. The phenomenon has negative repercussions on colour which is obviously darker on the external ring and, at the same time, remains paler in the centre of the salame.

The use of dextrins as fat replacers has been useful to slow down water loss thus maintaining the right level of firmness and reducing the problem of encrusting. Dextrins at high level (8% in formulation 4) kept firmness at a low level but were responsible of a slight sweet taste. In formulations 5, 6 and 7 dextrins were associated, respectively with starch, Na alginate and a high dose of skimmed milk (4%) with positive results.

Starch, tried in various formulations, had to be kept at low levels (1% in formulation 5) since, during maturation, showed the tendency to lose water at a higher rate than muscle proteins with the result of a higher firmness and a sort of "cardboard" taste. The association with 1% dextrins and 10% belly, reported in formulation 5, came out to be the most satisfactory although with a high fat content.

Slightly better appeared to be the association of dextrins with 0.5% Na alginate (formulation 6) which also had the advantage of not requiring the use of belly and, therefore, made possible to reach a fat content of 16.4%. Encrustation was at the lowest value observed while firmness and colour parameters were placed at acceptable levels.

In formulation 7 dextrins were associated with skimmed milk and matured salame was rated approximately between formulation 2 and 6. Formulation 8, based only on lean ham trimmings and skimmed milk was acceptable for most sensory parameters but had a very intense red colour. Both formulations showed the tendency towards higher encrustation levels. Formulation 9 (4% soya proteins) came out to be similar to formulation 7 for many parameters, and in particular for firmness and encrustation values. Formulations 7, 8 and 9 had the lowest greasiness scores together with formulation 3 which was unacceptable for firmness and encrustation.

It is interesting to note, though, that all formulations with a fat content lower than 20% had greasiness scores between 1.13 (formulation 7) and 1.58 (formulation 4) with no significant differences among the low fat formulations. Colour, instead, appeared to become more intense with decreasing fat content, as could be expected. It is also interesting that formulations from 5 to 9 had scores for aged taste higher than 2.5 and higher than the other 4 formulations.

PAROLE CHIAVE: salame Milano, grasso, riduzione, tecnologia

KEY WORDS: salame Milano, low-fat, fat substitutes, technology.

SUMMARY. An investigation has been carried out to evaluate the possibility to produce salame Milano with a low fat content preserving satisfactory quality attributes. The trials have shown that acceptable low fat formulations can be produced. The simple reduction of fat content, without the use of substitutes, has been possible down to about 15% total fat content; a further reduction below 10% gave problems mainly with encrustation, firmness and colour. Some fat substitutes, namely dextrins, sodium alginate, milk and soya proteins, in various combinations, have been found useful and acceptable products have been obtained with a fat content between 8 and 9%.

RIASSUNTO. La ricerca di cui si presentano i risultati ha avuto come scopo di valutare la possibilità di produrre salami Milano a ridotto contenuto di grasso con attributi qualitativi accettabili. Lo studio ha dimostrato che la riduzione del contenuto di grasso, senza l'impiego di composti di sostituzione, è possibile fino a circa il 15% mentre ulteriori riduzioni rendono più difficile la gestione tecnologica della stagionatura cui segue comparsa di problemi di incrostazione, consistenza e colore. L'impiego di alcuni sostituti del grasso, nel caso specifico le destrine, il sodio alginato, le proteine del latte e della soia, combinati in vario grado, ha consentito di ottenere prodotti stagionati con contenuto di grasso anche dell'8-9% e con caratteristiche organolettiche accettabili.

REFERENCES

- A.O.A.C. (1990) Official Methods of Analysis, 15th Ed., Association of Official Analytical Chemists, vol.2, Washington DC, U.S.A.
- Bellati M., Dazzi G., Chizzolini R., Palma F., Parolati G. (1983) Modificazioni fisiche e chimiche delle proteine durante la maturazione del prosciutto di Parma. I-Trasformazioni biochimiche e funzionali. Ind. Cons., 58, 143-146.
- Colmenero Jimenez F. (1995) Low fat meat products - New Technologies. Proceedings of the workshop "Lipids and quality of meat products: a comprehensive analysis", Parma 25 June 1995, R. Chizzolini ed., pp 45-57.
- Flatt J.P. (1993) The impact of dietary fat and carbohydrates on body weight maintenance, in Low-Calorie Foods Handbook (ed. A.M. Altschul), Marcel Dekker, New York, pp. 441-477.
- Ghiretti G.P., Zanardi E., Novelli E., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R. (1997) Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadella production. Meat Science, 47, 167-176.
- Novelli E., Zanardi E., Ghiretti G.P., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R. (1998) Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella. Meat Science, 48, 29-40.
- Reddy B. S. (1995) Nutritional factors and colon cancer. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35, 175-190.
- WHO (World Health Organization) Study Group (1990). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Ser. 797.

L'ARSENICO NEGLI ALIMENTI

Campanini. G., Delbono G., Ghidini S.

Premessa

L'arsenico è un elemento con caratteristiche chimiche e fisiche comprese tra quelle dei metalli e dei non metalli. L'elemento ha avuto una lunga storia nella vita dell'uomo ed è tuttora di considerevole interesse, sia per i tossicologi che per i nutrizionisti per la nota tossicità di alcuni suoi composti. In molti paesi esistono limiti di tolleranza di As negli alimenti e nelle acque potabili; la FAO/OMS stabilisce una dose massima consentita.

I composti solfurei dell'arsenico venivano utilizzati dagli Egizi come pigmenti per la decorazione. Più tardi gli alchimisti pensavano che la lega bianca formata dall'elemento insieme al rame fosse argento e speravano di giungere in seguito per questa via all'oro. Per alcune popolazioni orientali l'assunzione controllata di arsenicali inorganici a dosi crescenti era pratica abbastanza comune perché l'arsenico era ritenuto un potente tonico generale ed una sostanza con proprietà cosmetiche. L'elemento è da sempre tradizionalmente associato ad avvelenamenti criminosi o accidentali: l'assenza di odore e sapore ne ha fatto un veleno da delitto perfetto. Napoleone Bonaparte, secondo alcune recenti ricerche storiche, sarebbe stato avvelenato durante l'esilio con piccole dosi di arsenico giornaliero disciolte nel cibo.

E' stato anche ipotizzato che questo elemento benefico sia essenziale per l'uomo in quanto a piccole dosi migliora l'azione di certi neurotrasmettitori del SNC.

Negli ultimi decenni l'arsenico ha assunto importanza come contaminante ambientale, considerati i suoi svariati impieghi produttivi. Sebbene questo elemento sia quasi universalmente distribuito e che l'assunzione giornaliera, anche in assenza di inquinamento, possa arrivare a 0,5 mg la sua presenza negli alimenti o nelle bevande suscita comunque timore.

L'arsenico rappresenta un raro esempio di sostanza tossica la cui presenza nell'atmosfera, nei suoli e nell'acqua va diminuendo, anche se attualmente notevoli quantità dell'elemento si trovano nell'ambiente, sia per i naturali processi di erosione che per le attività antropiche.

Proprietà chimiche, fisiche e biologiche dell'arsenico

L'arsenico appartiene al V gruppo della tavola periodica degli elementi. Il numero atomico è 33 e la densità di 5,72 g/cm³; sublima a 613 °C e presenta un punto di fusione di 814 °C. La sua forma cristallina è di colore grigio metallico lucente. Queste proprietà sono alla base del tradizionale test di Marsh per l'arsenico ¹.

All'aria l'arsenico metallico si ossida lentamente ricoprendosi di uno strato di colore bruno, ma a temperatura abbastanza elevata può venire incendiato e brucia spandendo fumi bianchi dal caratteristico odore agliaceo.

Gli stati di ossidazione sono: -3, 0, +3 e +5.

I più comuni composti inorganici sono l'ossido di arsenico trivalente (As₂O₃, arsenico bianco) e l'ossido di arsenico pentavalente (As₂O₅). In acqua gli ossidi danno gli acidi corrispondenti, acido arsenioso (H₃AsO₃) e acido arsenico (H₃AsO₄). E' molto facile passare dall'acido arsenioso a quello arsenico perché lo stato di ossidazione +5 è quello termodinamicamente più stabile.

Dall'ossido di arsenico trivalente si ottengono gli arseniti corrispondenti, come l'arsenito di piombo, l'arsenito di rame e l'idruro arsenioso o arsina (AsH₃). L'arsina, che si forma in presenza di agenti riducenti, è molto volatile e si decompone a 250 °C; queste proprietà sono sfruttate per rivelare la presenza di arsenico in Spettrofotometria di Assorbimento Atomico (AAS), previa riduzione e produzione di idruri.

Con gli alogeni l'arsenico forma gli alogenuri, simili agli alogenuri del fosforo e dello zolfo ed assai diversi dagli alogenuri metallici: sono infatti liquidi o solidi a basso punto di fusione, facilmente volatili e, a contatto con l'acqua, producono gli idracidi corrispondenti.

A caldo l'arsenico si combina con molti metalli formando composti binari, gli arseniuri.

L'elemento forma anche composti organici di grande interesse. A partire dall'arsina si formano RAsH₂, RAsH e R₃As. Per riduzione e metilazione successiva dell'acido arsenico si può

ottenere l'acido monometilarsinico $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ (MMAA), l'acido dimetilarsinico $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ (DMAA) ed infine la trimetilarsina $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ (TMA).

Le specie fitoplanctoniche possono trasformare As(V) in MMAA o in DMAA e liberare questi composti nell'acqua; questo spiega la loro presenza in soluzione, soprattutto nella zona eufotica. Quello descritto è un meccanismo di detossificazione in quanto As(V) presenta una certa tossicità per il fitoplancton, mentre i composti organici hanno tossicità minore.

E' stato dimostrato che i batteri metanogeni possono sintetizzare la dimetilarsina ma, nei sedimenti marini anossici, l'assenza di specie metilate lascia pensare che la biometilazione da parte di questi batteri non sia efficace. Questo comportamento rappresenta una importante differenza tra As e Hg ².

Tra le varie forme chimiche presenti nelle acque vi è l'arsenocolina $((\text{CH}_3)_3\text{As}+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})$, ritrovata nei gamberetti e nelle dafnie. L'arsenobetaina $((\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{CO}_2\text{H})$ è stata ritrovata dapprima nei crostacei e successivamente in molti animali marini, dove rappresenta il composto organoarsenicale più abbondante. Più recentemente nei molluschi bivalvi è stato isolato lo ione tetrametilarsonio, che è il principale composto arsenicale dei tessuti branchiali ³. Nell'alga bruna *Eklonia radiata* sono stati identificati degli arsenoribosidi. L'ossido di trimetilarsina, la trimetilarsina e alcuni arsenozuccheri sono stati identificati come componenti minori della frazione di arsenico totale in un numero limitato di organismi animali marini ³.

Queste osservazioni hanno portato all'ipotesi che i processi biochimici che conducono a tali composti, implicano la presenza di arsenoetanolamina e arsenocolina come prodotti di transizione essenziali mentre le caratteristiche enzimatiche possono spiegare la predominanza degli arsenozuccheri nelle macroalghe e dell'arsenobetaina negli organismi marini di livello trofico superiore ⁴.

La tossicità dell'arsenico e dei suoi composti è in relazione alle forme chimiche dell'elemento: i composti inorganici sono i più tossici, seguiti da quelli organici ed infine dal gas arsina ⁵.

Diffusione dell'arsenico nell'ambiente

L'arsenico è abbondantemente presente nella crosta terrestre e nei suoli è variamente distribuito (concentrazione media 1,8 mg/kg); è rilevabile in molte acque ed in quasi tutti i tessuti animali e vegetali. Anche se la sua diffusione sta diminuendo, una notevole quantità di arsenico (40000 t/anno), in varie forme chimiche ed in vari stati di ossidazione, può trovarsi nell'ambiente sia per effetto dei processi di erosione che per le attività produttive umane ⁶.

La concentrazione di As nell'aria varia a seconda che si tratti di aree incontaminate o di zone industrializzate: va da pochi ng/m³ a qualche decina di ug/m³ ⁶.

Nel terreno i livelli dell'elemento, in assenza di contaminazioni agricole e industriali, vanno normalmente da 1 a 40 mg/kg; l'impiego di fanghi di depurazione può incrementarne considerevolmente i livelli. La contaminazione del suolo può anche derivare da certi detergenti in cui è presente l'elemento o dall'uso di concimi fosfatici che contengono quantità apprezzabili di As.

Le acque marine contengono circa 0,3 µg/l di As.

Nel terreno e nelle acque i composti dell'arsenico vanno incontro a processi di ossidazione, riduzione, metilazione e demetilazione. Questi processi nel terreno dipendono dalle specie microbiche presenti, dal potenziale di ossidoriduzione e dalla presenza di ioni che competono per i siti di legame. Si formano così composti alchilici volatili ed in questo modo si ha una certa mobilitazione dell'arsenico che viene trasferito nell'aria.

L'assunzione dell'elemento da parte dei vegetali terrestri dipende non soltanto dalle concentrazioni nel terreno ma anche dalla specie botanica in quanto alcune piante hanno la capacità di accumulare As nei loro tessuti ¹.

Nell'ambiente acquatico il processo di metilazione/demetilazione è influenzato dal pH, dall'ossigenazione, dalla temperatura dell'acqua e dalla composizione dei sedimenti; il risultato è la formazione di composti metilati, di diverso potenziale tossico, che possono essere assunti e quindi trovarsi nelle specie acquatiche. La flora e la fauna acquatiche hanno la capacità di accumulare As ma soltanto in pochi casi si può parlare di biomagnificazione.

L'inquinamento industriale può incrementare i livelli di arsenico nell'ambiente.

Negli anni '70 un caso di contaminazione ambientale a Novaky in Slovacchia, ad opera di una centrale termoelettrica a carbone, ha provocato un considerevole incremento dei livelli di

arsenico nell'acqua e nei prodotti agricoli, con conseguenti casi di intossicazione negli abitanti della zona ⁷. Il carbone utilizzato conteneva livelli di As 200 volte superiori a quelli del carbone americano, che mediamente contiene 5 mg/Kg; l'impianto emetteva giornalmente dalle ciminiere fino a 1 t di As; l'acqua potabile nella campagna circostante aveva livelli di arsenico di 0,07 mg/l e quella di superficie di 0,21 mg/l.

In Gran Bretagna, nel territorio circostante una fornace di mattoni alimentata da carbone, sono stati segnalati casi di avvelenamento cronico negli animali domestici. Emissioni di arsenico da fonderie di metalli sono state segnalate sia in USA che in Svezia, con il rilascio atmosferico giornaliero in quest'ultimo caso di 10 t di As ⁶.

Nel passato l'utilizzo agricolo di composti arsenicali ha portato in alcuni casi, oltre che ad avvelenamento umano e degli animali, a contaminazione ambientale. Questa è riscontrabile anche dopo molti anni perché l'arsenico è un tossico persistente.

Produzione e utilizzi dell'arsenico

In natura l'arsenico nativo si trova soltanto in piccole quantità cristallizzato in concrezioni grigie. I minerali che lo contengono sono il realgar (As_4S_4) di colore rosso rubino, l'orpimento (As_2S_3) di colore giallo limone e l'arsenopirite, l'unico sfruttato industrialmente. Più che in giacimenti autonomi l'arsenopirite si trova dispersa nei minerali solforati di altri metalli, come la pirite. Dalla lavorazione di questi minerali contenenti ferro, rame, piombo ed altri metalli si ottiene, come sottoprodotto, l'ossido di arsenico trivalente. Questo composto viene estratto dai gas di combustione raccolti dopo la vaporizzazione durante la fusione degli altri metalli. La fuliggine viene purificata fino ad ottenere una miscela al 97% di As_4O_6 ed al 3% di ossidi di altri elementi, tra cui il più importante è Sb_2O_3 . La produzione mondiale di ossido di arsenico è di circa 60000 t/anno ¹.

L'arsenico metallico allo stato di estrema purezza trova applicazione soltanto in elettronica per le sue proprietà semiconduttrici; viene utilizzato anche come componente di leghe metalliche nelle quali, introdotto in piccole quantità, ha la proprietà di conferire durezza e resistenza termica (produzione di acciaio, ottone e piombo).

La quantità maggiore di arsenico è stata utilizzata, sotto forma dei suoi composti, nell'industria chimica con impieghi soprattutto nel campo farmaceutico e in quello agricolo. Erbicidi, fungicidi, insetticidi, conservanti del legno, rodenticidi e antiparassitari zootecnici contenenti As erano molto utilizzati in passato, mentre oggi le restrizioni per la tossicità dell'elemento ne hanno fortemente limitato o bandito l'uso.

Tra i composti arsenicali impiegati nelle produzioni agricole ricordiamo l'arsenato di piombo, l'arsenato di rame, l'aceto-arsenato di rame, l'arsenato di sodio e l'acido cacodilico. L'arsenito di piombo, utilizzato estensivamente come insetticida del tabacco, ha portato ad alte assunzioni dell'elemento da parte dei fumatori; i trattamenti con arsenicali spray per prevenire infestazioni di insetti sui meli ha portato alla contaminazione dei frutti; l'impiego di arsenicali utilizzati per la terapia e la profilassi di alcune parassitosi degli ovini ha causato accumulo e persino casi di avvelenamento umano nelle aziende agricole ⁵. Un altro impiego dei composti dell'arsenico, tramite l'incorporazione dell'acido arsanilico nei mangimi, è come promotore di crescita per suini e avicoli.

L'arsenito di rame era utilizzato in passato come pigmento per pitture (verde di Scheele) ma poi è stato completamente abbandonato per la sua tossicità. Il minerale orpimento contenente sesquisolfuro di arsenico (di colore giallo) veniva usato in pittura ma poi è stato sostituito per la sua tossicità; il composto, preparato artificialmente, trova impiego in conceria per la depilazione delle pelli ed in pirotecnica per dare ai fuochi d'artificio il colore azzurro.

L'elemento viene anche impiegato nella produzione di pigmenti per smalti e nella produzione di vetri.

L'arsenico ed i suoi composti nel passato hanno avuto grande importanza in campo medico come curativi. Fino a tempi recenti si poteva trovare in farmacia il liquore arsenicale del Fowler, una preparazione contenente As inorganico impiegata per il trattamento di malattie alla pelle e, assunta per via interna, dotata di azione antianemica, anabolizzante e ricostituente; un altro preparato di arsenico inorganico era il liquore di Pearson. In una ricerca del 1965 su un grande gruppo di pazienti che avevano utilizzato la soluzione di Fowler per molti anni è stata trovata una proporzione significativamente alta di persone che avevano sviluppato il cancro alla pelle ⁸. Il triossido di arsenico viene talvolta impiegato in odontoiatria per la necrotizzazione della polpa dentaria.

Composti organici dell'arsenico (come il cacodilato di sodio ed il metilarsinato di sodio) sono stati estensivamente impiegati per curare la sifilide e la tripanosomiasi, ma l'interesse delle terapie arsenicali è considerevolmente diminuito con l'avvento dei farmaci chemioantibiotici. Gli arsenicali ciclici, sia trivalenti (per esempio fenilarsenossido e salvarsan) che pentavalenti (per esempio atoxil, triparsamide e stovarsolo), sono stati chemioterapici importanti. Alcune preparazioni arsenicali, come alcuni amebocidi e filaricidi, vengono ancora prescritte attualmente.

Ai tempi di Marco Polo in Cina l'arsenico aveva un posto importante come curativo di un tipo di malaria; alcune popolazioni orientali facevano uso di ossido di arsenico trivalente, come tonico generale e composto dalle proprietà cosmetiche. La medicina omeopatica veterinaria e umana utilizzano tuttora questo composto; l'arsenico a piccole dosi è stato anche recentemente impiegato per trattare alcuni malati di leucemia che non rispondevano alle terapie.

L'attività terapeutica degli arsenicali trivalenti deriva dal loro alto potere di combinazione con i gruppi tiolici di alcuni componenti cellulari cui sono particolarmente sensibili alcuni microrganismi, come le leptospire, i tripanosomi, i treponemi e, negli animali superiori, i tessuti ricchi di proteine sulfidrilate (pelle, tubuli contorti renali e fegato).

Nel passato, e per molte centinaia di anni, è probabile che la larga diffusione di preparati farmaceutici e altri prodotti contenenti As, abbia fatto sì che l'elemento venisse utilizzato come uno dei più comuni veleni per omicidi e suicidi.

L'assorbimento ed il metabolismo dell'arsenico

L'arsenico inorganico, sia trivalente che pentavalente, viene facilmente assorbito dagli alimenti nel tratto gastro-intestinale in quantità che dipendono dalla forma chimica in cui l'elemento si presenta. L'arsenico assorbito viene prontamente trasportato a tutti gli organi ed i tessuti come complesso, probabilmente tramite α -globuline. Dopo 24 ore le concentrazioni negli organi generalmente iniziano a decrescere per l'eliminazione di arsenico dall'organismo, che avviene principalmente con le urine, mentre nella pelle si assiste ad un incremento dei livelli per numerosi giorni. L'accumulo si può avere nella pelle, nelle unghie, nei capelli ed in piccola quantità nelle ossa e nei muscoli.

I composti di arsenico organico sono generalmente considerati assorbibili in bassa misura dai mammiferi e vengono rapidamente eliminati con le urine. La biometilazione quindi può essere considerata una detossificazione perché i composti metilati dell'arsenico sono meno tossici e più facilmente escreti. Il metabolismo degli organoarsenicali all'interno dell'organismo umano non è ben conosciuto; sembra comunque che vengano eliminati, in gran parte nelle 24 successive l'ingestione, per via fecale ed urinaria senza subire alcuna trasformazione. Considerando che i prodotti della pesca contengono As soprattutto in forma organica, la determinazione della trimetilarsina (TMA) nelle urine è stata proposta come indicatore della quantità dell'elemento derivante dal consumo di prodotti ittici ⁹.

Le quantità di arsenico totale nel corpo sono tra 14 e 20 mg ¹.

I livelli di As nel sangue e nelle urine sono stati utilizzati per misurare l'esposizione al tossico, mentre i capelli vengono impiegati specialmente nelle indagini medico-legali. In alcuni casi è stato possibile determinare il massimo cronologico di ingestione dell'elemento; in casi di avvelenamento acuto sono stati trovati livelli di As nei capelli da 5 a 700 mg/kg ¹⁰.

La tossicità dell'arsenico

L'arsenico può causare avvelenamento acuto o cronico.

Il principale responsabile dell'avvelenamento acuto è il triossido di arsenico, che ha una dose letale di 70-180 mg. I composti trivalenti, a livello sistemico, provocano dilatazione dei capillari aumentando la permeabilità di capillari ed arteriole; la dilatazione produce cambiamenti del circolo e conseguenti alterazioni funzionali. Gli arsenicali trivalenti si combinano con i gruppi -SH di proteine, enzimi, coenzima A e glutazione ridotto. Alla luce del meccanismo d'azione tiolo-priva si spiega l'efficace azione antidotale svolta nell'avvelenamento da As dalle sostanze sulfidriliche, capaci di impedire la combinazione del veleno con le proteine tissutali. È stato dimostrato che gli effetti tossici degli arseniti possono essere prevenuti utilizzando preparazioni contenenti glutazione ⁶. Gli arseniti inoltre si accumulano nei leucociti e deprimono l'attività degli enzimi contenenti gruppi tiolici, inclusa la DNA-polimerasi.

L'arsenico pentavalente, leggermente meno tossico della forma trivalente, inibisce i sistemi enzimatici come la α -glicerofosfato deidrogenasi e la citocromo-ossidasi.

La tossicità dell'arsenato è stata spiegata in termini di "imitazione molecolare" ¹¹. L'arsenato imita il fosfato e viene perciò trasportato attraverso le membrane cellulari su trasportatori fosfato; di conseguenza la sua collocazione nei tessuti segue strettamente quella dei fosfati. La similarità strutturale dell'ossianione endogeno fosfato con gli ossianioni tossici di As e V si può osservare nella Figura 1 ed è alla base del meccanismo di imitazione; le tre molecole sono tutte in forma monovalente e, a pH fisiologico, parzialmente ionizzate.

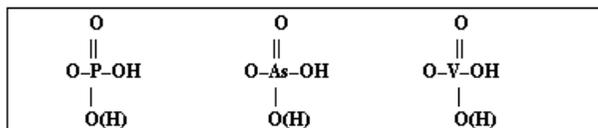


Figura 1 - Confronto tra le strutture chimiche di fosfato, arsenato e vanadato.

L'arsenato può imitare il fosfato endogeno così bene che può partecipare ad una sequenza di reazioni metaboliche fino al fallimento dell'imitazione ed al sopraggiungere delle conseguenze tossiche. Questa abilità nell'imitazione è stata dimostrata in numerosi tessuti di molte specie animali¹².

Gli ossianioni tossici interagiscono con alcuni noti recettori cellulari, come i recettori glucocorticoidei ed i recettori estrogeni. L'arsenato compete con il fosfato nei co-trasportatori fosfato Na-dipendenti nelle cellule di numerosi tessuti¹¹. Kenney e Kaplan¹³ hanno presentato la prova che la pompa sodio ed il sistema di trasporto degli scambiatori anionici delle cellule dei globuli rossi umani accettano l'arsenato come congenere del fosfato. Le cellule dei globuli rossi possiedono anche una via di co-trasporto del fosfato Na-dipendente che non viene inibita dall'arsenato.

La reazione di arsenolisi nella sintesi dell'ATP è l'esempio meglio studiato dell'imitazione tra arsenato e fosfato (Figura 2)¹⁴. La via normale comprende l'addizione del fosfato alla 3-gliceraldeide fosfato per formare la 1,3 difosfoglicerato; questo intermedio dona il fosfato all'ADP per formare l'ATP. L'arsenato può sostituire il fosfato nel primo step di reazione ma il composto intermedio è instabile, idrolizza spontaneamente, non reagisce con l'ADP e quindi non si ha formazione di ATP e immagazzinamento di energia. In questo modo la sintesi dell'ATP è "disaccoppiata"¹⁵. L'ossianione ortovanadato si comporta allo stesso modo dell'arsenato.

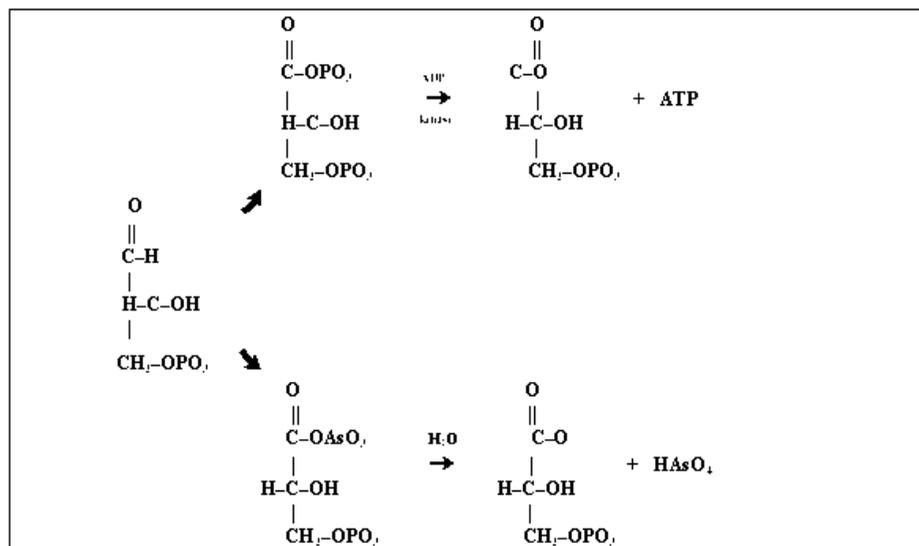


Figura 2 - Reazioni di arsenolisi.

L'imitazione del fosfato nelle reazioni enzimatiche, comunque, non chiarisce completamente la tossicità dell'arsenico. L'arsenato può essere ridotto in vivo alla forma trivalente, che è legata ai gruppi -SH dell'acido α -lipoico e inibisce la piruvato deidrogenasi.

L'arsenico pentavalente influenza il metabolismo del selenio impedendogli di raggiungere il sito d'azione oppure aumentandone l'escrezione¹⁶. Il selenio d'altra parte, se aggiunto alla dieta, può prevenire l'intossicazione da arsenico nei bovini, nei polli, nei suini, nei cani e nei ratti. Sono stati riscontrati effetti additivi di piombo ed arsenico nell'escrezione di coproporfirine⁶. Sono state anche dimostrate interazioni tra Cd e As ed è probabile che la spiegazione sia ricercare nella similarità dei meccanismi d'azione dei differenti elementi nelle cellule e nei tessuti, specialmente l'interazione con i gruppi sulfidrilici.

I composti arsenicali che più frequentemente sono descritti come cause di intossicazioni, oltre l'ossido di arsenico trivalente, sono il solfuro ed il tricloruro di arsenico, i coloranti arsenicali, gli insetticidi arsenito di piombo e di calcio, le arsine. Esiste un'ampia casistica epidemiologica, per cui l'ingestione di arsenico con acqua potabile o lunghi contatti con arsenicali usati come antiparassitari predispongono al carcinoma della pelle o al cancro del polmone. L'arsenico può essere cancerogeno ma i rilievi epidemiologici e le evidenze sperimentali sembrano talvolta in contraddizione ¹. Recentemente è stato suggerito che l'elemento da solo non è capace di provocare cancro e quindi sono necessari ulteriori studi per approfondire le conoscenze su questo ruolo ³.

L'avvelenamento cronico provoca perdita di appetito, calo del peso, disturbi gastro-intestinali, neuriti periferiche, congiuntivite e alterazioni cutanee, come ipercheratosi e melanosì. Quest'ultima malattia, che porta ad una colorazione scura della cute, è caratteristica della prolungata esposizione all'arsenico e può essere un fattore di predisposizione allo sviluppo del cancro alla pelle. L'assenza di effetti mutageni dell'arsenobetaina è stata accertata con prove sperimentali ².

Elevati livelli di arsenico inorganico nell'acqua potabile sono stati associati ad un aumento della prevalenza dell'ipertensione arteriosa¹⁷.

L'avvelenamento da arsenico, come riferito in letteratura, è relativamente frequente negli animali di interesse zootecnico ¹⁸. Le api sono estremamente suscettibili all'avvelenamento da As. Debackere riferisce della morte di 10-15 milioni di api, avvenuta nella primavera del 1971, a causa di inquinamento industriale da arsenico di una vasta zona ¹⁹; l'analisi chimica dei fiori presenti in loco permise di stabilire che contenevano concentrazioni da 15 a 54 mg/kg dell'elemento, mentre nelle api il contenuto era pari a 0.23 ug.

Contaminazione accidentale degli alimenti

Le contaminazioni accidentali e l'inquinamento industriale possono incrementare i livelli di arsenico negli alimenti e nelle bevande ed in alcuni casi hanno portato a gravi avvelenamenti¹.

Nel 1900 in Gran Bretagna la birra avvelenò 6000 persone di cui 70 in modo letale: la Royal Commission in seguito all'indagine constatò che il disastro era dovuto all'impiego di pirite arsenicale per produrre l'acido solforico usato per idrolizzare l'amido nel processo di produzione della bevanda.

Un altro incidente avvenne in Giappone nel 1955 quando rimasero avvelenati 12000 bambini, di cui 120 in modo fatale, a causa della somministrazione di alimenti per l'infanzia contaminati da arsenico. Il tossico venne ritrovato nel sodio fosfato utilizzato per stabilizzare l'alimento; il sale proveniva, come sottoprodotto, dall'industria di produzione dell'alluminio, a sua volta ricavato per raffinazione di bauxite contenente elevati livelli di As.

L'impiego di arsenicali come pesticidi nei vigneti, ha portato in alcuni casi ad avvelenamenti dei bevitori di vino. Incrementi dell'assunzione di As possono essere causati da residui provenienti dall'impiego di composti arsenicali in orticoltura. Sebbene nei paesi occidentali questi composti non trovino più utilizzi agricoli, in alcuni paesi gli arsenicali possono trovare tuttora impiego su colture non alimentari: nella coltivazione del cotone, per esempio, si impiegano come defolianti e le popolazioni che utilizzano i semi di cotone come alimento introducono arsenico nella dieta.

Per prevenire tali pericoli alcuni paesi hanno introdotto limiti di tolleranza dei residui di arsenico negli alimenti: negli USA il limite è di 3,5 mg/kg ²⁰, mentre in Queensland (Australia) i limiti sono massimi permessi sono differenziati per bevande (0,1 mg/kg), prodotti ittici (1 mg/kg di As inorganico) e altri alimenti (1 mg/kg) ¹.

L'arsenico nell'acqua

L'arsenico è rilevabile in quasi tutte le acque destinate al consumo umano ed i livelli usuali vanno da frazioni di δ mg/L fino a 200 δ mg/L.

La US Federal Regulation stabilisce per l'acqua potabile un limite massimo di 10 δ mg/l. Talvolta si sono registrate concentrazioni superiori a 50 δ mg/l (che rappresenta il limite massimo tollerato dalla direttiva CEE n. 80/778), come in Italia in alcune località della pianura lombarda. Il superamento di tale concentrazione massima ammissibile, prevista nel nostro paese dal D.P.R. n. 236, ha anche portato al divieto di utilizzo delle acque per usi alimentari ²¹. Nel nostro paese il D.M. n.542, riguardante le caratteristiche delle acque minerali naturali prevede limiti di 200 δ mg/l di As totale, di 50 μ g/l per As(III) e di 150 μ g/l per As(V) ²².

Sorgenti d'acqua particolari, come quelle termali, possono avere concentrazioni di As particolarmente elevate in funzione della roccia sottostante e della sorgente d'acqua. Quelle che vengono descritte come "arsenicose croniche endemiche regionali" sono attribuite all'uso domestico di acqua naturalmente contaminata. Livelli di As₂O₃ di 1-4 mg/l sono stati trovati in acque dell'Argentina e del Cile. Il consumo di acqua contenente 0,6 mg/l di As in alcune zone di Taiwan è stato associato ad avvelenamento cronico ²³.

L'arsenico negli alimenti e nella dieta

Le informazioni sui tenori di arsenico negli alimenti in generale sono piuttosto scarse.

In una ricerca effettuata tra il 1985 ed il 1988 in 7 città canadesi sulla dieta totale è stato trovato che in 112 alimenti la media di As totale era 73,2 µg/kg, la mediana di 5,1 µg/kg ed il range da <0,1 a 4830 µg/kg.

Le concentrazioni medie rilevate nei principali alimenti di questo studio espressi in µg/kg erano le seguenti ²⁴:

- pesci marini: 2466;
- pesce d'acqua dolce: 443;
- molluschi e crostacei: 2041;
- carne suina: 8,2;
- carne bovina: 7,8;
- pollame: 29,9;
- uova: 6,2;
- latte intero: 1,4;
- formaggio: 5,2;
- pane: 12,9;
- pasta: 9,5;
- riso: 284,1;
- patate: 5,5;
- lattuga: 2,4;
- fagioli: 3,1;
- pomodori: 1,8;
- funghi: 46,4;
- mele: 3,8;
- banane: 3,3;
- oli e grassi: 19,0;

- vino: 5,8;

- birra: 3,0.

Dall'esame dei dati si sono ottenute stime sull'assunzione di As: l'ingestione totale media è di 38,1 µg/giorno ed il maggior contributo deriva dalla categoria dei prodotti ittici (64%), seguita da quella degli alimenti carni e dalla categoria dei cereali e prodotti derivati.

In altri studi sono riportate assunzioni giornaliere maggiori, come in Nuova Zelanda (55µg/giorno), in USA (62 µg/giorno) ed in Gran Bretagna (89 µg/giorno). In Svezia sono state stimate assunzioni di As più basse (15-45 µg/giorno), così come in Austria (27 µg/giorno) ed in Belgio (12 µgg/giorno) ²⁴.

Pesci, crostacei e molluschi provenienti dall'ambiente marino possono contenere alti livelli di arsenico e possono contribuire in modo significativo all'assunzione giornaliera dell'elemento. L'accumulo è particolarmente elevato nei molluschi e nei crostacei e, specialmente se questi organismi vivono in acque contaminate, si può arrivare anche a concentrazioni intorno a 100 mg/kg; i pesci generalmente hanno livelli inferiori a 10 mg/kg.

In Queensland (Australia) il massimo livello permesso di As inorganico nei prodotti della pesca è di 1 mg/kg, quindi non viene preso in considerazione l'arsenico organico ¹. Uno studio giapponese ha valutato quantitativamente le 3 frazioni di arsenico organico (MAA, DMAA e TMA) e quella di arsenico inorganico in alcune specie di prodotti ittici: la frazione di As inorganico è risultata essere sempre inferiore al 5% ed in molti casi inferiore all' 1% ⁹.

Come ha fatto notare l'Expert Committee della FAO/OMS, l'arsenico nei tessuti muscolari rimane legato organicamente e gli studi sull'uomo utilizzando traccianti isotopici hanno rilevato che viene rapidamente escreto senza significative ritenzioni di As inorganico ²⁵. Gli esperti francesi sugli aspetti scientifici dell'inquinamento marino (GESAMP) hanno constatato che i composti organici dell'arsenico, che costituiscono più del 90% dell'arsenico totale degli alimenti di provenienza marina, sono poco tossici ². La pericolosità dei prodotti ittici dovrebbe essere valutata dopo la determinazione della componente inorganica.

Anche la FAO/OMS considera nelle indicazioni riguardanti la P.T.D.I. soltanto l'arsenico inorganico con una assunzione tollerata giornaliera di 2,1 µgg/kg di peso corporeo (P.T.W.I. di 15 µgg/kg): per un adulto di 60 Kg, la quantità massima tollerata giornalmente è di 126 µg ²⁶.

Risultati della determinazione di arsenico in alcuni alimenti in Italia

Presentiamo i dati relativi alle determinazioni di As totale in alcuni alimenti; le analisi sono state effettuate impiegando la Spettrofotometria di Assorbimento Atomico tramite apparecchio di generazione degli idruri.

Nella Tabella 1 sono riportati i valori delle concentrazioni dell'elemento sulla parte edibile di pesci di acqua dolce (di 19 diverse specie pescati in due diverse sezioni del medio corso del Po), di trote (provenienti da 4 allevamenti della provincia di Treviso) e di pesci marini (provenienti dal Mare Adriatico).

PERIODO	PROVENIENZA	CAMPIONI	N	MEDIA	DEV.ST	MEDIANA	MIN	MAX
1987-1988	Medio corso Po	pesci di fiume	106	0,137	0,094	0,111	0,030	0,792
1990-1991	Provincia Treviso	trote di allevamento	40	0,069	0,032	0,065	0,016	0,158
1986-1988	Mare Adriatico	pesci marini	197	6,22	4,01	5,20	0,91	20,8
1994	Mare Adriatico	pesci marini	15	3,03	4,67	1,88	0,47	19,5

Tabella 1- Concentrazioni di As espresse in mg/kg di peso fresco nei pesci.

I livelli di arsenico nei pesci di acqua dolce sono piuttosto bassi se messi a confronto con quelli dei pesci marini. Le concentrazioni di questi ultimi sono 30-40 volte superiori rispetto ai pesci di fiume e di quasi 100 volte rispetto alle trote di allevamento.

Le concentrazioni di As nei pesci di acqua dolce risentono del grado di inquinamento delle acque: campionamenti effettuati in Italia in corsi d'acqua non inquinati hanno mostrato tenori inferiori a questi ²⁷. In 39 campioni di 10 specie diverse di pesci del fiume Rednitz (Baviera) sono state rilevate medie di 0,052 mg/kg (range 0,006 - 0,298) con le concentrazioni più elevate nelle trote (media di 0,160 mg/kg) ²⁸. Una ricerca riguardante la contaminazione da metalli nel corpo totale di 5 specie di pesci di acqua dolce del fiume San Joaquin in California ha evidenziato che i pesci di acqua dolce in alcuni tratti inquinati accumulano elevate concentrazioni di As²⁹.

Nella Tabella 2 vengono riportati i valori delle concentrazioni di arsenico in campioni di molluschi e crostacei provenienti dal Mare Adriatico.

PERIODO	PROVENIENZA	CAMPIONI	N	MEDIA	DEV. ST	MEDIANA	MIN	MAX
1986-1988	Mare Adriatico	molluschi bivalvi	61	6,94	5,45	5,49	1,60	32,9
1986-1988	Mare Adriatico	molluschi gasteropodi	20	25,99	13,24	23,61	3,80	67,0
1986-1988	Mare Adriatico	molluschi cefalopodi	33	25,55	20,34	23,70	1,77	109,0
1994	Mare Adriatico	molluschi cefalopodi	16	28,79	27,48	14,19	8,35	88,7
1986-1988	Mare Adriatico	crostacei	18	15,56	21,33	8,16	3,40	80,8
1994	Mare Adriatico	crostacei	14	18,39	19,29	13,81	6,99	88,7

Tabella 2- Concentrazioni di As espresse in mg/kg di peso fresco in invertebrati marini.

Nei molluschi bivalvi i livelli di arsenico sono paragonabili a quelli dei pesci marini, mentre nei molluschi gasteropodi, nei molluschi cefalopodi e nei crostacei le concentrazioni sono particolarmente alte.

Da questi risultati si evince che la fauna acquatica ha una certa capacità di accumulare l'arsenico ma non si ha magnificazione biologica. L'accumulo nei crostacei e nei molluschi, oltre che da caratteristiche alimentari, può essere messo in relazione con la contaminazione delle acque ².

Comunque livelli simili a quelli di questa ricerca sono stati ritrovati in prodotti ittici dell'Adriatico da altri autori ^{30, 31}. In 32 specie di pesci provenienti dalla costa della provincia di Granada in Spagna le concentrazioni di As ritrovate andavano da 0,4 a 45,7 mg/kg ³².

Per valutare approssimativamente qual è il contributo dei prodotti ittici all'assunzione di As abbiamo considerato le concentrazioni medie di As nel complesso dei campioni di prodotti ittici analizzati (7,83 mg/kg) ed i consumi medi dei prodotti ittici in Italia, che sono di 0,420 kg/settimana ³³. Il prodotto di questi due dati fornisce un'ingestione settimanale di 3,29 mg di As totale. La dose massima di As inorganico tollerata settimanalmente da un adulto di 60 Kg è 0,882 mg ²⁶. Ipotizzando nei campioni considerati una percentuale di As inorganico dell'1%, il contributo che questi alimenti forniscono all'ingestione della frazione inorganica nella dieta è del 3,73%. Ipotizzando, invece, una presenza di As inorganico del 10% il contributo diventa del 37,3%.

Quindi, anche se l'arsenico nei prodotti ittici è presente in gran parte come composti organici, il contributo all'assunzione con la dieta fornito da questi alimenti potrebbe essere piuttosto elevato, considerando che altre fonti alimentari possono contribuire all'aumento delle quantità ingerite fino ad arrivare al livello massimo consentito dalla FAO/OMS. Il rischio è maggiore nel caso di elevati consumi di pescato, non infrequente nel nostro paese, dove alcune categorie di persone, come pescivendoli, pescatori o grandi consumatori di prodotti della pesca, ingeriscono quantità di pesci, crostacei e molluschi molto più grandi rispetto alla media.

In particolare in alcuni campioni di molluschi cefalopodi e di crostacei le concentrazioni di arsenico sono da considerare molto alte (vicine ai 100 mg/kg) anche supponendo che l'elemento si trovi prevalentemente in forma organica. Infatti, come osserva il GESAMP, con livelli negli alimenti marini superiori al valore sopra indicato e nel caso di elevati consumi da parte di alcune popolazioni, il rischio di contaminazione da arsenico non può essere escluso ².

E' doveroso tuttavia osservare che i dati relativi all'ultimo campionamento del Mare Adriatico mostrano una tendenza alla diminuzione dei livelli di arsenico.

Relativamente ai prodotti della pesca raccolti nel 1994 sono state effettuate le determinazioni di As in alcuni tessuti o organi, oltre che nella parte edibile. Le medie e le deviazioni standard dei livelli rilevati in alcune specie sono espresse nelle Tabelle 3, 4 e 5.

SPECIE	N	MUSCOLO BIANCO	BRANCHE	ORGANI INTESTINALI
<i>Sardina pilchardus</i>	5	1,27 ± 0,63	1,66 ± 0,76	2,74 ± 1,08
<i>Engraulis encrasicolus</i>	5	2,61 ± 0,75	2,54 ± 0,51	6,00 ± 2,22

Tabella 3 - Concentrazioni di As espresse in mg/kg di peso fresco nei pesci.

SPECIE	N	EPATOPANCREAS	MUSCOLO DEL MANTELLO
<i>Sepia officinalis</i>	4	24,8 ± 8,0	18,2 ± 6,4
<i>Octopus vulgaris</i>	4	88,7 ± 15,1	72,8 ± 15,6

Tabella 4 - Concentrazioni di As espresse in mg/kg di peso fresco nei molluschi cefalopodi.

SPECIE	N	EPATOPANCREAS	MUSCOLO ADDOMINALE	BRANCHE	CARAPACE
<i>Nephrops norvegicus</i>	3	14,7 ± 7,0	18,3 ± 4,4	11,0 ± 2,7	10,7 ± 3,4
<i>Squilla mantis</i>	5		13,7 ± 6,1		13,7 ± 5,0

Tabella 5 - Concentrazioni di As espresse in mg/kg di peso fresco nei crostacei.

L'arsenico nei pesci è più abbondante negli organi digestivi rispetto al muscolo, mentre invece gli epatopancreas di molluschi e crostacei hanno livelli simili a quelli della parte muscolare.

Nei pesci si può osservare una certa differenza tra le due specie con livelli maggiori nelle alici rispetto alle sardine. Tra i cefalopodi le concentrazioni dei polpi sono decisamente più alte rispetto a quelle delle seppie. Queste differenze di specie all'interno della stessa categoria tassonomica sono da mettere in relazione con l'habitat alimentare. Per le due specie di crostacei si può osservare che negli scampi il tenore di As del muscolo è decisamente più alto rispetto a quello delle canocchie.

In una ricerca condotta su gamberetti della specie *Pandalus platyceros* raccolti in prossimità di un'isola del Pacifico sono stati ritrovati valori di As di 29,2 mg/kg (espressi sulla sostanza secca) nel tessuto addominale, di 31,5 mg/kg nel carapace e di 61,8 mg/kg nell'epatopancreas³⁴; questi valori, anche se riguardano un'altra specie, sono inferiori a quelli da noi rilevati negli scampi.

Nel tessuto muscolare di 3 specie di crostacei provenienti dal golfo arabico sono stati trovati livelli medi di As di 15,8 mg/kg nei gamberi, di 6,28 mg/kg nei granchi e di 12,7 mg/kg nelle aragoste³⁵; questi valori sono tra i più alti riportati in letteratura.

Un certo accumulo di arsenico nel fegato dei pesci è stato osservato anche in esemplari provenienti dal Mare Jonio (4,18 mg/kg nel muscolo e 18,88 mg/kg nel fegato)³⁶.

In Tabella 6 vengono presentati i dati relativi a tessuti e organi di suini pesanti, macellati a 1 anno di età provenienti da dieci diversi allevamenti.

CAMPIONI	N	MEDIA	DEV.ST	MEDIANA	MIN	MAX
fegato	100	0,020	0,009	0,020	0,009	0,037
muscolo del diaframma	100	0,023	0,008	0,023	0,010	0,032
rene	100	0,027	0,009	0,028	0,011	0,040

Tabella 6 - Concentrazioni di arsenico espresse in mg/kg di peso fresco in tessuti e organi di suino.

I livelli medi più alti sono quelli rilevati nel rene, seguiti da quelli della parte muscolare mentre i livelli più bassi sono quelli dei fegati.

Forschner e Wolf per suini di oltre 1 anno allevati in Germania riportano valori medi di 0,030 mg/kg nel fegato, di 0,025 mg/kg nel muscolo e di 0,033 mg/kg nel rene³⁷. Jorhem et al., in suini allevati tra il 1984 ed il 1987 in Svezia e macellati a 6 mesi di età, hanno rilevato i seguenti tenori medi: 0,019 mg/kg nel fegato, < 0,005 mg/kg nel muscolo e 0,016 mg/kg nel rene³⁸. Zmudzki et al. per suini allevati in Polonia riportano valori medi bassi: 0,007 mg/kg nel fegato, 0,003 mg/kg nel muscolo e 0,007 mg/kg nel rene³⁹. Anche in una precedente

indagine svolta in Italia, riguardante i contenuti di As di campioni di carne di varie specie, sono stati trovati valori piuttosto contenuti nel suino (0,0065 mg/Kg nel muscolo e 0,0092 mg/kg nel fegato) ⁴⁰. Ricerche effettuate in Canada sui livelli di As in differenti specie domestiche hanno rilevato i livelli più elevati nei suini e nelle specie avicole. In particolare i fegati suini denunciavano un valore medio di 0,26 mg/kg ⁴¹; tali concentrazioni possono essere associate a somministrazione di arsenicali a scopo auxinico.

Infine nella Tabella 7 vengono presentati i dati relativi ad alcuni alimenti utilizzati anche come indicatori per studiare il territorio in relazione al contenuto in metalli pesanti. Si tratta di campioni raccolti nella bassa mantovana: parte muscolare di rane, parte edibile di 2 specie di chiocchie e corpo fruttifero di un basidiomicete. Vengono, inoltre, riportati i dati relativi a funghi di specie diverse raccolti nell'Appennino parmense.

PERIODO	PROVENIENZA	CAMPIONI	N	MEDIA	DEV.ST	MEDIANA	MIN	MAX
1989	Provincia Mantova	<i>Rana esculenta</i>	14	0,045	0,023	0,038	0,020	0,115
1989	Provincia Mantova	<i>Helix aspersa</i>	32	0,048	0,031	0,044	0,004	0,132
1989	Provincia Mantova	<i>Helix lucorum</i>	32	0,051	0,031	0,046	0,003	0,109
1989	Provincia Mantova	<i>Leucoagaricus cretaceus</i>	54	0,566	0,452	0,437	0,026	2,63
1989	Borgotaro (PR)	funghi di varie specie	10	0,951	0,856	0,642	0,176	2,56

Tabella 7 - Concentrazioni di arsenico espresse in mg/kg di peso fresco in alcuni bioindicatori.

Le concentrazioni di arsenico in questi bioindicatori terrestri sono piuttosto basse ad eccezione dei funghi. Questi organismi, essendo a contatto con il suolo, con l'aria e con la pioggia, vengono utilizzati come indicatori della deposizione e della biodisponibilità degli elementi in traccia ⁴². Alcune specie concentrano l'arsenico dal suolo anche quando i livelli sono bassi. Byrne e Tusk-Znidarc ⁴³ riportano valori di As in funghi edibili fino a 182 mg/kg (calcolati sul peso secco), mentre in funghi edibili raccolti in Slovenia i livelli vanno da 0,8 a 128,5 mg/kg (calcolati sul peso secco) ⁴². Campioni di specie eduli raccolti recentemente nell'alto Appennino reggiano mostrano concentrazioni di As inferiori ⁴⁴.

Conclusioni

La diffusione di arsenico nell'ambiente e di riflesso negli alimenti e nelle bevande risulta di estrema importanza per le sue implicazioni igienico-sanitarie. La sua presenza, talvolta non trascurabile nei nostri alimenti, deve essere considerata con maggiore attenzione di quanto non sia stato fatto in passato; ciò potrebbe essere dovuto in parte al fatto che non si sono verificati recentemente fatti clamorosi di intossicazione collettiva causati dagli alimenti come tali. Le informazioni che abbiamo sulla distribuzione nella dieta dei vari territori del pianeta sono scarse e frammentarie. L'arsenico è facilmente assorbito ed escreto e presenta in generale un tropismo per la materia vivente. La sua tossicità è elevata ma strettamente legata alla forma chimica. I prodotti della pesca contengono le maggiori quantità di arsenico, che risulta prevalentemente nella forma poco tossica. La distinzione analitica delle diverse componenti non è di facile accesso per laboratori non espressamente attrezzati. I dati relativi agli alimenti nel nostro paese confermano gli elevati tenori di arsenico nei prodotti ittici, ma non è possibile a tutt'oggi stimare con certezza la percentuale di As inorganico in essi presenti e di conseguenza valutare il rischio cui il consumatore è esposto. Le stime che vengono avanzate in questo lavoro prospettano una esposizione al tossico paragonabile a quella dei paesi in cui la sua assunzione tramite gli alimenti è stata studiata. Soltanto nel caso di grandi consumatori di prodotti ittici l'assunzione di arsenico potrebbe attestarsi su livelli preoccupanti. Sarebbe indispensabile poter disporre di informazioni sull'entità della reale presenza di arsenico inorganico nel pescato, in particolare quello di provenienza marina.

Parole-chiave: arsenico, nutrizione, alimenti, tossicologia.

Keywords: arsenic, nutrition, foods, toxicology.

Mot-clés: arsenic, nutrition, aliments, toxicologie.

RIASSUNTO - L'arsenico è un elemento diffuso in natura ed i suoi livelli negli alimenti generalmente riflettono il normale accumulo dall'ambiente. Nel passato i principali impieghi dell'elemento sono stati quelli dell'industria chimica con applicazioni nelle produzioni farmaceutiche e degli agro-chimici. L'arsenico è un veleno persistente e la possibilità che possa arrivare alla catena alimentare umana ha portato a restrizioni dell'utilizzo di composti arsenicali. Gli organismi marini frequentemente contengono arsenico in alte concentrazioni, specialmente i molluschi ed i crostacei. La maggior parte dell'arsenico negli organismi marini è in forma organica, rapidamente escreta dall'organismo umano e di bassa tossicità. La tossicità cronica e acuta dell'arsenico e dei suoi composti è nota e la conoscenza dei livelli di esposizione umana a questo tossico fa parte dei programmi di salvaguardia della salute pubblica delle autorità sanitarie internazionali. Vengono presentati e discussi i dati su analisi dell'arsenico totale in prodotti ittici ed altri alimenti. Le concentrazioni di As rilevate in

alcuni campioni di molluschi cefalopodi e nei crostacei sono piuttosto elevate e possono costituire motivo di preoccupazione nel caso di elevati consumi di prodotti ittici marini, anche se la valutazione tossicologica dovrebbe essere effettuata dopo la determinazione della componente inorganica.

SUMMARY - Arsenic is a naturally occurring element and its levels in foods generally reflect normal accumulation from the environment. The main use of arsenic, in the past, was in the chemical industry and it was widely employed in pharmaceutical, agricultural chemicals, preservatives and related compounds. Arsenic is a persistent poison and the possibility of forward transmission of the element to the human food chain led restrictions in the use of these arsenic compounds. Marine organisms frequently contain arsenic in high concentrations, especially mollusca and crustacea species. Most of the arsenic in marine organisms is in organic form, readily excreted by humans and of low toxicity. The chronic and acute toxicities of arsenic and its compounds are well known and the knowledge of the level of human exposure to arsenic is considered an integral part of the health protection programs of WHO. The data of arsenic analysis in fish products and other food are presented and discussed. Total arsenic concentrations measured in certain samples of cephalopoda mollusca and crustacea are quite high and could be of potential hazard for human health, especially in case of high consumption of sea-food products. Toxicological evaluation should be made after determination of the arsenic inorganic component.

Résumé - L'arsenic est un élément ubiquitaire et les niveaux dans les aliments reflètent la contamination de l'environnement. Dans le passé l'emploi de l'arsenic en pharmacie et dans l'industrie des produits agricoles était plus important qu'aujourd'hui. L'arsenic est un poison persistant qui atteint facilement la chaîne alimentaire humaine de façon qu'on a réduit en suite l'usage de cet élément et de ses composés. La plus part de l'arsenic dans les organismes aquatiques se trouve sous forme organique, rapidement éliminée par l'organisme humain et de conséquence peu toxique. Dans cet travail on présente des résultats analytiques sur l'arsenic total dans des produits alimentaires et surtout produits de la pêche. On constate dans les mollusques et les crustacés que les niveaux sont élevés et peuvent constituer un problème pour de grands consommateurs de ces produits.

Bibliografia

- 1) Reilly C. (1991) Metal Contamination of Food. 2nd ed., Elsevier, Essex, 152-175.
- 2) Michel P. (1987) L'arsenic en milieu marin: synthèse bibliographique. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 49, 175-185.
- 3) MOMPLAISIR G.M., BLAIS J.S., QUINTEIRO M., MARSHALL W. (1991) Determination of Arsenobetaine, Arsenocholine, and Tetramethylarsonium Cations in Seafood and Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography-Thermochemical Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrometry. J. Agric. Food Chem., 39, 1448-1451.
- 4) Phillips D.J.H., Depledge M.H. (1985) Metabolic pathway involving arsenic in marine organism: a unifying hypothesis. Mar. Environ. Res., 17, 1-12.
- 5) Buck W.B. (1978) Toxicity of inorganic and aliphatic organic arsenicals. In: Toxicity of Heavy Metals in the Environment. Ed. Oehme F.W., M. Dekker, New York, 357-369.
- 6) Lucisano A. (1989) Inquinamento da imprenditoria industriale: i metalli pesanti. Atti S.I.S.Vet. XLIII, 85-98.
- 7) Wickstrom G. (1982) Arsenic emission from the Novaky power station. Work Environ. Health, 9, 2-8.
- 8) Fierz U. (1965) Skin cancer and arsenic-containing pharmaceuticals. Dermatol., 131, 41-58.
- 9) MOHRI T., HISANAGA A., ISHINISHI N. (1990) Arsenic intake and excretion by Japanese adults: a 7-day duplicate diet study. Food Chem. Toxic., 28, 7, 521-529.
- 10) Lander H., Hodge P.R., Crisp C.S. (1965) Arsenic levels in hair. J. Forensic Med., 12, 52-67.
- 11) Clarkson T.W. (1993) Molecular and ionic mimicry of toxic metals. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32, 545-571.
- 12) Wettewrhahn-Jennette K. (1981) The role of metals in carcinogenesis. Biochemistry and metabolism environ. Health Perspect, 40, 233-252.
- 13) Kenney L.J., Kaplan J.H. (1988) Arsenate substitutes for phosphate in the human red cells sodium pump and anion exchanger. J. Biol. Chem., 263, 7954-7960.
- 14) De Master E.G., Mitchell R.A.A. (1973) A comparison of arsenate and vanadate as inhibitors or uncouplers of mitochondrial and glycolytic energy metabolism. Biochemistry, 12, 3616-3621.
- 15) Squibb K.S., Fowler B.A. (1983) In: Biological and Environmental Effects of Arsenic. Ed. Elsevier Sci. Publ. Amsterdam.
- 16) Rhian M., Moxon A.L. (1943) Interaction of arsenic and selenium. J. Pharmacol. Exp. Ther., 78, 249-264.
- 17) Chen C.J., Hsueh Y.M., Lai M.S., Shiu M.P., Chen S.Y., Wu M.M., Kuo T.L., Tai T.Y. (1995) Increased prevalence of hypertension and long-term arsenic exposure. Hypertension, 25, 1, 53-60.
- 18) El Bahri L., Bromdane S. (1991) Arsenic poisoning in livestock. Veterinary and Human Toxicology, 33, 3, 259-264.
- 19) Debackere M. (1980) In: Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology. Ed Elsevier Sci. Publ. Co.
- 20) Code Of Federal Regulations (1985) Title 21. Section 120, 192/3/5/6, US Government Printing Service, Washington, DC.
- 21) D.P.R. 24 maggio 1988 n. 236. Attuazione della direttiva CEE n. 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano ai sensi dell'Art. 15 della Legge 16 Aprile 1987 n. 183. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 152 del 30 Giugno 1988.
- 22) D.M. 12 Novembre 1992 n. 542. Regolamento recante i criteri di valutazione delle caratteristiche delle acque minerali naturali. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 8 del 12 Gennaio 1993.
- 23) Borgono J.M., Greiber R. (1972) Trace Substances in Environmental. Health V, ed. Hempill D., Uni. Missouri Press, Columbia, Mo., 13-24.
- 24) Dabeka R.W., McKenzie A.D., Lacroix G.M.A., Cleroux C., Bowe S., Graham R.A., Conacher H.B.S. (1993) Survey of Arsenic in Total Diet Food Composites and Estimation of the Dietary Intake of Arsenic by Canadian Adults and Children. J. AOAC Int., 76, 1, 14-25.
- 25) WORLD HEALTH ORGANISATION EXPERT COMMITTEE (1973) Trace Elements in Human Nutrition. WHO Tech. Rep. Ser. no. 532, 50, Who, Ginevra.
- 26) Codex Alimentarius Commission (1984) Contaminants. Joint FAO/WHO Food Standards Program. Codex Alimentarius, XVII, 1st edn.
- 27) Parisi E., Forneris G., Giaccone V. (1986) L'ittiofauna delle acque dolci come indicatore biologico dell'inquinamento da metalli pesanti. Industrie alimentari, 25, 3, 214-219.
- 28) Weber O. (1985) Metalkonzentrationen in Fischen aus der Rednitz. Lebensm. Unters Forsch., 180, 463-466.
- 29) Saiki M.K., Jennings M.R., May T.W. (1992) Selenium and other elements in fresh water fishes from the irrigated San Joaquin valley, California. The Science of the Total Environment, 126, 109-137.
- 30) Sigovini G., Chizzolini R., Cannizzaro C., Antonetti P. (1988) Relazione tra mercurio ed alcuni oligoelementi nel pescato del golfo di Trieste. Atti S.I.S.Vet XLII, 431-434.
- 31) Meloni S., Oddone M., Bondavalli C., Nonnis Marzano F., Triulzi C. (1995) Distribuzione di micro e macroelementi in matrici biotiche e abiotiche della Sacca di Goro rilevata mediante analisi per attivazione neutronica. Atti Convegno Metodologie radiochimiche e radiometriche in radioprotezione, Urbino 20-22 Giugno 1995.
- 32) Navarro M., Lopez H., Lopez M.C., Sanchez M. (1992) Determination of arsenic in fish by hydride generation atomic absorption spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 16, 3, 169-171.
- 33) Luzzana U., Serrini G., Maggi G.L., Polidori P. (1993) Il consumo di prodotti ittici in Italia: fonti di approvvigionamento e filiera di mercato. Veterinaria Italiana, XXIX, 8, 43-48.
- 34) Whyte J.N.C., Boutilier J.A. (1991) Concentrations of Inorganic Elements and Fatty Acids in Geographic Populations of the Spot Prawn *Pandalus platyceros*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48, 382-390.
- 35) Attar K.M., El Faer M.Z., Raddah T.N., Tawabini B.S. (1992) Marine Pollution Bulletin, 23, 2, 94-97.
- 36) Gasparre G., De Natale G., Busco V.P., Piracci L., Palermo D. (1994) Accumulo di metalli pesanti e composti organoclorurati in *Mullus barbatus*. Atti S.I.S.Vet. 1994, 881-885.
- 37) Forshner E., Wolf H.O. (1979) Fremdstoffuntersuchung an gezielten Proben Monitoring im Rahmen des Verbraucherschutzes. Fleischwirtschaft, 59, 6, 872-878.

- 38) Jorhem L., Slorach S., Sundstrom B., Ohlin B. (1991) Lead, cadmium, arsenic and mercury in meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle in 1984-88. *Food Additives and Contaminant.*, 2, 201-212.
- 39) ZMUDZKI J., JUSZKIEWICZ T., SZKODA J. (1992) Pierwiastki sladowe w tkankach swin w Polsce. *Medycyna Wet.*, 48, 8, 353-355.
- 40) MAGGI E., CAMPANINI G., BRACCHI P.G., BAGNOLI R. (1975) Determinazione dell'arsenico in alcuni prodotti di origine animale. *Atti S.I.S.Vet.*, XXIX, 577-580.
- 41) SALISBURY D.C., CHAN W., SACHENBRECKER P.W. (1991) Multielement concentrations in liver and kidney tissues from five species of Canadian slaughter animals. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 74, 4, 587-591.
- 42) Slekovec M., Irgolic K.J. (1996) Uptake of arsenic by mushrooms from soil. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 8, 3/4, 67-73.
- 43) Byrne A.R., Tusek-Znidaric M. (1983) Arsenic accumulation in the mushroom *Laccaria amethystina*. *Chemosphere*, 12, 1113-1117.
- 44) Poluzzi V., ballotti E., ascanelli m., mazzoli a., cavalchi B., TRENTINI P., COCCHI L, VESCOVI L. (1997) determinazione di metalli pesanti e isotopi radioattivi in alcune specie fungine prelevate nell'alto appennino reggiano. *Boll. Chim. Igien.*, 48, 121-126.

VALUTAZIONI MICROBIOLOGICHE DI CARNI BOVINE E SUINE MACINATE

Pizzin.G.¹, Bentley S. ¹, Maggi E. ¹

(¹) Istituto di Ispezione degli Alimenti di origine animale Facoltà di Medicina Veterinaria-Università degli Studi di Parma

Introduzione

Le carni macinate costituiscono una produzione fortemente richiesta da parte del consumatore, sia a livello della grande che della piccola distribuzione. Esse infatti rientrano nel novero dei cosiddetti prodotti di servizio o "convenience foods", costituiti da derrate che sono già andate incontro ad una prima lavorazione, ai fini di velocizzare la successiva preparazione per il consumo. I costi generalmente contenuti, la particolare cedevolezza alla masticazione, nonché la versatilità per preparazioni differenziate costituiscono altri fattori di attrazione per il consumatore.

A livello della ristorazione collettiva, inoltre, grazie alla possibilità di sfruttare tagli sottoutilizzati, in special modo del quarto anteriore, le carni macinate con le relative pietanze da queste ottenute sono oramai divenute parte integrante dei menù giornalieri.

A questa aumentata domanda da parte del mercato, connessa alla diffusa richiesta di un prodotto che possieda buone caratteristiche qualitative, la difficoltà di garantire sempre controlli accurati per quanto riguarda gli aspetti igienico-sanitari. Si tratta infatti di un alimento dotato di numerosi fattori intrinseci di rischio, ascrivibili sia alle particolari caratteristiche fisiche della derrata, che rappresentano una condizione per lo sviluppo di svariati micro-organismi, sia al tipo di lavorazione, che consente un' uniforme dispersione degli eventuali contaminanti nel prodotto. Noti sono inoltre i pericoli di contaminazioni crociate derivanti dall'utilizzo di attrezzature in non perfette condizioni igieniche (Tiecco, 1972).

Il rischio di contaminazione riguarda sia i batteri potenzialmente patogeni, sia quelle specie microbiche che possono rappresentare un utile indice per determinare l'igiene di lavorazione sia, infine, i batteri alteranti. Nonostante la normativa corrente riservi un capitolo particolare, come è ovvio, al controllo dei primi, appare di non secondaria importanza fare chiarezza anche in merito alle analisi microbiologiche implementabili per valutare gli altri aspetti, in particolare la valutazione del livello igienico.

Con la sempre maggiore responsabilizzazione dei produttori, conseguenza diretta dell'emanazione dei provvedimenti legislativi orientati ad estendere la disciplina dell'autocontrollo, diviene evidente la necessità di inquadrare, da un punto di vista microbiologico, tanto le materie prime quanto l'alimento pronto per il consumo. Basta in tal senso ricordare l'art.5, comma 3 del D.Lgs. 26/5/97, n°155, che così recita: "Al fine di determinare il rischio per la salubrità e la sicurezza dei prodotti alimentari, si tiene conto del tipo di prodotto, del modo in cui è stato trattato e confezionato, e di qualsiasi altra operazione cui esso è sottoposto prima della vendita o della fornitura , compresa la somministrazione al consumatore, nonché delle condizioni in cui è esposto o in cui è immagazzinato".

Aspetti normativi

La produzione e l'immissione sul mercato delle carni macinate è attualmente disciplinata dal D.P.R. 3/8/1998, n. 309, recepimento della Direttiva CEE 94/65, la cui emanazione ha contestualmente determinato l'abrogazione del D.P.R. n. 227 risalente al 1992. Se dal punto di vista dei requisiti termici richiesti poco o nulla appare mutato, il predetto disposto legislativo puntualizza, ed in alcuni casi corregge, i criteri microbiologici che le carni macinate devono soddisfare per essere ammesse al commercio in ambito comunitario, come è evidenziato dalla tabella che segue, tratta dall'Allegato II, punto II:

	M	m
Germi Aerobi Mesofili	$5 \times 10^6/g$	$5 \times 10^5/g$
Colibacilli «Escherichia coli»	$5 \times 10^4/g$	50/g
Salmonelle	assenza in 10 g	
Stafilococchi aurei	$10^3/g$	$10^2/g$

Appare infatti chiara l'esclusione di germi un tempo considerati come test di inquinamento fecale, quali i clostridi solfito-riduttori, e di converso appare cardinale l'interesse per i cosiddetti batteri potenzialmente patogeni (viene ad esempio specificato che devono essere ricercati gli stafilococchi aurei); il legislatore concentra quindi la propria attenzione sugli aspetti prettamente sanitari, rinviando la valutazione quantitativa degli indici di contaminazione alle GMP stabilite in sede di autocontrollo.

Materiali e metodi

Oggetto della ricerca sono state le carni macinate e gli hamburgers costituiti esclusivamente da carne bovina (76 campioni) o suina (24 campioni).

Le tipologie commerciali erano riferibili sia a prodotti preconfezionati in vassoi (in laboratori annessi all'esercizio di vendita), che a preparazioni pre allestite ed estemporanee e il prelievo è stato condotto sia a livello di grande distribuzione, che nelle macellerie. Essendo questi esercizi notoriamente esclusi dalla vigente normativa sulle carni macinate, si è comunque ritenuto opportuno fornire un quadro igienico-sanitario, in vista della definizione dei piani di autocontrollo a questo livello della filiera carne.

Al fine di determinare il profilo microbiologico del prodotto, abbiamo ritenuto di soffermarci sia su batteri indice che su batteri indicatori. Con il primo termine, come è noto (Mossel, 1982), si intendono quei micro-organismi che da un punto di vista ecologico e fisiologico possono coesistere con i patogeni, e dalla cui presenza si può pertanto far discendere la presunzione di un vero e proprio rischio sanitario; i batteri indicatori, al contrario, rappresentano una spia delle condizioni igieniche di produzione e lavorazione, che in questa tipologia di prodotto rappresentano il punto nodale.

L'indagine sul prodotto finito è stata accompagnata da necessarie annotazioni preliminari relative alla categoria di esercizio commerciale, per valutare eventuali differenze, nonché dalla valutazione della temperatura del prodotto al momento della vendita, al fine di verificare possibili situazioni di non corretta conservazione. Il reperimento dei campioni è stato effettuato per il 50% nel periodo estivo e per il restante 50% nel periodo autunnale, con prelievi effettuati nella prima mattinata (tra le nove e le dieci) nei punti vendita di Parma. Le unità sono state campionate in doppio per consentire l'effettuazione immediata del rilievo termico senza peraltro pregiudicare l'integrità della confezione destinata al controllo microbiologico; detto rilievo è stato eseguito con un termometro portatile a sonda metallica. I campioni sono stati posti in appositi contenitori termostatici ad una temperatura di circa 4°C e trasportati con tempestività al laboratorio, per le indagini microbiologiche stabilite nel protocollo di lavoro.

Preparazione del campione

Il prelievo, condotto su un'aliquota di 25 gr., è avvenuto in asepsi con pinze e forbici sterili sotto cappa a flusso laminare.

E' stata poi allestita una diluizione madre 1:5 in soluzione di Ringer sterile, omogeneizzata per 2 minuti in Stomacher, dalla quale sono state effettuate successive diluizioni scalari 1:10: il campione così ottenuto è stato utilizzato per le indagini.

Le analisi condotte sui campioni sono state le seguenti:

1. Conta Mesofila Totale, mediante l'utilizzo di terreno di coltura Plate Count Agar (Oxoid), incubato a 30°C per 48 ore;
2. Coliformi fecali, con l'impiego di terreno Violet Red Bile Agar (Oxoid), mantenuto a 44°C per 24 ore;
3. Clostridi solfito riduttori, determinati previa incubazione in Shahidi Ferguson Plate Agar (Difco) a 37°C per 48 ore, condotta in anaerobiosi con l'impiego di giare (Anaerobar - Oxoid)
4. Streptococchi fecali, mediante coltura in Kanamycin-Aesculin Agar (Merck) a 37° per 48 ore;

Risultati e discussione

Valutazione della temperatura al momento della vendita.

I risultati analitici vengono riportati nella tabella n° 1.

Tabella 1 - Distribuzione dei campioni per classi di temperatura e per tipologia di esercizio commerciale

Classi termiche	4-6°C		6-8°C		8-10°C		>10°C	
	GD	M	GD	M	GD	M	GD	M
N° campioni per tipologia commerciale	2	1	14	7	23	3	40	10

GD= Grande Distribuzione; M= Macellerie

Il primo elemento degno di attenzione è senza dubbio rappresentato dal riscontro di temperature costantemente piuttosto elevate, sia se prendiamo come riferimento la normativa di più recente emanazione (D.P.R. 309/98), sia l'abrogato D.L.227/92. Ricordiamo infatti che per l'immissione sul mercato di carni macinate in stato di refrigerazione il limite è attualmente di 2°C, una soglia volutamente restrittiva, in considerazione della estrema deperibilità di tale derrata. Alcuni Autori (Amerio et al., 1996) individuano una soglia limite di 7°C, pur citando la Circolare A. C.I.S. n°22 del 23/ 2/ 1957 che raccomanda la conservazione di tale alimento a 8-10°C negli esercizi di vendita.

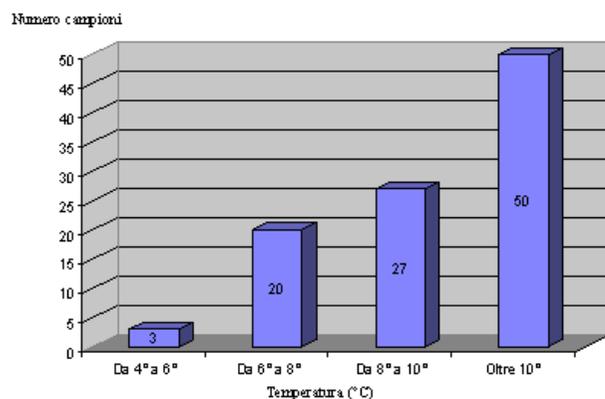
L'analisi dei dati sulla temperatura, ottenuti nella presente indagine, ci porta a rilevare che solo il 3% dei campioni presentava una temperatura oscillante da 4 a 6°C, livello termico che potrebbe essere accettato nella commercializzazione.

Nella classe di temperatura da 6° a 8°C, che può permettere ancora una sufficiente conservabilità di questa tipologia di prodotto, troviamo circa il 20% dei campioni; è bene tuttavia ricordare che tale temperatura viene considerata da molti autori (ICMSF, 1980; De Felip et al.; 1991) come soglia per la crescita di numerosi batteri e che quindi già la classe termica successiva, tra 8 e 10°C, comprendente 27 campioni, pur sempre nei limiti della summenzionata circolare, è da ritenersi invece pregiudizievole alla conservazione della derrata qualora questa perduri per oltre 24 ore prima del consumo (raccomandazione peraltro già contenuta nella stessa disposizione legislativa).

La conservazione a tale temperatura potrebbe di fatto vanificare le buone pratiche di lavorazione adottate fino a quel momento e pertanto può costituire un vero e proprio punto critico.

Vi è tuttavia una consistente percentuale, pari al 50% del totale, di campioni mantenuti a temperature a cuore superiori a 10°C, con punte di oltre 15°C, come riportato nel grafico n°1; in questi casi, le condizioni sono tali da favorire l'incremento delle popolazioni batteriche. Si tratta quindi di osservazioni che coincidono con quanto rilevato da altri autori in Emilia Romagna (Amerio et al., 1996) relativamente ai gradi di non conformità. Analizzando la quota di campioni mantenuti oltre i 10°C, risulta interessante evidenziare come questi rappresentino circa il 51% del totale di quelli prelevati presso la grande distribuzione ed il 48% di quelli ottenuti a livello di macellerie; percentuali quindi sovrapponibili, nonostante la diversa tipologia e le caratteristiche strutturali.

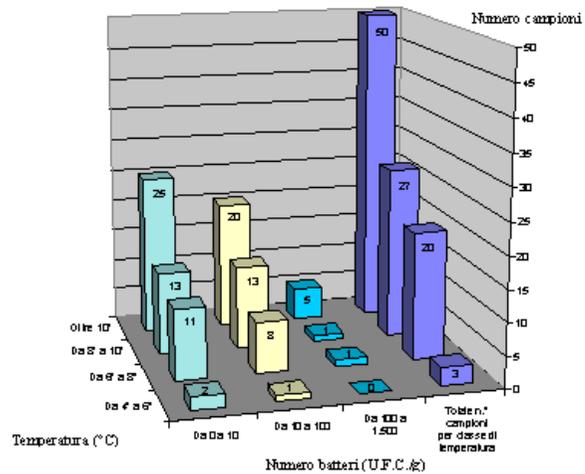
Grafico 1 - Distribuzione dei campioni in base alle classi di temperatura



Conta mesofila totale

Nel grafico n.2 vengono riportati i valori relativi a questa ricerca.

Grafico 2 - Distribuzione dei valori di Contia Mesofila Totale (C.M.T.) per classi di temperatura (U.F.C./g)



Per quanto riguarda la CMT, va ricordato che in questa tipologia di alimento esiste una generale uniformità dei dati analitici; il riscontro infatti di cariche microbiche comprese tra 105 e 107 UFC/g è sempre stato considerata un'evenienza comune (Marino et al., 1995; Jay, 1996;), tanto da venire citato come limite in documenti dell'International Committee for the Microbiological Specifications of Foods (ICMSF, 1986). Per quanto riguarda la nostra indagine, l'aver condotto l'analisi su una singola unità di vendita ci ha in certo qual modo obbligato a considerare come livello soglia quello meno restrittivo individuato dalla normativa vigente, ossia 5.106 UFC/g. E' tuttavia da notare che livelli di CMT dell'ordine di 1.106, pur così comuni, configurano comunque già una situazione "borderline", tanto da costituire il limite di molti capitolati d'acquisto per la ristorazione collettiva (Ballabio et al., 1997).

Dall'analisi delle osservazioni da noi condotte, emerge la diversa incidenza delle non conformità a seconda della tipologia di esercizio commerciale; mentre infatti a livello di piccola distribuzione si osservava un 10% di campioni con cariche superiori al limite considerato, tale percentuale si elevava al 46% per la grande distribuzione. Tale dato potrebbe essere ascrivibile alla diversa metodica di preparazione osservata a livello della seconda, facilmente caratterizzata da maggiori manualità e soprattutto dai tempi morti che intercorrono tra la lavorazione, usualmente di elevate quantità di prodotto, ed i successivi steps di confezionamento e di vendita, mentre negli esercizi al dettaglio è frequente la preparazione estemporanea, su richiesta del cliente.

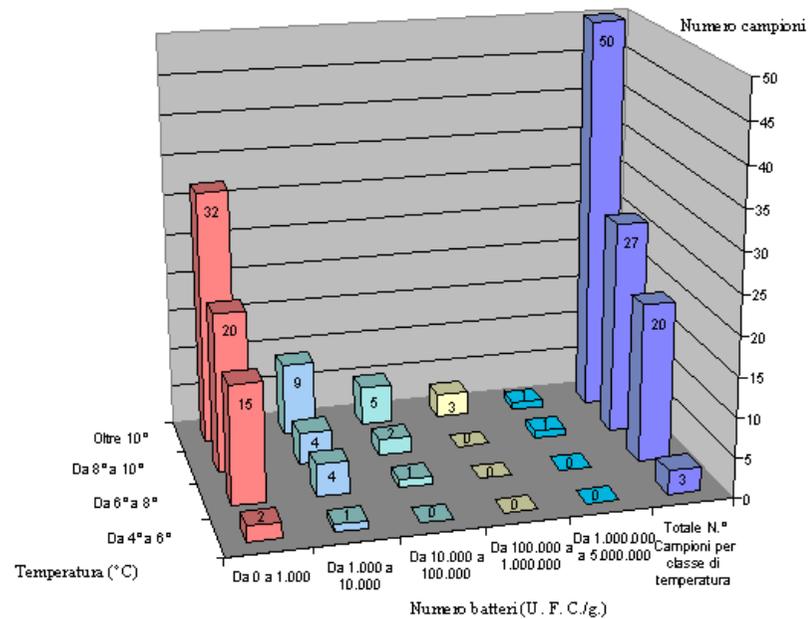
Come evidenziato dal grafico n°2, è notevole la correlazione tra le temperature di vendita elevate ed il numero di campioni per ciascuna classe di valori considerata.

Il confronto con i dati emersi dalla contemporanea ricerca di batteri potenzialmente patogeni, (Bonardi et al., 1998), ha permesso di evidenziare una scarsa correlazione tra questi ultimi e i livelli di contaminazione in Aerobi Mesofili, che accredita, una volta di più, la tesi secondo la quale la CMT non costituisca un esclusivo indice predittivo (Holland, 1979). Per quanto riguarda il confronto tra i due tipi di carne bovina e suina, inoltre non sono state rilevate sostanziali differenze per questa classe di batteri come per gli altri presi in esami.

Coliformi fecali

I dati riguardanti questa specifica indagine sono riportati nel grafico n°3.

Grafico 3 - Distribuzione dei valori di Coliformi fecali per classi di temperatura (U.F.C./g)

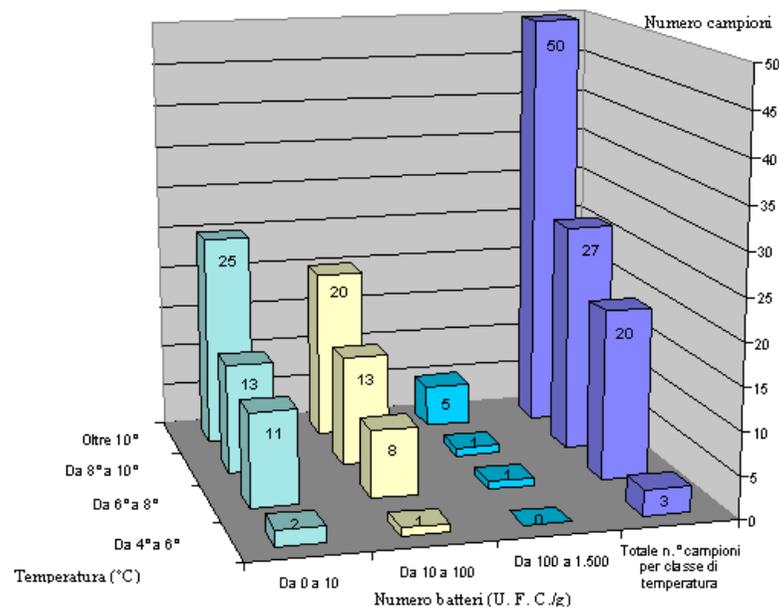


Per quanto attiene ai coliformi fecali, usualmente ritenuti indicatori di igiene della lavorazione, la legislazione attuale non esprime alcun livello soglia, e l'unico riferimento ufficiale consiste nella nota esplicativa del Ministero della Sanità (prot. n.703/99.64/1405 del 24/10/1985) che riporta un limite indicativo di 103 UFC/g in questa tipologia di alimento. Nella nostra indagine sono stati raggiunti livelli talvolta molto significativi, con punte di oltre 2.106 in un campione commercializzato a 15°C e reperito nella grande distribuzione, ma livelli superiori alla soglia (1.000 UFC/g) riportata da altri Autori (Kramer e Cantoni, 1994), sono stati registrati in ben il 23,8% dei campioni reperiti negli esercizi di vendita al dettaglio e nel 33% di quelli prelevati nella grande distribuzione. Un dato interessante è la correlazione tra le non conformità di tali valori e la stagione del prelievo; infatti, nel campionamento effettuato nel periodo estivo abbiamo registrato valori significativamente più elevati rispetto a quelli ottenuti nella stagione autunnale, molto probabilmente da ascrivere proprio alla temperatura esistente nei locali di preparazione.

Clostridi Solfito-riduttori

I dati analitici relativi ai Clostridi Solfito-riduttori sono riportati nel grafico n°4.

Grafico 4 - Distribuzione dei valori di Clostridi Solfito-riduttori per classi di temperatura (in U.F.C./g)



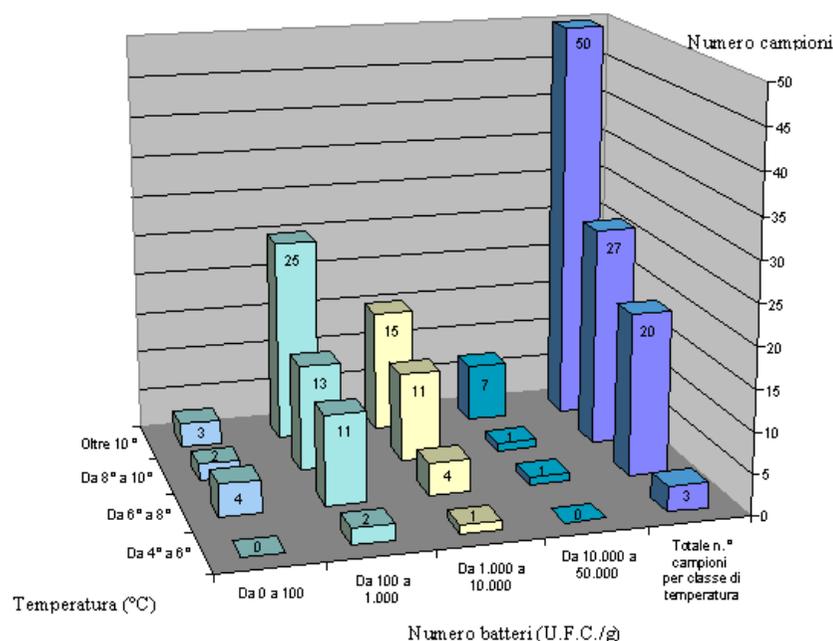
Con l'emanazione della normativa precedentemente citata (D.P.R. n.309/98), gli anaerobi solfito-riduttori sono stati esclusi dal novero dei batteri per i quali, a livello di controllo, siano stati fissati specifici limiti; come riportato da Censi e Maggi (1992), tuttavia, tali batteri possono essere utili nella valutazione del livello di igiene delle lavorazioni.

E' significativo rilevare che i valori più elevati sono sempre stati registrati a livello della grande distribuzione, con punte di 1.300 UFC/g, mentre il valore massimo fatto registrare in sede di macelleria si attestava su valori di 175 U.F.G./g.

Streptococchi fecali

Nel grafico 5 vengono schematizzati i risultati analitici ottenuti per questi microrganismi.

Grafico 5 - Distribuzione dei valori di Streptococchi fecali per classi di temperatura (in U.F.C./g)



Per questa categoria di batteri, attualmente non vengono fissati limiti dalla normativa; per le carni fresche Piccininno (1982) consiglia un limite di 100 UFC/g e riporta, per le carni tritate, analogo limite citato da Wehr (1978) per gli Stati Uniti. In passato gli streptococchi fecali sono stati più volte inclusi nel novero degli indicatori di contaminazione fecale, anche per quanto riguarda l'igiene della carne, mentre il loro ruolo come batteri potenzialmente patogeni rimane controverso. A fronte del rapporto FAO/OMS del 1976, che ne esclude la attività patogena, Mossel (1982) rimarca la correlazione tra Streptococchi fecali e livelli elevati di ammine pressorie negli alimenti: attualmente, tuttavia, la loro importanza è maggiormente individuabile come microrganismi test di igiene delle lavorazioni.

I nostri rilievi a tal riguardo permettono di evidenziare livelli di contaminazione sostanzialmente più elevati rispetto ad altre indagini (Poeta et al., 1993; Marino et al., 1995), come evidenziato dal grafico n.5. Infatti si nota come ben il 40% dei campioni presenti cariche microbiche superiori a 103 UFC/g, e di questi il 9% si situa oltre livelli di 104, con punte di 47.500 UFC/g. Appare anche qui chiara, come nelle altre specie microbiche considerate, la stretta correlazione tra la temperatura e la distribuzione delle frequenze.

Conclusioni

Nei confronti della derrata alimentare presa in esame, grande è l'attenzione della comunità scientifica e degli organi legislativi; non è un caso se, in tempi recenti (2 Dicembre 1997), la Food and Drug Administration ne ha autorizzato l'irraggiamento, per contenerne i rischi microbiologici, nonché come integrazione alle corrette pratiche di lavorazione.

In attesa di un analogo pronunciamento da parte delle Autorità comunitarie, la valutazione complessiva del profilo microbiologico dell'alimento esaminato ci porta a non escludere situazioni "a rischio".

Per quanto concerne la valutazione della Carica Mesofila Totale, si puntualizza la portata dell'elevata percentuale di campioni (circa il 40%) risultati non conformi secondo la normativa vigente; si sottolinea che questa, pur non essendo applicabile alle tipologie di esercizi commerciali da noi presi in esame, rappresenta comunque un utile riferimento ai fini di una valutazione globale delle caratteristiche igieniche del prodotto.

Resta inoltre il riscontro della saltuaria presenza di cariche elevate per quanto attiene i coliformi fecali e, in misura minore, gli streptococchi fecali, dati che rimangono da approfondire per il

significato che possono assumere sia relativamente alle condizioni igieniche di produzione, sia come indicatori di non idonee condizioni termiche al momento della vendita al dettaglio. Proprio nel riscontro della correlazione tra le temperature alla vendita e l'elevato carico microbico si trova a nostro avviso il dato di maggiore interesse, già evidenziato da precedenti indagini condotte sempre su carni macinate dalle quali era emersa una significativa percentuale di non conformità (Bonardi et al., 1996). Tale ulteriore riscontro richiama l'attenzione, una volta di più, sulla necessità del rigoroso rispetto della catena del freddo, condizione che risulta indispensabile attuare anche nei locali di confezionamento per la vendita ai fini di poter contenere il rischio microbiologico.

Relativamente alla valutazione complessiva, riferita alle tipologie di esercizio commerciale, i nostri risultati differiscono leggermente da quelli di altri Autori (Bianchi et al, 1998), che visualizzano un quadro igienico-sanitario migliore a livello di grande distribuzione rispetto alle macellerie; la nostra indagine sembra invece rilevare nella moderna "bottega delle carni" condizioni abbastanza soddisfacenti, tali da far presupporre un corretto management ed il sostanziale rispetto delle buone pratiche di lavorazione.

Parole-chiave: Carne macinata, igiene, indagine, microbiologia.

Keywords: Ground meat, hygiene, microbiology, survey

Mots-clé: Viande hachée, microbiologie, recherche, hygiène.

Riassunto. Allo scopo di fornire un profilo delle condizioni igieniche delle carni macinate, gli Autori hanno effettuato un'indagine sul mercato locale, sia a livello di grande distribuzione che nelle macellerie. I risultati microbiologici, pur soddisfacenti, delineano la necessità di controlli accurati, specialmente per quanto riguarda le temperature in fase di distribuzione.

Summary. The authors have carried out a microbiological survey on ground meat sold in local retail markets (large-scale retail trade and butcher's shops), in order to trace an outline of the hygienic conditions of this product. The results of the investigation are satisfying, even though the Authors point out the need for accurate control in regard of the temperatures at salespoints.

Résumé. En vue de donner un aperçu des conditions hygiéniques de la viande hachée, les auteurs ont organisé une recherche sur le marché local, soit au niveau de boucherie, soit au niveau des grandes chaînes de distribution. Les résultats microbiologiques, même si satisfaisants, ont définie la nécessité de conduire des soigneuses contrôles, surtout à l'égard des températures au moment de la distribution.

BIBLIOGRAFIA

- Amerio G., Angelelli S., Di Falco G. (1996): Carni bovine trite - Condizioni igienico-sanitarie ed annuario-commerciali nella grande distribuzione. Obiettivi e Documenti Veterinari, 9, 79-86.
- Ballabio L., Leoni S., Mariggi F. (1997): Limiti microbiologici e riferimenti normativi. Industrie Alimentari, Marzo, 353-356.
- Bianchi E., Alessandrini A., Bruschi R. (1998): Indagini sulle condizioni igieniche di carne macinata del commercio. Industrie Alimentari, 371, 726-731. Bonardi S., Bentley S., Bottarelli A. (1996): Indagini microbiologiche di carni macinate. Atti VI Conv. Naz. A.I.V.I. "Ispezione degli alimenti alle soglie del terzo millennio", Tirrenia (PI), 24-25 Maggio 1996, 309-314.
- Bonardi S., Bottarelli A., Fusaro S., Signorini F. (1998): Ricerca di *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* ed *Escherichia coli O157:H7* in carni macinate bovine e suine. Atti S.I.S.Vet., Vol. 52, 375-376.
- Censi A., Maggi E. (1992): Clostridi solfito-riduttori in prodotti di salumeria freschi, stagionati e cotti. Atti S.I.S.Vet, Volume XLVI, 707-710.
- Circolare della Presidenza del Consiglio dei Ministri (Alto Commissariato per l'Igiene e la Sanità pubblica) 25 Febbraio 1957, n. 22- Disciplina della vendita della carne trita negli spacci.
- De Felip G. e coll. (1991): Igiene e microbiologia alimentare. Ed. S.E.F., Milano, p.30.
- D.Lgs. 26/5/1997, n°155, in Suppl. Ord. alla G.U.n.136 del 13/6/1997.
- Holland, G.C. (1979): Quality standards for retail meats. J. Food Prot., 42, 675-678.
- ICMSF (1980): Microorganisms in foods. 3. Microbial Ecology of Foods. Vol.1, Factors affecting life and death of microorganisms. Academic Press, New York. 2nd Edition. p. 152.
- ICMSF (1986): Microorganisms in foods. 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications. 2nd Edition. University of Toronto Press, p.133.
- Jay J.M. (1996): Microorganisms in fresh ground meats: the Relative Safety of Products with Low Versus High Numbers. Meat Science, 43, S, 59-66.
- Kramer J. e Cantoni C. (1994): Alimenti, microbiologia e igiene. Ed. OEMF, Milano.
- Marino M., Duratti G., D'Aubert S., Comi G. (1995): Qualità microbiologica di prodotti a base di carne macinate di diverse specie animali. Ingegneria alimentare, 3, 21-26.
- Mossel, D. (1982), in: Microbiology of foods, 3rd. Edition .
- Nota Min. San. , prot. n.703/99.64/1405 del 24/10/1985.
- O.M.S. (1976): Série de rapports techniques n.598. Aspects microbiologiques de l'hygiène des denrées alimentaires.
- Piccinino G. (1982) Significato della carica batterica e degli indici di contaminazione nell' esame batteriologico delle carni fresche e conservate. Riv. Zoot.Vet., Vol.10, n°2, 107-113.
- Poeta A., Possidente R., Giaccone V. (1993): Indagine sull'inquinamento microbiologico di carni fresche e utensili in macelleria. Industrie Alimentari, Dicembre, 1200-1211.
- Tiecco G. (1972): Indagini batteriologiche sulle carni tritate in vendita sul territorio nazionale. Arch. Vet. It., 23, 137-144.
- Wehr H.M. (1978): Attitudes and policies of state governments. Food Technology, Vol. 32(1), 63.

ISOLAMENTO DI SALMONELLA GIVE DA PRODOTTI AVICOLI

Bonardi S., Pizzin G.

*Istituto di Ispezione degli Alimenti di origine
animale, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Parma*

Introduzione

Il rischio di contaminazione dei prodotti avicoli da parte di *Salmonella* spp. è noto alla comunità scientifica internazionale e, in proposito, il Consiglio della Comunità Europea ha emanato la Direttiva 92/117/CEE "riguardante le misure di protezione dalle zoonosi specifiche e la lotta contro agenti zoonotici specifici negli animali e nei prodotti di origine animale allo scopo di evitare focolai di infezioni e intossicazioni alimentari" in cui si sottolinea l'importanza del consumo di prodotti avicoli per quanto riguarda le tossinfezioni umane sostenute da *Salmonella* spp. e si impone l'adozione, da parte dei singoli Paesi membri, di appositi piani nazionali di sorveglianza per le infezioni salmonellari nel pollame da riproduzione e per il controllo della contaminazione da *Salmonella* spp. nei mangimi composti per pollame. Ad integrazione della Direttiva 92/117/CEE, la successiva Direttiva 97/22/CE precisa il futuro orientamento della Commissione europea, relativo all'istituzione di piani di sorveglianza delle infezioni salmonellari anche nelle galline ovaiole.

Il piano di sorveglianza nel pollame da riproduzione proposto dalla Direttiva 92/117/CEE è finalizzato, in particolare, al controllo delle infezioni sostenute da S.

typhimurium e *S. enteritidis* e prevede il controllo dei pulcini di un giorno, dei volatili di 4 settimane, delle pollastre 2 settimane prima dell'entrata in ovodeposizione e degli adulti in riproduzione. La ricerca di *Salmonella* spp. va effettuata nel rispetto delle norme standardizzate ISO 6579, 3a edizione, del 1993. All'isolamento di *S. typhimurium* e *S. enteritidis* consegue l'applicazione di severe misure di contenimento dell'infezione, quali la distruzione delle uova incubate e non incubate e la macellazione obbligatoria dei volatili. Nel nostro Paese l'orientamento comunitario è stato in gran parte seguito nel Decreto Ministeriale 10 marzo 1997 ("Programma di controllo per le *S. enteritidis* e *S. typhimurium* negli allevamenti di galline ovaiole destinate alla produzione di uova da consumo") istitutivo di un piano volontario di controllo.

I sierotipi *S. enteritidis* e *S. typhimurium* sono considerati ubiquitari e non specifici per il pollo, a differenza di *S. gallinarum* e *S. pullorum* (Humbert, 1992). In Italia, come in altri Paesi, *S. typhimurium* rappresenta attualmente il sierotipo più frequentemente isolato da diverse matrici alimentari e animali (Tauxe, 1991; Soldati et al., 1997; Boni, 1998), mentre *S. enteritidis* si isola soprattutto da uova e prodotti alimentari contenenti uova (Tauxe, 1991; Magliani et al., 1992; Bean et al., 1996; Cantoni, 1998).

Diversamente da quanto potrebbero far pensare i dati relativi ai sierotipi di salmonelle più diffusi nella filiera avicola, la nostra esperienza apporta un contributo che si discosta dalle statistiche attuali e richiama l'attenzione su *S. give* per la quale sono ancora scarse le informazioni relative all'epidemiologia ed alle caratteristiche patogenetiche.

Materiali e metodi

Nel periodo Maggio - Ottobre 1996, 22 campioni di prodotti a base di carne preparati con carni avicole sono stati sottoposti ad analisi microbiologica, finalizzata alla ricerca di *Salmonella* spp., presso l'Istituto di Ispezione degli Alimenti di origine animale. I campioni, rappresentati da 5 wuerstel di pollo, 5 wuerstel di pollo e tacchino, 2 salsicce di pollo, 3 salsicce di tacchino, 1 salsiccia di pollo e tacchino, 1 salsiccia di pollo, tacchino e suino, 1 salsiccia di pollo e suino, 2 salsicce di tacchino e suino e 2 salami di tacchino, sono stati acquistati a Parma presso centri della piccola e grande distribuzione.

In seguito, nel mese di Luglio 1998, è stata sottoposta ad analisi la parte rimanente di una confezione di petti di pollo, acquistata presso un centro della grande distribuzione di Modena da un privato per il proprio consumo. I petti di pollo, venduti allo stato refrigerato ma conservati in confezione originale nel congelatore domestico, erano stati casualmente somministrati dall'acquirente ai propri animali (3 cani e 2 gatti), dopo scongelamento rapido in forno a microonde e senza ulteriore trattamento termico di cottura. A distanza di 24 circa ore dal pasto tutti gli animali hanno presentato febbre, vomito e diarrea; in seguito all'aggravarsi dei sintomi un gatto adulto è deceduto nell'arco delle successive 48 ore.

La ricerca di *Salmonella* spp. è stata eseguita nel rispetto delle norme ISO 6579, 3a edizione, del 1993. Al prearricchimento di 25 grammi del campione in BPW (Buffered Peptoned Water, Oxoid) effettuato a 37°C per 20 ore, ha fatto seguito l'arricchimento selettivo di 1 ml della brodocoltura in 10 ml di brodo Selenito Cistina (Oxoid), incubato a 37° C per 24 ore, e di 0,1 ml della brodocoltura in 10 ml di brodo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid), incubato a 42° C per 24 ore. La piastratura delle colture di arricchimento si

è eseguita su Brilliant Green Agar (Oxoid), Hektoen Enteric Agar (Oxoid) e XLT4 agar (Remel) incubati a 37° C per 24 ore. Le colonie sospette sono state seminate su TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid) e, dopo incubazione a 37° C per 24 ore, sottoposte all'agglutinazione rapida con siero poliagglutinante anti-salmonella (Sclavo) ed alle prove biochimiche per l'identificazione del genere *Salmonella* mediante l'impiego del kit API 20 E (bioMérieux). Dopo l'identificazione del genere, i ceppi batterici sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, sede di Brescia, per la successiva conferma sierologica e l'identificazione di specie.

Risultati

Dei 22 prodotti a base di carne preparati con carni avicole, solo un campione (4,5%) è risultato contaminato da *Salmonella* spp. Si tratta di una salsiccia di pollo, tacchino e suino, confezionata in atmosfera modificata, dalla quale si è isolata *S. give* (gruppo E1 ; formula antigenica 3,10 : I, v : 1,7). Lo stesso sierotipo di salmonella è stato isolato anche dai petti di pollo commercializzati allo stato refrigerato, confezionati in involucro protettivo e congelati in fase successiva alla vendita.

Discussione e conclusioni

L'isolamento di *S. give* da prodotti alimentari ha attirato la nostra attenzione soprattutto per la scarsità di dati relativi alla sua distribuzione in natura.

In Italia 10 ceppi di *S. give* sono stati isolati da Pacini et al. (1994) da 207.913 coproculture di portatori sani nel corso di uno studio epidemiologico portato a compimento nel decennio 1984 - 1993 in provincia di Livorno. Da quest'indagine l'1,15% dei soggetti (2400

su 207.913) è risultato portatore di salmonelle e *S. enteritidis* è risultato il sierotipo più diffuso (346 isolamenti su 2400, pari al 14,4%), seguito da *S. infantis* (327 isolamenti, pari al 13,6%) e da *S. typhimurium* (295 isolamenti, pari al 12,3%). La percentuale di isolamento di *S. give*, sul totale degli stipiti di *Salmonella* spp., è risultata pari allo 0.4%.

Un'altra indagine eseguita da Fortin et al. (1993) nel triennio 1989 - 1991 su acque superficiali, coproculture e vari alimenti nella provincia di Rovigo ha anch'essa portato all'isolamento di 2 stipiti di *S. give*; tale isolamento è stato effettuato nell'anno 1991 a partire da coproculture o da acque superficiali, in quanto gli Autori si sono limitati ad indicare la fonte di isolamento solo per le salmonelle contaminanti i prodotti alimentari. Il sierotipo riscontrato di più frequente è risultato *S. typhimurium*, seguito da *S. enteritidis* e *S. infantis*.

L'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia, sede di Modena, ha recentemente isolato 3 ceppi di *S. give* da prodotti di salumeria, con una frequenza di isolamento dello 0,8% rispetto agli altri sierotipi di salmonelle riscontrati in diverse matrici di origine alimentare, ambientale ed animale (Soldati et al., 1997). Anche da questi dati emerge la netta prevalenza di *S. typhimurium*, isolata dal 22,3% dei campioni positivi per *Salmonella* spp.

Alcune segnalazioni sull'isolamento di *S. give* riguardano anche diverse specie animali. Dal cavallo è stata isolata nel corso di un focolaio di salmonellosi che ha coinvolto 13 soggetti ricoverati in una clinica veterinaria della Georgia (USA) e *S. give* era presente sia in campioni clinici (materiale fecale o prelievi necroscopici) che nell'acqua da bere, nelle mangiatoie e nelle acque di scolo, nonché in tamponi effettuati sui tavoli operatori (Castor et al., 1989). In Canada *S. give* è stata la causa di episodi di

salmonellosi segnalati in 13 bovine, una capra ed uno struzzo. Le bovine hanno presentato diarrea persistente e febbre elevata ; in seguito ad un caso di aborto *S. give* è stata isolata dalla placenta e dal feto (Higgins et al., 1997). In Belgio 4 stipiti di *S. give* sono stati isolati dai suini nel corso del 1992-93, uno da un cavallo nel 1993 ed uno dal pollame nel 1995 (Pohl et al., 1997).

In riferimento alla possibile diffusione di *S. give* nel pollame, è importante valutare i risultati di una ricerca effettuata in Georgia, dove *S. give* è stata isolata da campioni di guscio d'uovo, piume e materiali di imballaggio prelevati in diversi incubatoi (Cox et al., 1991).

Per quanto riguarda i dati in nostro possesso, l'isolamento di *S. give* dalla salsiccia preparata con carne di pollo, tacchino e suino non può essere imputabile esclusivamente alla presenza di carni avicole, dato che nel prodotto sono state miscelate a carne di maiale e l'isolamento dai suini vivi è stato dimostrato da Pohl e collaboratori (1997). Diverso è il caso dei petti di pollo confezionati, nei confronti dei quali, pur tenendo presente che *S. give* è già stata riscontrata nella filiera avicola, non possiamo escludere una contaminazione umana post-macellazione, viste le indagini di Pacini et al. (1994) che hanno individuato la presenza di portatori sani del microrganismo.

Per quanto attiene alla sintomatologia gastroenterica osservata negli animali cui erano stati somministrati i petti di pollo, è solo ipotizzabile un'infezione salmonellare. Infatti, per mancata collaborazione del proprietario, non è stato possibile effettuare un esame microbiologico da reperti necroscopici del gatto deceduto e dal materiale fecale dei cani e dei gatti rimasti in vita. Dopo la remissione dei sintomi, è infatti noto che nel cane e nel gatto l'eliminazione di

Salmonella spp. con le feci si protrae per periodi di tempo variabili dalle 3 alle 6 settimane (Ruffo, 1995).

Pur essendo consapevoli della limitatezza numerica e della difformità dei campioni presi in esame e lungi dal voler trarre conclusioni circa la circolazione di sierotipi poco noti, abbiamo tuttavia ritenuto interessante mettere in evidenza il riscontro di *S. give* da prodotti alimentari negli anni 1996 e 1998 nelle provincie, rispettivamente, di Parma e Modena. L'unico sierotipo isolato, nello stesso periodo, da altri prodotti avicoli presso l'Istituto di Ispezione degli Alimenti di origine animale è riconducibile a *S. enteritidis*, riscontrata in una preparazione di carne nota come "cacciatore di pollo" (Bonardi et al., 1996).

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano i tecnici Ida Poli e Giuseppina Trentadue per la valida collaborazione.

Parole chiave : *Salmonella give*, petto di pollo, salsiccia di pollo, tacchino e suino

Key words : *Salmonella give*, chicken breast, mixed chicken, turkey and pork sausage

RIASSUNTO : Si segnala l'isolamento di *Salmonella give* da una salsiccia preparata con carne di pollo, tacchino e suino e da una confezione di petti di pollo venduti allo stato refrigerato. In particolare, parte dei petti di pollo era stata somministrata senza essere sottoposta a cottura ad un gruppo di cani e gatti, nei quali nell'arco di 24 ore si è manifestata una grave forma gastroenterica. Dagli animali non è stato possibile effettuare l'esame microbiologico per *Salmonella* spp., ma rimane il sospetto di una infezione salmonellare.

SUMMARY - *Salmonella give* was isolated from a mixed chicken, turkey and pork sausage and from a package of refrigerated chicken

breasts. Some dogs and cats were fed with a portion of the chicken breasts and 24 hours later were affected by a syndrome characterized by vomiting, diarrhoea and fever. Even if it was not possible to analyse clinical specimens of the animals, salmonellosis was suspected.

Bibliografia

- Bean N.H., Goulding J.S., Loa C., Angulo F.J. - Surveillance for foodborne-disease outbreaks - United States, 1988-1992. In : CDC surveillance summaries. Morbidity and Mortality Weekly Report, 45 (no. SS-5), 1996.
- Bonardi S., Bottarelli A., Bentley S. - Controllo microbiologico di preparazioni di carni. Atti S.I.S.Vet 50, 161-162, 1996.
- Boni P. - Comunicazione presentata al Convegno "Carni e Salmonelle : nuove proposte per un rischio controllabile", Brescia, 7 maggio 1998.
- Cantoni C. - Comunicazione presentata al Convegno "Carni e Salmonelle : nuove proposte per un rischio controllabile", Brescia, 7 maggio 1998.
- Castor M.L., Wooley R.E., Shotts E.B., Brown J., Payeur J.B. - Characteristics of Salmonella isolated from an outbreak of equine salmonellosis in a veterinary teaching hospital. Equine Veterinary Science, 9, 236-241, 1989.
- Cox N.A., Bailey J.S., Mauldin J.M., Blankenship L. C., Wilson J.L. - Research note : extent of Salmonellae contamination in breeder hatcheries. Poultry Science, 70, 416-418, 1991.
- Decreto Ministeriale 10 marzo 1997, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, Serie generale n° 103 del 6/5/1997.
- Direttiva 92/117/CEE - Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, serie L n° 62 del 15.03.93.
- Direttiva 97/22/CE - Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, serie L n° 113 del 30.04.97.
- Fortin G., Sanavio G., Maini C., Giugliano I., Polli A. C. - Isolamento di salmonelle nel triennio 1989 - '91

da acque superficiali, coproculture ed alimenti.
Bollettino di Microbiologia e indagini di Laboratorio,
13, 2, 15-24, 1993.

- Higgins R., Désilets A., Cantin M., Messier S., Khakhria R., Ismail J., Mulvey M. R., Daignault D., Caron H. - Outbreak of Salmonella Give in the province of Quebec. Canadian Veterinary Journal, 38, 780-781, 1997.
- Humbert F. - Salmonelle e filiera avicola. Aspetti epidemiologici e incidenza sulla sanità pubblica. Professione allevatore, 11, 9, 22-28. 1992.
- Magliani W., Viani I., Scuderi G., Binkin N., Fantasia M., Filetici E., Ferrari G., Giovanardi G.L., Riccò D., Borrini B., Chezzi C. - Salmonella enteritidis come causa di gravi episodi di tossinfezione alimentare in provincia di Parma. Atti Congresso S.I.M., Genova, 1992.
- Pacini R., Quagli E., Galassi R., Tozzi E., Malloggi L. - Dieci anni di sorveglianza epidemiologica a Livorno (I parte). Studio epidemiologico sulle salmonelle isolate da portatori sani, nell'area livornese, dal 1984 al 1993. Bollettino di Microbiologia e indagini di Laboratorio, 14, 5-6, 9-14, 1994.
- Pohl P., Imberechts H., Stockmans A. et al. - Serovars of Belgian Salmonella isolates serotyped during the years 1992, 1993, 1994, 1995 and 1996. Annual Reports National Institute of Veterinary Research, Brussels, 1-14, 1997.
- Ruffo G. - Enterobatteri. In : Trattato di malattie infettive degli animali domestici. Eds. : Farina R. e Scatozza F. - UTET, Torino, 1995.
- Soldati G., Gelmini L., Pongolini S. - Sierotipi di salmonelle isolati presso la Sezione Zooprofilattica di Modena nell'ultimo triennio. Il Progresso Veterinario, 23, 833-835, 1997.
- Tauxe R. V. - Salmonella : a postmodern pathogen. Journal of Food Protection, 54, 563-568, 1991.

Gallina, gallo e cappone: la pollicoltura da Aristotele alle soglie del 2000

Marusi A.¹, Furlattini V.¹

1) *Istituto di Ostetricia e Ginecologia
Veterinaria.*

2) *Dirigente settore Avicoltura-Gruppo
Veronesi Verona.*

Nel 1888 si tenne a Roma la I° Esposizione Internazionale degli Animali da Cortile.

In quell'occasione Trevisani, un pioniere della moderna pollicoltura, scriveva: " A me pare che la pollicoltura debba essere volgarizzata con tutti i mezzi per diventare una industria razionale anche presso di noi, sia per il miglioramento economico dei cittadini, sia per l'assoluto aumento di ricchezza nazionale che essa produrrebbe.

Ma il nostro pollame è di piccola mole, malissimo nutrito, peggio alloggiato, sicchè giunge sui mercati in cattivo stato; e le galline sì e no arrivano a produrre la media di 90 uova all'anno ognuna.

Ma quando le galline saranno allevate razionalmente e le razze migliorate, sia sostituendole interamente con altre, sia con incrociamenti ben diretti, sia con accurata selezione delle razze nostrali, allora noi potremo possedere galline che, come in Francia fetino 160 uova all'anno, e polli e capponi finissimi di carne e molto grassi da mandare al mercato."

Già 30 anni dopo, alla fine della I° guerra mondiale, nella pollicoltura si intravvidero le possibilità di sfruttamento della gallina per dar vita ad una

pollicoltura di tipo industriale capace di grandi redditi: si iniziò a costruire, in alternativa ai milioni di piccoli pollai rurali gestiti dalle massaie, grossi pollai con la possibilità, grazie al perfezionamento dei metodi di allevamento, di arrivare ad elevate capacità produttive.

Negli U.S.A. e in molti paesi europei come la Francia, la pollicoltura divenne una vera e propria scienza con migliaia di esperienze dirette al miglioramento delle razze ed al perfezionamento dei metodi di allevamento.

L'Italia, nonostante sia stata fra le prime nazioni ad interessarsi dell'allevamento avicolo più di cento anni fa, ha iniziato una vera attività industriale nel campo agricolo-industriale a partire dagli anni '50 e siamo oggi arrivati a livelli di sviluppo e di ricerca competitivi con i paesi, come gli U.S.A, dove l'industria avicola è più progredita e diffusa.

La inseminazione artificiale, sperimentata con successo in Italia nel 1937 da Bonadonna, è oggi ampiamente applicata nelle galline; in un buon allevamento si possono inseminare da 120 a 200 galline/ora. In un allevamento in gabbia il lavoro può essere effettuato da solo due persone e ciò ha consentito di passare alla produzione di poche decine di uova per capo all'anno fino a oltre 300.

Il sessaggio precoce dei pulcini, subito dopo la schiusa, ha notevolmente agevolato l'allevamento industriale del pollo da carne, consentendo la produzione differenziata di galletti, pollastre e capponi in modo da soddisfare sempre più le richieste di mercato non solo nazionale ma anche l'esportazione.

Da una indagine di mercato svolta nella città di Parma, ritenuta una delle capitali della gastronomia, abbiamo notato come a fronte di un mantenimento del livello di consumo delle carni di pollo e tacchino, ci sia attualmente un aumento della domanda di prodotti tradizionali come il cappone.

La richiesta di capponi è notevole a cavallo delle feste natalizie, ma si evidenzia anche in altri periodi dell'anno. Il gallo castrato, conosciuto fin dagli antichi romani come cappone, è sempre stato un prodotto assai apprezzato e ricercato dai nostri antenati buongustai e le nuove generazioni abituate, purtroppo, al fast food conoscono il cappone solo come il piatto di Natale più gradito dai nonni.

Oggi i capponi vengono prodotti industrialmente, soprattutto in Francia dove le richieste di mercato sono maggiori. Noi, oltre la nostra produzione, importiamo dalla Francia capponi tradizionali, ma anche faraone capponate, prodotto non molto conosciuto nella gastronomia italiana. Nell'ultimo periodo natalizio è stata stimata una vendita di circa 2 milioni di capponi.

La castrazione del gallo.

La castrazione dei volatili, era conosciuta e praticata, al pari delle altre specie domestiche, dai Greci e dai Romani. La castrazione veniva fatta soprattutto nei polli. Era il gallo che veniva castrato al fine di favorire l'ingrassamento e migliorare la qualità delle carni. Sembra che fossero gli abitanti di Delo, un'isola nel mar Egeo, a praticare per primi fin dal VII° a.C. la trasformazione del gallo in cappone. Da qui il nome di deliaco (*deliacus gallinarius*), come veniva chiamato chi praticava la castrazione del gallo, dagli scritti di Cicerone, Plinio e Columella. Ancora nel secolo scorso, in Francia, il pollivendolo (*poulailler*), veniva chiamato dagli anziani contadini, *déliaque*. Il nome di cappone è romano: così vengono chiamati da Varrone (I° a.C.) i galli evirati, assai apprezzati da quei buongustai, oltre che guerrieri, che erano i Romani.

Aristotele scrive che galli venivano castrati bruciando loro con un ferro rovente la cloaca; se l'uccello era già adulto, in seguito all'operazione, non corteggiava più le galline e la cresta diveniva pallida; se l'intervento veniva eseguito su un pollastrello, questi cresceva

senza che maturassero le caratteristiche maschiline tipiche del gallo: si formava un pollo-eunuco gigante del peso di 6-7 Kg.

Varrone si limita a dire che i galli vengono trasformati in capponi bruciando loro, con un ferro rovente, gli speroni all'estremità delle zampe ("gallos castrant, ut sint capi, candenti ferro inurentes calcaria at infima crura...").

Ma di castrazione vera e propria dei polli, così come è descritta nell'antichità greca e romana, non si può certamente parlare. Se il gallo castrato non cerca più le femmine, come dice Aristotele, vuol dire che la castrazione non era praticata con la sola cauterizzazione della cloaca, ma era necessaria anche la asportazione dei testicoli.

La bruciatura della cloaca comportava solo la distruzione dell'organo copulatore maschile, che negli uccelli, in particolare nei gallinacei, è rappresentato dal proctodeo, una sorta di piccolo pene rudimentale. Il proctodeo, al momento dell'accoppiamento, quando la cloaca maschile si avvicina alla cloaca femminile, si rovescia in fuori in modo che, con lo avvicinamento delle cloache, ci sia il passaggio degli spermatozoi da quella maschile a quella femminile. I testicoli, ovoidali, sono situati nella cavità addominale al di sotto dei reni, ben lontani quindi dalla cloaca. La bruciatura della cloaca pertanto comportava solo la incapacità all'accoppiamento ma non il blocco della funzione endocrina e della spermatogenesi proprie del testicolo.

Probabilmente sia Aristotele che Varrone non avevano mai assistito direttamente alla castrazione di un gallo.

Più preciso è Columella(I° d.C.) che scrive che al gallo castrato non solo vengono tolti gli organi genitali (" amissis genitalibus.."), ma vengono anche bruciati con un ferro rovente gli speroni, ricoprendo le ferite con creta.

Ma la castrazione dei gallinacci non ha mai suscitato l'interesse degli agronomi e, in particolare, dei veterinari. Bisogna arrivare al XVII° secolo per trovare solo un accenno di questa pratica da parte di Olivier de Serres il quale riferisce che la castrazione dei galli era compito esclusivo delle contadine e che la tecnica consisteva nell'asportare particolari pellicole dall'addome.

Queste pellicole sono finalmente chiamate testicoli, nella descrizione della trasformazione del gallo in cappone, da Valmont de Bomare nel suo Dizionario di Storia naturale nel 1775.

Una descrizione, che possiamo definire scientificamente esatta e completa, viene data da Arboval (1828). Altri autori descriveranno poi la tecnica della castrazione dei volatili, in modo chirurgico corretto.

Fino agli anni '50 la facoltà di Medicina Veterinaria non era, eccetto pochi casi, frequentata dalle donne: oggi non raro incontrare una signora che svolga la professione veterinaria non solo nei piccoli animali, ma anche con impegno e professionalità in campo buiatrico e ippiatrico. La cura dei polli e la loro castrazione è sempre stata però almeno fino a pochi decenni fa, quando è iniziata l'industrializzazione nell'allevamento avicolo, compito pressochè esclusivo delle massaie contadine: interessante tuttavia notare come fra i primi autori a descrivere in modo corretto la castrazione del gallo ci sia una donna, M.me Millet-Robinet (1856), che può essere considerata un precursore delle attuali dottoresse in medicina veterinaria.

L'età più conveniente indicata per la castrazione del pollo era dai 4 ai 5 mesi. Comunemente l'operazione veniva fatta in modo alquanto primitivo: si faceva un taglio di circa 5 cm. nell'addome dell'animale, quindi introducendo due dita nella cavità addominale si asportavano i testicoli. Questi erano facilmente riconosciuti al tatto in quanto si sentivano lisci, poco

aderenti, con la forma di un piccolo fagiolo. Per la disinfezione era sufficiente lavare la ferita con grappa o più semplicemente aceto, diluita con acqua, quindi si applicavano alcuni punti di sutura.

Oltre gli speroni era uso comune tagliare la cresta. Questa pratica era fatta per riconoscere facilmente il cappone dal gallo ma anche, come scrive Trevisani (1919), per motivi estetici perchè si impediva che la cresta, dopo la castrazione, si scolori e cada da un lato della testa in modo non troppo bello.

L'immagine di un prodotto è fondamentale per il suo mercato e oggi, con la pubblicità in televisione, è una regola fornirne le migliori immagini più che il suo reale valore.

In alcune località della Francia, come le Fiandre, si aveva l'abitudine, ancora oltre la metà del secolo scorso, di impiantare, al posto della cresta sulla testa del gallo castrato, uno o entrambi gli speroni che gli venivano asportati con una parte di tessuto. Questi speroni venivano mantenuti in sito con una sutura che ravvicinava i lembi della ferita, dopo la recisione della cresta. Per evitare che il povero pollo si staccasse queste strane protesi della cresta, si legavano le sue zampe alle ali per alcune ore dopo l'intervento. Dopo 2-3 settimane lo sperone impiantato si inseriva perfettamente al posto della cresta e iniziava a crescere talvolta in modo considerevole. Duhamel, che è il primo a parlare di questo intervento nella castrazione del gallo nel 1746, dice di aver visto crescere lo sperone impiantato sulla testa fino ad un mezzo pollice, circa 14 mm, dopo 4-5 mesi dall'impianto; addirittura 4 pollici, più di 11 cm, dopo 3-4 anni.

Questo intervento aveva lo scopo di migliorare l'aspetto del cappone, che veniva chiamato "coq cornu", gallo cornuto.

Un'altra strana abitudine si aveva non solo nelle

Fiandre, ma anche nelle tribù dei Mauri in Africa, ed era quella quella di impiantare al posto della cresta sulla testa del povero cappone, l'ala di un canarino in modo da renderlo più elegante. Sembra che questo strano impianto attecchisse al pari degli speroni, senza però che si avesse un accrescimento.

Al di là di impiantare gli speroni sulla testa del cappone, la castrazione del gallo è sempre stata eseguita, e ancor oggi lo si fa in certe zone rurali, nel modo alquanto primitivo che abbiamo descritto.

A partire dagli anni '50, nei moderni allevamenti avicoli è stato adottato un nuovo metodo di castrazione, che senza i grossi traumi del vecchio metodo, raggiunge ugualmente lo scopo. Dalla castrazione "contadina" si è passati alla castrazione strumentale compiuta da professionisti su galletti di 40-50 giorni di vita.

Sopra un tavolo si mantiene fermo il galletto adagiato su un fianco: si tolgono le penne in corrispondenza della attaccatura della coscia e, con un piccolo bisturi, si esegue un taglio di circa 3 cm. nello spazio fra le ultime due costole. Le labbra della ferita vengono dilatate da un estensore a molla in modo che si evidenzia la membrana del peritoneo. Con un ferro uncinato si strappa la membrana e, spostando un po' in basso gli intestini, si può vedere il testicolo attaccato alla parete della cavità addominale, vicino al rene. A questo punto si fa entrare un tubo porta laccio per la strozzatura del testicolo: una volta che il testicolo allacciato si è staccato lo si estrae con una pinza.

Eseguita su un fianco, l'operazione va ripetuta dall'altro. Molti operatori esperti riescono con una sola incisione ad estrarre ambedue i testicoli. Non c'è bisogno di sutura, in quanto la ferita si chiude da sola in pochi giorni. Per la disinfezione degli strumenti, è sufficiente utilizzare alcool denaturato al 70% o disinfettanti non alcolici.

E' ancora consuetudine asportare cresta e bargigli, ma solo per ragioni commerciali, in modo da differenziare il gallo dal cappone al momento della vendita; non vengono tolti gli speroni.

Gli errori di "capponatura" nella castrazione industriale del pollo, sono di circa l'8-10%; molto spesso si tratta di una castrazione parziale che, con la permanenza in sito di un testicolo, determina nel tempo manifestazioni e comportamenti da gallo ben evidenti e facilmente riscontrabili sull'animale al momento della macellazione.

La mortalità nell'intervento è di circa 1,5-2%.

Il cappone tradizionale oggi in vendita sul mercato italiano è rappresentato da un pollo castrato di circa 3 Kg di peso vivo e di circa 180-200 giorni di vita; la tipologia specifica di "cappone" è stata regolamentata dalla CEE che lo identifica come gallo castrato di almeno 140 giorni di vita e castrato da almeno 70 giorni prima della vendita.

Le razze dei polli utilizzate per fare il cappone sono quelle a crescita lenta, di piumaggio colorato o bianco con sfumature dorate; vengono utilizzati i maschi fratelli delle femmine ad alta produzione di uova, ma anche maschi a crescita intermedia normalmente allevati come galletti e destinati alla cucina di piatti tipici per lo più nel centro sud dell'Italia.

Per arrivare ad un buon ingrassamento ed a una buona pigmentazione dorata della pelle, occorre somministrare mangimi a base di granoturco, meglio ancora pastoni con farine di granoturco.

L'allevamento viene fatto al semiaperto e per migliorare la qualità della carne la carcassa è bene venga frollata prima di essere cucinata.

Capponaggio chimico.

Oltre al nuovo metodo di capponaggio cruento, sempre negli anni '50, era iniziato un nuovo metodo di castrazione denominato " capponaggio chimico", che si eseguiva iniettando sotto la pelle del collo dei galletti una piccola dose di un ormone di sintesi: il dietilstilbestrolo.

Dopo un primo periodo sperimentale il dietilstilbestrolo, che era iniettato in soluzione a mezzo di una comune siringa, venne poi impiantato sotto cute, con apposito ago-cannula, in forma di piccole compresse.

Le prime pastiglie vendute sul mercato avevano un contenuto di dietilstilbestrolo di 50 mgr. e assicuravano una assimilazione molto lenta esercitando un'efficacia per almeno 4 mesi.

L'innesto di una compressa di 50 mgr. di dietilstilbestrolo sopprimeva nel gallo le manifestazioni estrali per almeno 4 mesi, analogamente a quanto avveniva con la castrazione cruenta.

Sia l'incremento in peso che le caratteristiche organolettiche delle carni dei galli castrati chimicamente non si differenziavano dai capponi ottenuti in modo cruento.

Interessante era notare come dopo 4 mesi dall'innesto i testicoli si presentassero estremamente ridotti sia in volume che in peso: 8 volte più piccoli rispetto a quelli dei galli della stessa età.

Per quanto interessante questa nuova tecnica di castrazione chimica, tuttavia dopo qualche anno fu sempre meno applicata fino ad arrivare al suo abbandono.

L'azione del dietilstilbestrolo sebbene in proporzioni diverse, è uguale per tutti gli animali, compreso l'uomo. Pertanto un certo danno poteva derivare anche all'uomo ingerendo qualche collo di pollo castrato

chimicamente .

Un fatto certo è che negli Stati Uniti, oltre il Canada e la Francia dove il capponaggio chimico ebbe maggior diffusione, si verificò un fatto assai significativo. In uno stabilimento dove si procedeva alla lavorazione e inscatolamento delle carni di pollo, i colli e le teste venivano venduti agli allevamenti degli animali da pelliccia. Un giorno un allevatore di volpi argentate dichiarò che la fecondità dei suoi animali era notevolmente diminuita: egli attribuiva ciò ai colli che provenivano dai polli capponati chimicamente e pertanto chiese alla ditta fornitrice la rifusione dei danni.

Da allora il capponaggio chimico cominciò ad essere non più eseguito fino ad arrivare al suo definitivo abbandono in base al D.L. n. 118 del 27 gennaio 1992 che anche in Italia, sulla base di direttive CEE, vietava l'uso di sostanze ormonali ad azione anabolizzante.

La castrazione della gallina.

Per quanto chi ha scritto della castrazione del gallo accenni anche alla castrazione della gallina, che diventerebbe con l'intervento una sorta di cappone femmina, non

parla mai della tecnica. La castrazione della femmina nei volatili è assai più complessa di quella dei maschi e, analogamente a quanto abbiamo visto per i mammiferi, non era normalmente praticata.

Sembra addirittura che ai Romani fosse vietata tale pratica: il console Caio Fannio nel 593 a.C. decretò che a tavola non si potesse servire più di una gallina, ciò al fine di tutelare la produzione di uova. Queste norme, ancora valide quattro secoli dopo, come scrive Plinio (I d. C.), non impedirono comunque che l'ingrassamento delle galline, il loro capponaggio in particolare, continuasse ad essere praticato per la raffinata cucina romana.

Nell'ultima edizione degli scritti di Oliviero de Serres (1804) si legge che la castrazione della gallina si pratica in due modi: uno nella asportazione dell'ovaio, l'altro nel fare un'incisione sopra la cloaca, in modo che la cicatrice, restringendo l'ovidotto impedisse lo sviluppo delle uova e la loro discesa.

Arboval (1828) parla di asportazione dell'ovidotto, analogamente a come si fa per i testicoli nel gallo.

In modo più preciso viene descritta l'asportazione dell'ovaio nella gallina nella *Maison rustique* (1837); dopo aver praticato un'incisione trasversale al di sopra della cloaca, questa viene allargata praticando due ulteriori incisioni perpendicolari ai lati della prima. In questo modo si mette in evidenza una piccola struttura arrotondata che viene asportata mediante torsione. La piaga viene poi suturata con qualche punto.

Ma non si trattava di una castrazione vera in quanto non veniva asportata l'ovaia ma semplicemente la "borsa di Fabrizio". E' questo un organo tipico degli uccelli, associato alla parete dorsale della cloaca; è ben sviluppato nel pollo immaturo, circa 4 mesi, età adatta per la castrazione ed ha una forma globosa, della lunghezza di 2-3 cm e 0,8-1 cm di larghezza.

La funzione della ghiandola, borsa di Fabrizio, era ritenuta nel 1850, ma ancora per molti anni, quella di secernere un liquido lubrificante per la parete della cloaca in modo di favorire la fuoriuscita dell'uovo. Ma se questo è comprensibile per la femmina, ciò non vale per i galli che pure hanno quest'organo. Oggi la borsa di Fabrizio è ritenuta per gli uccelli un organo importante per le difese immunitarie. Gli uccelli borsectomizzati perdono più o meno completamente la capacità di produrre anticorpi con gravi carenze dei meccanismi di immunità. Ciò vale soprattutto negli animali giovani e non, fortunatamente, per le povere gallinelle che venivano "castrate" privandole della borsa di Fabrizio, all'età di almeno 4 mesi.

Ancora nel 1919 era in uso in Francia, nella Bresse e Calvados, la castrazione delle pollastre(Trevisani 1919). Queste gallinelle castrate erano assai ricercate ed apprezzate dai buongustai, "gourmets", normanni.

Per quanto la castrazione delle galline sia possibile, tuttavia è molto più complessa e rischiosa rispetto all'intervento eseguito sul maschio, come del resto abbiamo visto per i mammiferi. L'ovaio nella femmina degli uccelli è costituito da una struttura a forma di grappolo, per la presenza degli ovuli a differente stadio di sviluppo, piuttosto grossa sita a sinistra, rudimentale e piccola a destra, presso i reni. La sua asportazione è pertanto difficile. E' molto più facile asportare la borsa di Fabrizio o, più semplicemente, allevare le pollastrelle in ambienti ristretti, poco luminosi e caldi, con abbondanza di cibi nutrienti.

Così consigliava M.me Millet-Robinet nel 1859, quando le galline ovaiole erano ritenute campionesse se producevano 40-50 uova all'anno. Oggi con la selezione e le moderne tecnologie di allevamento, le nostre galline producono un uovo ogni 26 ore, circa 330 uova/ capo all'anno. Per la qualità? Lascio il giudizio alle nostre massaie.

Riassunto. La pollicoltura nonostante sia antichissima come attività rurale, ne scrivono Aristotele IV sec. a.C. , seguito poi da Cicerone, Plinio e Columella, tuttavia ha avuto un progresso tecnico notevole solo a partire dai primi decenni del XX secolo. E' dagli anni '50 che la pollicoltura è divenuta un'industria zootecnica importante e competitiva, non solo accessoria, agli allevamenti degli animali da reddito come i bovini ed i suini. In questo lavoro abbiamo preso in considerazione non solo l'allevamento delle galline ovaiole che, grazie alla selezione ed alle moderne tecniche di allevamento sono passate alla produzione di 300 e più uova/capo all'anno rispetto alle 50/capo delle galline delle nostre nonne, ma soprattutto la produzione del pollo da carne: in particolare il cappone. Il pollo castrato o cappone, come viene chiamato fin dai tempi degli antichi romani, è sempre stato un cibo assai ricercato ed apprezzato e le richieste di mercato per

questo prodotto avicolo di qualità vanno sempre più aumentando. Il cappone, da prodotto esclusivo di poche donne contadine, è diventato un prodotto importante nell'industria agricola.

Parole chiave - Gallina, gallo, cappone, castrazione, pollicoltura.

Key words - Hen,cock, capon, castration, poultry-farming.

Summary. Although poultry-farming is a very ancient rural activity, described by Aristotle in the 4th century BC and later by Cicero, Pliny and Columella, it had a significant, technical development as recently as the first decades of the 20th century. In the 1950s poultry-farming became an important, competitive industry, no longer a complementary activity, to the breeding of farm-animal like cattle and pig. This work analyses egg-hens, which, thanks to selection and modern breeding techniques have increase their yearly production to 300 eggs and more each as compared to our grandmothers' hens whose yearly production averaged 50 eggs. The real focus of this work is the production of meat-chicken and the capon, in particular. The castrated chicken or capon, as it has been called since the times of the ancient Romans, has always been a very refined, highly appreciated food and market demand for this white meat is increasing. The capon, once an exclusive product for few female farmers, has become an important source for the farming industry.

Bibliografia

- Aristotele: Storia degli animali IX,50, IV a.C.
- Bixio A.: *Maison rustique du XIX siècle*. Paris 1837.
- Bonadonna T.: *Riproduzione animale e fecondazione artificiale*. Vol.V. Utet 1974.
- Cicerone: *De Officiis*.IV,I a.C.
- Columella L.: *De Re Rustica* VIII,2,I d.C.
- Cornoldi G.: *Pollicoltura moderna*. Ed.Agricole Bologna 1954.
- D'Arboval: *Dictionnaire de Médecine Veter*. Paris 1828.
- Gourdon J.: *Traité de la castration des animaux domestiques*. Paris 1860.
- Marusi A., Fasoli F., Furlattini V.:*L'inseminazione strumentale negli uccelli domestici*. Step. Ed. Parma 1981.
- Millet-Robinet.: *Maison Rustiq. des Dames*. Paris 1856.
- Oliviero de Serres.: *Theatre d' Agricult*. IV. Paris 1600.
- Plinio C.: *Historia naturalis* X,71,I d.C.
- Trevisani G.: *Pollicoltura*. Hoepli ed. Milano1919

- Valmont de Bomare.:Dict.de Histoire naturelle. 1775.
- Varrone M.T.:De Rustica. III, I a.C.



OSSERVAZIONE DI DELFINIDI (*Tursiops truncatus*) IN CATTIVITA' E VARIAZIONI DEL COMPORTAMENTO SUCCESSIVE ALL'INTRODUZIONE DI STIMOLI AMBIENTALI

P. Fognani (1), P.G. Bracchi (2), G. Gnone (3)

(1) Medico veterinario, associato SIEF. Via Dottesio 7/12 16149 Genova. Tel. 0106453262. Fax. 0106444946. E-Mail: fognani@concert.it

(2) Istituto di Informatica e Biomatematica - Università di Parma - Facoltà di Medicina Veterinaria

(3) Dipartimento Mammiferi Marini - Acquario di Genova

Premessa

Osservando il comportamento, si può facilmente notare che gli animali rispondono in maniera diversa a seconda degli stimoli ambientali che ricevono e che anche la risposta a uno stesso stimolo può variare a seconda del momento. In etologia, l'insieme dei processi interni reversibili responsabili del cambiamento del comportamento è definito motivazione. Da questa deriva una strutturazione del comportamento dell'animale, in vista del raggiungimento di un particolare obiettivo, in cui si possono distinguere tre fasi: il comportamento appetitivo, durante il quale l'animale ricerca il proprio obiettivo; l'atto consumatorio, a conclusione della fase appetitiva, caratterizzato dagli atti di concepimento (comportamenti finalizzati e stereotipati); fase di quiescenza in cui non vi è più risposta agli stimoli provenienti dall'obiettivo. Il comportamento si può quindi considerare come il risultato di pulsioni interne e di stimoli esterni, agendo questi ultimi come fattori scatenanti la fase consumatoria o incentivanti la fase appetitiva (Valsecchi, 1992). Se un animale non è in grado di soddisfare i propri bisogni, che derivano dai cambiamenti motivazionali, andrà incontro a una diminuzione del suo benessere. Una tecnica per capire quali condizioni possano migliorare il benessere di un animale, è quella di porre il soggetto in un ambiente ricco di stimoli e quindi osservarne le risposte comportamentali, ponendo anche l'attenzione sul modo in cui gli animali trascorrono il proprio tempo nel corso della giornata (Fraser e Broom, 1997) e questo è ciò che è stato fatto durante il nostro lavoro di ricerca.

Scopi della ricerca

Il principale obiettivo della presente ricerca è stato quello di valutare lo stato di benessere di due esemplari di *Tursiops truncatus*, madre e figlia, in cattività, tramite l'osservazione del comportamento e di considerare i cambiamenti di quest'ultimo in seguito all'introduzione di stimoli ambientali, con particolare attenzione alla durata del periodo appetitivo, che spesso tende a ridursi negli animali in cattività.

Il lavoro si è svolto in tre momenti fondamentali: dapprima si è cercato di capire in quali attività gli animali trascorressero il proprio tempo, con riguardo alle differenze individuali di comportamento; quindi è stato attuato un programma di arricchimento ambientale, attraverso l'introduzione di giochi e *food-dispensers*, andando a esaminare se e quali cambiamenti comportamentali si verificavano nei due animali, sia nel periodo immediatamente a seguire l'inserimento dei nuovi stimoli, sia dopo diverse settimane, quando sarebbero potuti subentrare fenomeni di assuefazione. Sono state fatte ipotesi sul significato di alcuni comportamenti osservati, cercando in particolare di comprendere se dovessero essere considerati anormali o patologici. A questo proposito, si è considerato comportamento patologico un comportamento che non compare nell'etogramma della specie cui appartiene l'individuo in esame e che tende a diminuire la *fitness* del soggetto che lo compie, cioè non adattativo. Infatti, esistono comportamenti che, pur avendo, in nuovi contesti ambientali, effetti deleteri sulla sopravvivenza dell'individuo che li attua e sulla sua *fitness*, non possono essere considerati patologici in quanto appartengono all'etogramma della specie considerata. Si definiscono invece anormali quei comportamenti che, pur non essendo presenti nell'etogramma della specie considerata, rappresentano comunque una risposta adattativa alle mutate condizioni ambientali (Csermely, 1992), favorendo la *fitness* del soggetto che li compie. E' comunque bene ricordare che anche un comportamento anormale, e quindi adattativo, potrebbe rappresentare la manifestazione di un problema presente per l'animale. Per quanto riguarda il termine stereotopia, esso si usa invece per esprimere la costanza nella forma e nell'intensità di un comportamento (Lugli, 1992) e non è quindi necessariamente legato a situazioni patologiche o anormali.

Materiali e metodi

I due esemplari di *Tursiops truncatus* studiati, erano ospitati presso l'Acquario di Genova, in una vasca con dimensioni (espresse in metri) 23,5x10x4,8 (profondità dell'acqua); volume d'acqua: 1104 m³; superficie d'acqua: 230 m²; temperatura dell'acqua (min-max): 16-24 °C; filtrazione: 4-12 FT DIA SAND; *turn over* dell'acqua: 110 minuti; trattamento dell'acqua: ipoclorito di sodio ed ozono.

La vasca è visibile su due livelli: un lato lungo è interamente costituito da una lastra di acrilico che permette una visione subacquea stando al primo piano della struttura. Gli altri lati sono in cemento e due di essi, quelli corti, sono rivestiti dalla riproduzione, anch'essa in cemento, di una scogliera. Gli animali possono accedere alla *holding* attraverso due aperture, delle dimensioni di cm. 150x150, poste sulla scogliera di destra. La *holding* ha dimensioni (in metri): 7,4x13,2x3,5 (profondità dell'acqua); volume d'acqua: 342 m³; superficie d'acqua: 98 m². Sia la vasca che la *holding* sono a cielo aperto.

Bonnie (codice di deposito C.I.T.E.S.:DOL4) venne catturata a Cuba ed arrivò in Italia il 10/7/1988; l'anno stimato di nascita è il 1976. E' giunta già gravida all'Acquario di Genova il 13/10/1993; Cleo (codice di deposito C.I.T.E.S.:(CB)FIO7) è nata il 5/9/1994 ed è la seconda figlia di Bonnie nata in cattività: la prima, Daphne, nata al Delfinario di Cattolica, morì dopo pochi mesi di vita a causa di un incidente.

Le osservazioni sono state svolte in tre diversi periodi, e precisamente: 1° periodo: dal 29/7/1996 al 24/8/1996; 2° periodo: dall'11/9/1996 al 27/9/1996; 3° periodo: dal 23/12/1996 al 10/1/1997. La raccolta dei dati veniva effettuata 6 giorni/settimana (dal lunedì al sabato), ininterrottamente per 6 ore/giorno: dalle 8.00 alle 14.00 e dalle 14.00 alle 20.00 a giorni alterni, in modo da monitorare, complessivamente, un arco di tempo di 12 ore. Veniva eseguito un campionamento 1-0: ogni scheda compilata corrispondeva a 1 ora di osservazione,

suddivisa in 20 periodi di 3 minuti ciascuno; nel rilevamento, all'interno di ogni periodo di 3 minuti (segnalato da un cronometro digitale), venivano registrati i comportamenti che comparivano in ciascun animale, indipendentemente dal numero di volte che questi si presentavano nella durata del periodo stesso. Il campionamento 1-0 è stato scelto in quanto permette a un solo osservatore di monitorare contemporaneamente più animali. L'intervallo pari a tre minuti è giustificato dal fatto che l'interesse maggiore era rivolto a quei comportamenti che avevano una certa durata nel tempo, quali il riposo, il gioco, ecc.; comunque, prima di iniziare la ricerca, sono state eseguite diverse "osservazioni-prova", che hanno permesso di valutare quale intervallo di tempo, nel campionamento 1-0, potesse essere adeguato per le indagini che si volevano svolgere.

I dati così ottenuti sono stati riassunti in modo da ottenere, per ciascun comportamento, il numero di periodi in cui è comparso il comportamento stesso in ogni intervallo di 30 minuti per ciascun giorno di osservazione; tutto ciò è stato quindi riportato su computer utilizzando il *software Excel*.

Durante le osservazioni sono state effettuate 6 ore di videoregistrazione utilizzando una telecamera S-VHS Panasonic Hi-Fi Stereo NV-MS4 HQ.

Oltre alla raccolta dei dati descritta, è stata eseguita anche un'osservazione notturna, sempre con lo stesso metodo di campionamento, nella notte del 12/10/96, dalle ore 21.00 alle 6.00; per rendere possibile la visione degli animali senza disturbarli, è stata utilizzata luce diffusa.

Si è poi pensato a un periodo di osservazione presso il Delfinario di Riccione, per vedere quali potessero essere le differenze comportamentali riscontrabili in un gruppo sociale più ampio rispetto a quello costituito dalla coppia madre-figlia. Tali osservazioni si sono svolte dal 26/1/1998 al 31/1/1998, monitorando gli animali dagli obli presenti sulla parete della vasca. Per problemi tecnici, la raccolta dei dati era limitata a 3 ore/giorno, precisamente dalle 10.00 alle 13.00 e dalle 13.00 alle 16.00 a giorni alterni; il metodo usato era lo stesso di Genova. La vasca di Riccione ha le seguenti caratteristiche: è circolare, con diametro di 25m., profondità 4,7m.; è a cielo aperto e l'acqua viene trattata con ipoclorito di sodio. All'interno della vasca, vi è una porzione recintata, ove gli animali possono entrare, che funge da *holding*.

Animali presenti al Delfinario di Riccione al momento della raccolta dei dati.

<i>nome</i>	<i>sezzo</i>	<i>cod. C.I.T.E.S.</i>	<i>nascita stimata</i>	<i>origine</i>	<i>note</i>
Pelè	F	HEI 1	1964	Key Largo, FL	
Bravo	M	BRA4	1978	Rockport, TX	
Micha	M	MIC5	1986	Cuba	A Genova dal 13/10/93 al 27/5/95
Tabo	M	(CB)TAB9	15/6/93	Nato in vasca	
Golia	M	(CB)GOL10	6/7/93	Nato in vasca	

(Da certificato C.I.T.E.S.)

Il 29/9/1998, Bonnie e Cleo sono state trasferite a Riccione.

Risultati

Descrizione dei comportamenti analizzati

Nuoto di riposo in coppia. Gli animali si posizionano fianco a fianco e nuotano in modo lento e costante in senso orario, seguendo una traiettoria regolare e senza variazioni di profondità, riemergendo solo per respirare; i movimenti dei due animali sono sincronizzati: essi, attraverso l'azione della pinna caudale, ricevono una spinta in avanti e quindi si lasciano "scivolare" passivamente. E' da notare che ciascun animale tiene un occhio chiuso ed uno aperto alternativamente e che l'occhio aperto è costantemente quello interno alla coppia: in questo modo probabilmente gli animali riescono a monitorare continuamente la posizione dell'uno rispetto all'altro ed a sincronizzare il nuoto (durante l'attività descritta non vengono emessi segnali acustici, da quanto risulta in base a ricerche precedenti). Con tutta probabilità questo comportamento è, anche sulla base delle testimonianze di Lilly (1964), Flanigan (1974), Mukhametov (1984) e Benoldi (1995), almeno in buona parte dei casi, associato al sonno. Un altro particolare degno di nota è che, durante i periodi di osservazione da noi effettuati, quando si presentava il nuoto di riposo in coppia, in realtà Cleo non si poneva al fianco della madre, ma in posizione latero-ventrale e caudale rispetto a questa, con il capo in corrispondenza dell'addome di Bonnie; perciò, il suo atteggiamento era tipicamente infantile, anche in base a ciò che descrivono Mc Bride e Kritzler (1951) e Tavolga ed Essapian (1957). Successivamente, Cleo ha iniziato ad assumere una posizione più paritaria rispetto alla madre, quindi tipica dell'animale adulto.

Nuoto di riposo. Come il precedente, ma eseguito da un solo animale. Anche in questo caso gli occhi sono tenuti chiusi alternativamente.

Nuoto casuale. L'animale si muove nella vasca senza una traiettoria precisa. In pratica, si può dire che "gironzola" qua e là.

Nuoto rilassato in coppia. Gli animali si presentano tranquilli ed il loro nuoto è simile a quello di riposo in coppia, ma un po' più attivo rispetto a quest'ultimo. Entrambi gli animali hanno gli occhi aperti, oppure un occhio è socchiuso: tale comportamento rappresenta uno stato di transizione che si manifesta quando gli animali gradualmente passano da una condizione di attività a una di riposo o viceversa. Anche durante questo tipo di nuoto, Cleo, nei periodi in cui si sono svolte le nostre osservazioni, si poneva latero-ventralmente e caudalmente a Bonnie.

Nuoto rilassato. Come il precedente, ma eseguito da un solo animale.

Nuoto vigile. L'animale si presenta particolarmente attento all'ambiente circostante; spesso si può notare una particolare postura "a S", per cui il soggetto si pone orizzontalmente, con la pinna caudale leggermente flessa verso il basso e quindi abbassa il capo puntando il rostro verso l'oggetto o la situazione che suscita la sua attenzione. Questa posizione è stata descritta anche da Gnone (1991). La stessa posizione si presenta talvolta anche nelle situazioni in cui l'animale mostra aggressività ed in questi casi è spesso accompagnata da *jaw-claps*. Il nuoto vigile può essere eseguito singolarmente o in coppia; in particolare abbiamo notato che quando gli animali si trovano in una situazione nuova o di fronte a qualcosa di insolito, tendono a unirsi ed a nuotare in modo serrato, tenendo sotto controllo l'ambiente circostante.

Stazione in superficie. L'animale rimane fermo in superficie, mantenendo fuori dall'acqua lo sfiatatoio. Tale comportamento, che potrebbe essere associato al riposo, è stato descritto anche da Flanigan (1974) e da Gnone (1991). Tale stazionamento è probabilmente reso più semplice in cattività, dove non vi sono correnti né predatori. Nel rilevamento dei dati, si sono prese in considerazione tutte le volte in cui un individuo stazionava in superficie in un punto della vasca che non fosse rappresentato dalle "porte" (passaggi di comunicazione con la *holding*), in quanto questo caso è stato considerato a parte. Si tenga presente, comunque, che gli animali stazionavano sempre vicino alla parete rocciosa.

Stazione alle porte. L'animale si pone davanti alle "porte", stazionando o meno in superficie, oppure entrando parzialmente nelle "porte" stesse.

Allattamento. Per la propria conformazione anatomica, il piccolo non può esercitare una vera e propria suzione, perciò, inclinando leggermente il corpo su un lato ed avvicinando la bocca ad una delle fessure mammarie, crea con la lingua una sorta di canale di collegamento tra il capezzolo e la propria cavità orale; a questo punto il latte viene attivamente iniettato dalla madre nella bocca del piccolo. L'allattamento è preceduto dal "*bumping*", atto compiuto dal lattante e che consiste nell'urtare alcune volte con il proprio capo il ventre materno, similmente a come avviene in molti mammiferi terrestri. Durante le nostre osservazioni, a ogni allattamento, Cleo assumeva il latte da una a cinque volte, rimanendo ogni volta in contatto con il capezzolo della madre per 4-6 secondi.

Alimentazione. Questo comportamento veniva registrato ogni volta che l'animale assumeva il cibo, indipendentemente dal fatto che questo provenisse dalla mano dell'addestratore o dal *food-dispenser*.

Food-dispenser. Riguarda ogni interazione dell'animale con il *food-dispenser*, indipendentemente dal fatto che tale azione sia seguita o meno dall'ottenimento del cibo.

Interazioni con gli addestratori. Queste potevano avvenire durante il *feeding*, oppure quando gli animali vedevano gli addestratori oltre l'acrilico.

Interazioni con i sub. Si tratta delle interazioni degli animali con i sommozzatori che entravano in acqua per ripulire la vasca.

Interazioni con l'osservatore. Questo comportamento riguarda le interazioni degli animali con noi osservatori; tali interazioni erano indirette, in quanto vi era l'interposizione dell'acrilico.

Interazioni con i visitatori. Comprende qualsiasi tipo di interazione degli animali con il pubblico o con il personale dell'Acquario, esclusi gli addestratori. Va ricordato che vi era sempre l'interposizione dell'acrilico.

Interazioni sociali aggressive. Comprende tutti i tipi di interazione tra i due animali che mostrano la presenza di aggressività.

Interazioni sociali non aggressive. Comprende tutte le interazioni di tipo non aggressivo tra i due animali, come il gioco, l'allattamento, gli sfregamenti ed anche le interazioni che presentano risvolti di tipo sessuale.

Sfregamento x. Si tratta di un'interazione sociale non aggressiva, che prende in considerazione gli sfregamenti tra i due animali, indipendentemente dal fatto che sia un animale a strofinare l'altro o che si tratti di un'azione reciproca.

Comportamento esplorativo. Riguarda le attività attraverso cui l'animale indaga l'ambiente circostante; può essere associato al gioco, per cui si parla di comportamento ludico-esplorativo.

Gioco. Qualsiasi attività ludica, sia che si svolga individualmente, che con altri individui e sia che preveda o meno l'uso di oggetti inanimati presenti nella vasca o che vi siano stati introdotti a tale scopo.

Nell'analisi dei dati raccolti, si possono prendere in considerazione sia i cambiamenti comportamentali che si sono verificati in ciascun animale da un periodo di osservazione all'altro, sia le differenze che si riscontrano in ciascuno di tali periodi tra i due individui.

Per ciascun animale sono stati composti tre grafici, uno per ogni periodo di osservazione, in cui, attraverso un istogramma, viene indicato, per ciascun comportamento preso in esame, il numero medio di periodi in cui tale comportamento compare giornalmente, intendendo come giornata l'arco di tempo che va dalle ore 8.00 alle 20.00 (vedi grafici "Giornata tipo").

Per vedere se l'incidenza dei venti comportamenti considerati in Bonnie e Cleo, all'interno dei diversi periodi di osservazione, sia statisticamente correlata, è stato applicato il coefficiente di Correlazione per ranghi di Spearman. Lo stesso coefficiente è stato poi applicato per confrontare il comportamento di Bonnie nei diversi periodi di osservazione e lo stesso è stato fatto per Cleo.

Applicazione del coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman (una coda)

	Bonnie 1° periodo di osservazione	Bonnie 2° periodo di osservazione	Bonnie 3° periodo di osservazione
Cleo 1° periodo di osservazione	0,757	Non calcolato	Non calcolato
Cleo 2° periodo di osservazione	Non calcolato	0,448	Non calcolato
Cleo 3° periodo di osservazione	Non calcolato	Non calcolato	0,726

Livello di significatività: $P < 0,01$ ($r > 0,534$)

Applicazione del coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman (una coda)

	Bonnie 1° periodo di osservazione	Bonnie 2° periodo di osservazione	Bonnie 3° periodo di osservazione
Bonnie 1° periodo di osservazione	1	0,690	0,348
Bonnie 2° periodo di osservazione	0,690	1	0,594
Bonnie 3° periodo di osservazione	0,348	0,594	1

Livello di significatività: $P < 0,01$ ($r > 0,534$)

Applicazione del coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman (una coda)

	Cleo 1° periodo di osservazione	Cleo 2° periodo di osservazione	Cleo 3° periodo di osservazione
Cleo 1° periodo di osservazione	1	0,539	0,388
Cleo 2° periodo di osservazione	0,539	1	0,687
Cleo 3° periodo di osservazione	0,388	0,687	1

Livello di significatività: $P < 0,01$ ($r > 0,534$)

Applicazione del test F e del test t

	B.1-C.1	B.2-C.2	B.3-C.3	B.1-B.2	B.1-B.3	B.2-B.3	C.1-C.2	C.1-C.3	C.2-C.3
Nuoto rip.	test t $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	N.C.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t $P = 0,01$	test F $P < 0,01$	N.C.	N.C.
Nuoto rip. 2	---	---	---	test F $P < 0,01$					
Nuoto cas.	test t $P < 0,01$	test t N.S.	test t $P < 0,01$	test t N.S.	test t N.S.	test t N.S.	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test t N.S.
Nuoto nl.	test t $P = 0,02$	test F $P < 0,01$	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test t $P = 0,02$	test F $P < 0,01$			
Nuoto nl. 2	---	---	---	test t N.S.	test t $P < 0,01$	test t N.S.	test t N.S.	test t $P < 0,01$	test t $P < 0,01$
Nuoto vig.	test t $P < 0,01$	N.C.							
Staz. sup.	test t N.S.	test t N.S.	N.C.	test F $P < 0,01$	test t $P = 0,06$				
Staz. ponte	test t $P = 0,01$	test t $P < 0,05$	test t $P = 0,06$	test t $P < 0,01$	test t $P < 0,01$				
Allatt.	---	---	---	test t N.S.	N.C.	N.C.	test t N.S.	N.C.	N.C.
Alim.	test t N.S.	test t N.S.	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t N.S.
Food-disp.	---	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	---	---	test t N.S.	---	---	test t N.S.
Int. add.	test t N.S.	test t N.S.	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t N.S.
Int. sub.	N.C.								
Int. oss.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t N.S.	test t $P = 0,05$	test t $P < 0,05$
Int. vis.	test F $P < 0,01$	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t $P < 0,05$	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t N.S.	test t $P < 0,01$
Int. soc. aggr.	---	---	---	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Int. soc. non aggr.	---	---	---	test F $P < 0,01$					
Sfreg. X	---	---	---	test t N.S.	test t $P < 0,01$	test t $P < 0,01$	test t N.S.	test t $P < 0,01$	test F $P < 0,01$
Comp. espl.	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test t $P < 0,01$	test t N.S.	test F $P < 0,01$	test t $P = 0,01$			
Gioco	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	test F $P < 0,01$	N.C.	N.C.	N.C.	test F $P < 0,01$	test t N.S.	test F $P < 0,01$

Test F (n=24): livello di significatività $P < 0,01$ ($F < 2,7$)

Test t per dati non appaiati (n=24): livello di significatività $P < 0,05$ ($t < 2,7$)

N.C.: non calcolato

N.S.: non significativo

Per ciascun comportamento, si è poi voluto vedere se esista una differenza significativa tra i due animali all'interno dello stesso periodo di osservazione e, allo stesso modo, se, per ogni animale, sia possibile rilevare una differenza significativa confrontando tra loro i diversi periodi di osservazione. Per fare ciò, alle popolazioni di dati che si volevano confrontare, è stato applicato il test *F*. Nei casi

in cui il test *F* non indicasse una differenza significativa, è stato applicato il test *t* per dati non appaiati. Entrambi questi test sono stati applicati considerando l'incidenza media di ciascun comportamento all'interno di ciascun periodo di trenta minuti (n=24).

Confrontando il comportamento dei due animali durante il primo periodo di osservazione, si nota che vi è correlazione nell'incidenza relativa di ciascuna categoria, come risulta anche dal valore del coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman.

Riguardo i diversi tipi di nuoto, l'incidenza del nuoto di riposo e rilassato, è significativamente maggiore in Bonnie rispetto a Cleo, in cui invece è maggiore quella del nuoto casuale.

Tra tutti i comportamenti considerati, lo stazionamento alle porte è quello che ha un'incidenza media maggiore in Bonnie; si vede inoltre, che anche lo stazionamento in superficie ha un'incidenza notevole; tali comportamenti sono ben evidenti anche in Cleo: è importante però ricordare che il campionamento eseguito è di tipo 1-0 e quindi non è in grado di fornire informazioni circa l'esatta durata del comportamento considerato: in questo caso, perciò, nonostante si registri lo stazionamento alle porte ed in superficie sia in Bonnie che in Cleo, tuttavia, il tempo speso da quest'ultima in tali attività, se fosse stato misurato, sarebbe risultato sicuramente minore rispetto a quello speso dalla madre e tale differenza sarebbe stata ancor più evidente nei periodi di osservazione successivi; infatti, nonostante Cleo stazionasse piuttosto di frequente, soprattutto quando tale comportamento presentava un'alta incidenza in Bonnie, rimaneva in tale posizione per tempi brevi, mentre Bonnie mostrava la tendenza a soffermarsi a lungo.

E' da notare la differenza fortemente significativa tra Bonnie e Cleo per quanto riguarda le interazioni con l'osservatore e con i visitatori.

Le interazioni sociali aggressive si possono considerare assenti.

Vi è una netta differenza tra i due animali riguardo il comportamento esplorativo e di gioco: entrambi hanno un'incidenza fortemente maggiore in Cleo; inoltre, mentre in quest'ultima era presente anche il gioco individuale, il comportamento ludico in Bonnie si presentava solo in coppia con la figlia.

Confrontando ancora i comportamenti dei due animali, questa volta considerando il secondo periodo di osservazione, ciò che subito colpisce è una notevole incidenza dello stazionamento alle porte in Bonnie, visibile anche in Cleo, ma con incidenza minore, anche se aumentata rispetto al primo periodo: anche qui, però, vale il discorso che ho riportato sopra, circa il tipo di campionamento.

Un altro particolare di grande rilievo è la fortissima incidenza del gioco e del comportamento esplorativo di Cleo.

Diminuiscono leggermente (ma significativamente) le interazioni non aggressive tra i due animali e cala bruscamente l'incidenza del nuoto di riposo in coppia; vi è ancora una certa differenza tra i due individui per quanto riguarda le interazioni con l'osservatore, mentre nel caso di quelle con i visitatori, tale differenza tra i due soggetti non è statisticamente significativa.

Si deve inoltre ricordare che a partire dal secondo periodo di osservazione è stato intrapreso un programma di arricchimento ambientale, che includeva anche l'uso di *food-dispensers*: l'incidenza dell'utilizzo di quest'ultimi risulta decisamente maggiore in Cleo.

Passando al terzo periodo di osservazione, si nota ancora una volta la forte presenza, in entrambi gli animali, dello stazionamento alle porte; rifacendomi sempre al discorso riguardante la differenza tra l'incidenza di un comportamento ed il tempo speso nell'esplicazione di questo, riteniamo che, in effetti, il comportamento di Bonnie e Cleo, a questo proposito, fosse notevolmente diverso.

Vi è pure una notevole differenza nell'incidenza del nuoto casuale, che nel caso di Cleo è maggiore, mentre Bonnie mostra più frequentemente il nuoto rilassato.

Ancora presente è la differenza, statisticamente significativa, tra i due soggetti, a proposito del comportamento ludico ed esplorativo e lo stesso avviene riguardo le interazioni con l'osservatore e con i visitatori; anche i *food-dispensers* vengono utilizzati con maggior frequenza da Cleo.

Passando all'analisi di quali siano le differenze comportamentali rilevabili in ciascun animale, nel succedersi dei tre periodi di osservazione, si nota in Bonnie un progressivo incremento dello stazionamento alle porte, che risulta statisticamente significativo tra il primo ed il secondo periodo ed anche tra il secondo ed il terzo. Lo stazionamento in superficie mostra una diminuzione significativa passando dal primo al secondo periodo e nuovamente un incremento, anch'esso statisticamente significativo, dal secondo al terzo periodo di osservazione.

Il nuoto di riposo va progressivamente diminuendo e così pure il nuoto di riposo in coppia; il nuoto vigile compare praticamente solo nel primo periodo di osservazione.

Per quanto riguarda l'allattamento, si nota una leggera diminuzione (non significativa) tra il primo ed il secondo periodo ed il suo azzeramento nel terzo periodo, quando invece vi è un deciso aumento delle interazioni sociali aggressive, accompagnato da una significativa diminuzione delle non aggressive.

Il programma di arricchimento ambientale prevedeva anche un incremento del tempo speso dagli addestratori con gli animali durante il *feeding*: si registra un aumento delle interazioni di Bonnie e Cleo con gli addestratori, significativo tra il primo ed il secondo periodo, nonché tra il primo ed il terzo.

Molto interessante, sempre per quanto riguarda Bonnie, è il netto incremento, statisticamente significativo, del comportamento esplorativo durante il terzo ciclo di osservazioni; non si nota tale incremento nel comportamento ludico.

Considerando le variazioni comportamentali di Cleo, così come è stato fatto per Bonnie, si nota un incremento significativo dell'incidenza dello stazionamento alle porte, progressivamente dal primo al terzo periodo; si ricordano però, le considerazioni già fatte a tal proposito.

Lo stazionamento in superficie subisce una brusca diminuzione dal primo al secondo periodo, per poi mostrare un certo incremento nel terzo, nonostante esista ancora una differenza significativa tra quest'ultimo ed il primo periodo di osservazione.

Passando dal primo periodo ai successivi, il nuoto di riposo scompare; come si è già detto, diminuisce progressivamente il nuoto di riposo in coppia ed il nuoto rilassato presenta un'incidenza minore nel secondo periodo, per poi aumentare nuovamente nel terzo; il nuoto rilassato in coppia cala notevolmente durante il terzo ciclo di osservazioni, rispetto alla frequenza con cui si riscontrava precedentemente. Anche nel caso di Cleo, il nuoto vigile praticamente scompare dopo il primo periodo.

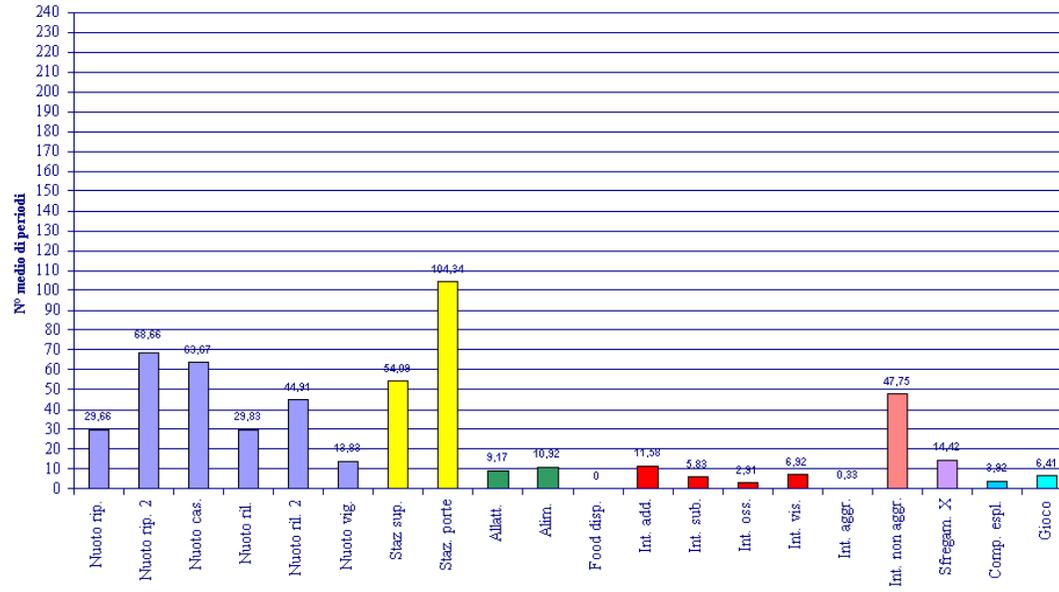
I comportamenti ludico ed esplorativo mostrano un incremento dal primo al secondo periodo di osservazione, per poi decrescere, soprattutto il gioco, che si riporta ai valori iniziali, nel terzo.

Come è stato già detto parlando di Bonnie, vi è una progressiva diminuzione delle interazioni sociali non aggressive, soprattutto nel terzo periodo, quando compaiono in modo evidente le interazioni aggressive tra i due animali.

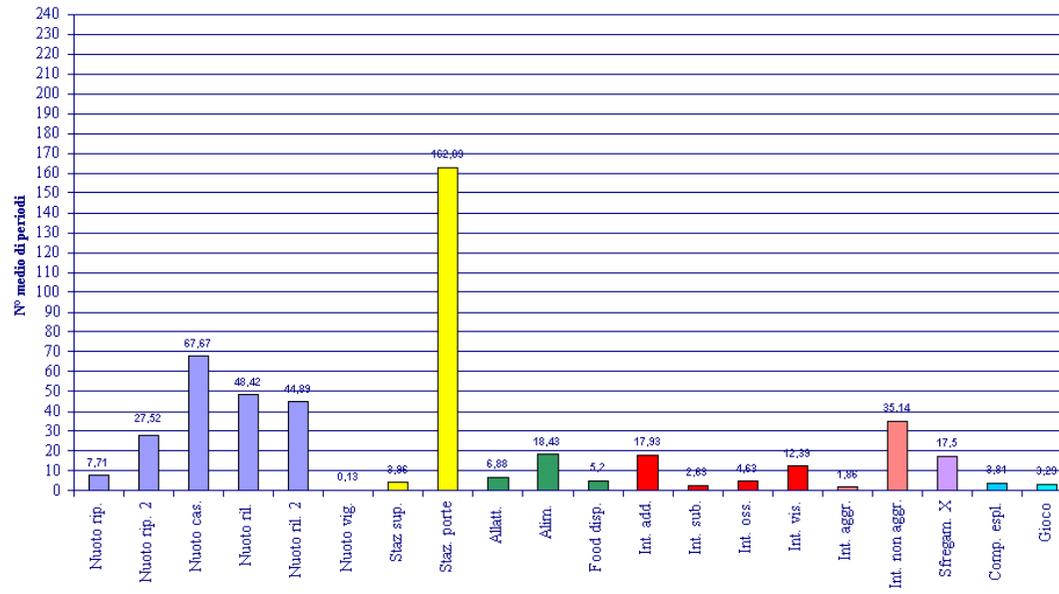
Le interazioni di Cleo con l'osservatore aumentano progressivamente.

L'uso dei *food-dispensers* cala leggermente nel terzo periodo, ma senza che la differenza rispetto al precedente sia significativa.

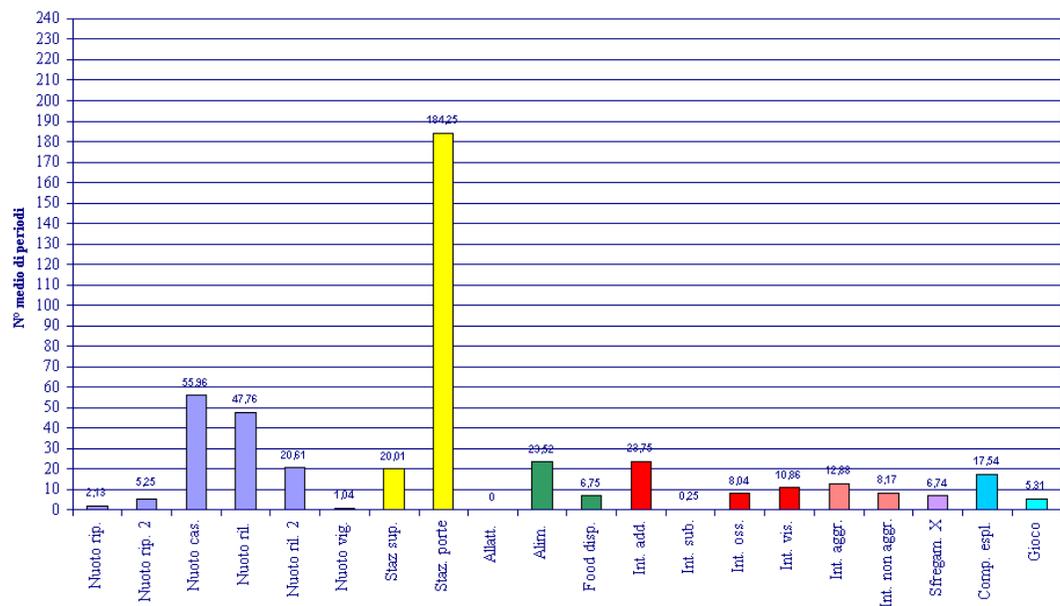
Giornata tipo 1° periodo - Bonnie



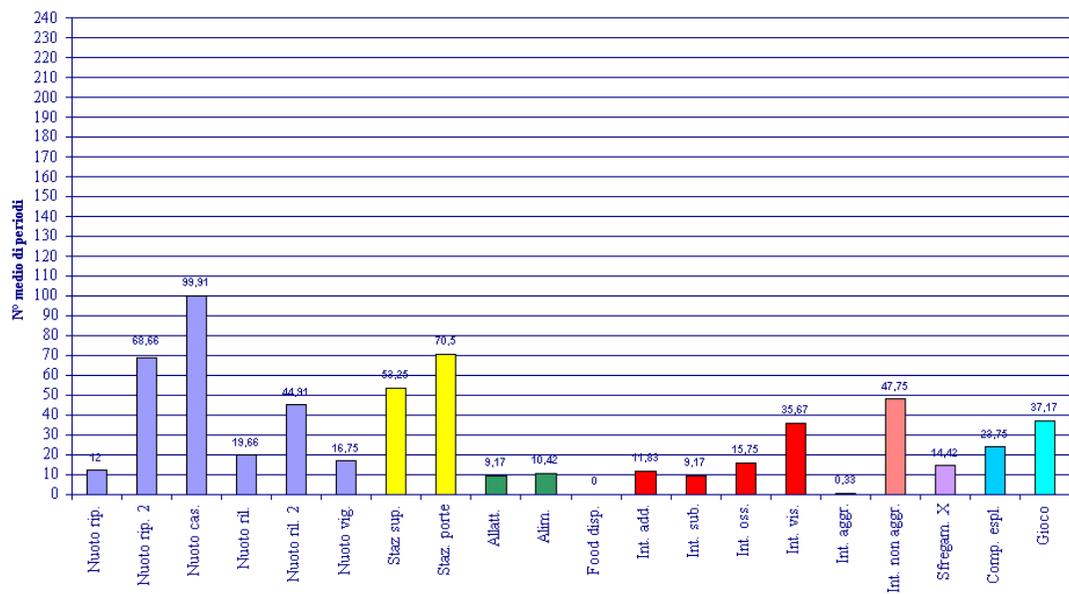
Giornata tipo 2° periodo - Bonnie



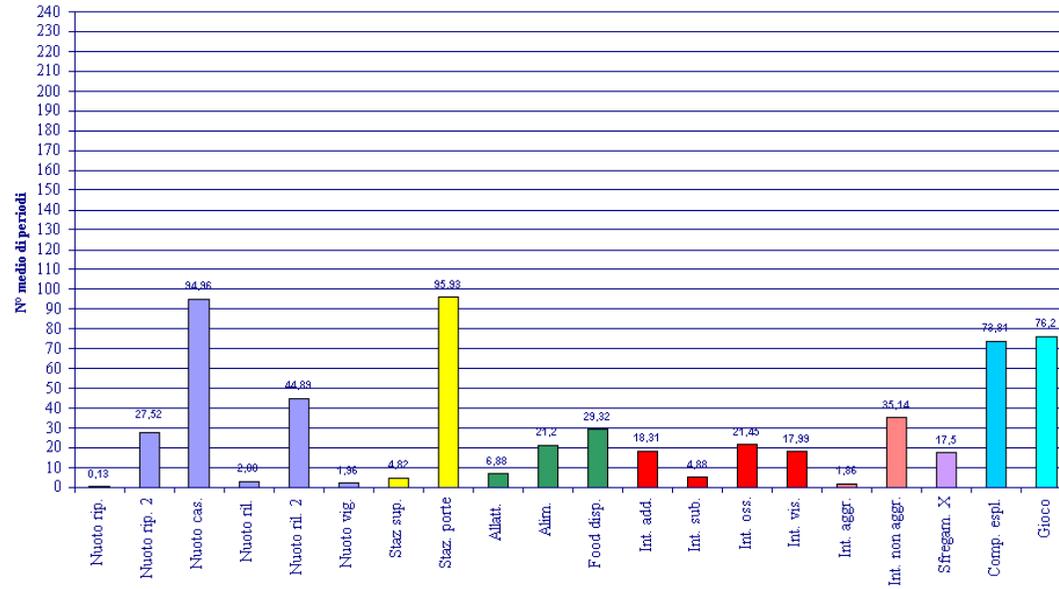
Giornata tipo 3° periodo - Bonnie



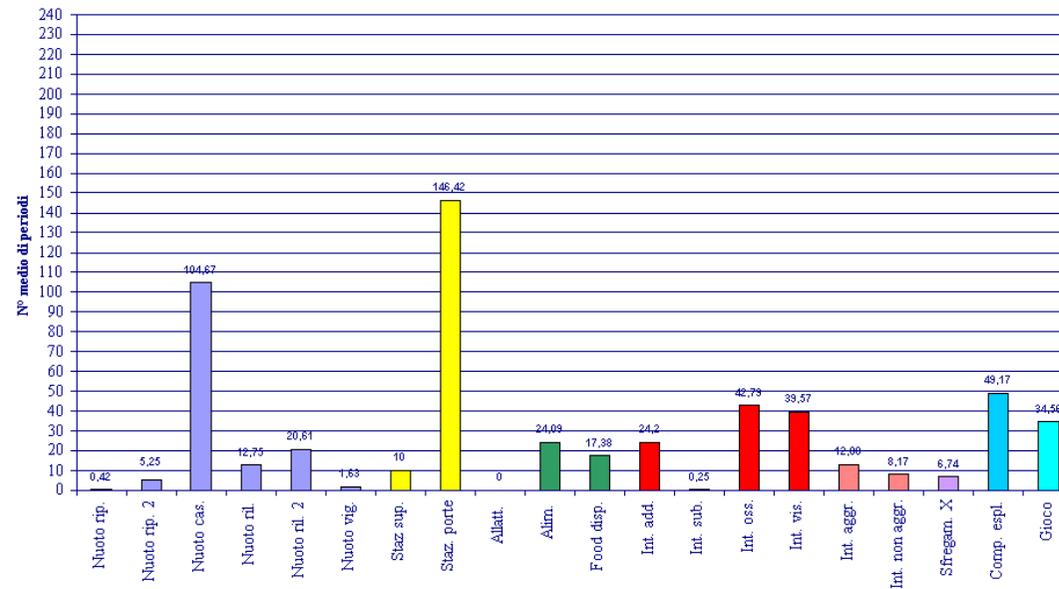
Giornata tipo 1° periodo - Cleo



Giornata tipo 2° periodo - Cleo



Giornata tipo 3° periodo - Cleo



Il programma di arricchimento ambientale prevedeva, a partire dal secondo ciclo di osservazioni, l'inserimento in vasca di un certo numero di giochi; secondo ciò che si era inizialmente deciso, sarebbe stato posto in acqua un solo gioco alla volta e questo non sarebbe rimasto in vasca per più di due ore, al fine di evitare la progressiva perdita di interesse da parte degli animali; inoltre, sempre allo stesso scopo, ogni gioco non sarebbe stato proposto per due giorni consecutivi. In realtà, per vari motivi, non dipendenti da chi effettuava la ricerca, tutto ciò non si è verificato: i giochi venivano posti in acqua anche non singolarmente e senza un ordine preciso; inoltre vi rimanevano per tempi variabili. Per questo motivo non è stato possibile verificare statisticamente se Cleo avesse preferenza per determinati giochi o meno. L'uso di questi, infatti, è stato esclusivo del giovane animale che, al momento della raccolta dei dati, aveva circa 2 anni. I giochi introdotti in acqua erano di vario tipo: alcuni galleggiavano, mentre altri andavano sul fondo; avevano inoltre forme e dimensioni diverse. Ci è sembrato che, in generale, Cleo preferisse i giochi dotati di una certa mobilità, che potevano essere facilmente trasportati in giro per la vasca: tra questi vi era una corda con un anello a un capo; con essa Cleo giocava per tempi prolungati: nuotava portandola sulle pinne pettorali o tenendo l'anello attorno al rostro e quindi, per esempio, la passava alla pinna caudale o alla dorsale, mostrando svariate movenze. I giochi che si depositavano sul fondo, invece, talvolta venivano trasportati sulla scogliera, vicino alla superficie e quindi lasciati ruzzolare, per poi ricominciare daccapo. Questi ultimi giochi contenevano sassolini all'interno, i quali servivano appunto a farli affondare e che, con l'uso, in parte fuoriuscivano, finendo a loro volta sul fondo; ciò stimolava nuovamente l'interesse di Cleo, che spesso "soffiava l'acqua" sul fondo stesso, muovendo tali sassolini.

L'azione di "soffiare l'acqua" è stata descritta anche da Gnone (1991), oltre che da altri Autori e consiste nel raccogliere l'acqua all'interno della bocca e quindi "soffiarla" con forza per smuovere piccoli oggetti. Altri comportamenti utili per indagare il fondo sono la "spazzata" e la "ispezione del fondo". La prima consiste nell'ispezionare l'oggetto che è fonte di interesse con il rostro, quindi spostarsi in avanti portando la pinna caudale in corrispondenza dell'oggetto stesso e, con un potente movimento verso il basso della pinna, creare una corrente in grado di sollevare l'oggetto, che può essere subito afferrato in quanto, con il movimento descritto, l'animale viene a trovarsi con il rostro nuovamente sopra di esso. Durante la "ispezione del fondo", invece, la corrente viene prodotta attraverso movimenti del capo sul piano orizzontale, con il corpo dell'animale posto parallelamente e molto vicino al fondo (Gnone, 1991). Entrambi i comportamenti descritti erano presenti in Cleo, come attività ludico-esplorative. Tali comportamenti, in natura, sono presenti all'interno delle strategie di caccia individuali e la loro presenza nel gioco rappresenta una sorta di esercizio che prepara i giovani alle situazioni che si troveranno ad affrontare nella vita adulta.

Abbiamo notato che Cleo, soffiando sul fondo, spesso spingeva un sassolino dentro uno dei fori di uscita dell'aria in pressione (tale sistema non era attivato). Inizialmente ho pensato che ciò fosse casuale, ma poi ci siamo resi conto che, in effetti, ciò era il risultato di una ben precisa volontà di Cleo, che spesso prendeva un sassolino in bocca, per poi portarlo vicino a un foro e quindi soffiavvelo dentro. L'abitudine di portare piccoli oggetti in bocca era frequente in Cleo e ciò accadeva non solo con i sassolini, ma anche con frammenti di alghe. Il gioco compariva anche durante il pasto, in quanto, talvolta, prima di ingerire il pesce, l'animale lo prendeva e lo rilasciava più volte (gli animali venivano nutriti con pesce già morto). Un altro comportamento ludico-esplorativo era caratterizzato dal porre il rostro nelle bocchette di mandata, aprendo e chiudendo la bocca, giocando con il flusso d'acqua in uscita. Spesso Cleo vi portava un frammento di alga o un sassolino, che veniva subito spinto fuori dalla corrente: Pilleri (1986) ha descritto una femmina di tursiopo che giocava in modo analogo con una penna di pellicano.

Il comportamento ludico individuale compare anche senza l'uso di oggetti: l'animale può eseguire salti, avvistamenti, capriole, tonfi di coda, emettere bolle d'aria dallo sfiatatoio ed assumere varie posture. Il tonfo di coda consiste in un movimento che viene compiuto vicino alla superficie dell'acqua: l'animale alza la pinna caudale fino al livello della superficie stessa e quindi la spinge violentemente verso il basso creando un vortice ed un rumore sordo. Da quanto abbiamo osservato ed anche in base a ciò che già è stato riferito da uno di noi (Gnone), possiamo affermare che il tonfo di coda nei tursiopi è sicuramente un segnale, tra l'altro sia visivo che sonoro, e, secondo noi, può avere significati diversi a seconda della situazione in cui si manifesta. Esso veniva praticato sia da Bonnie che da Cleo ed un suo significato potrebbe essere quello di richiamo e di invito a iniziare un'attività insieme: ad esempio, quando Bonnie si fermava a stazionare in superficie, Cleo spesso le nuotava attorno con un nuoto rilassato ed eseguiva tonfi di coda finché Bonnie non iniziava con lei un nuoto in coppia; se poi la madre, poco dopo, ritornava a stazionare in superficie, Cleo ripeteva il comportamento descritto. Il tonfo di coda, inoltre, compare anche durante il gioco, sia sociale che individuale, strumentale o meno. Per esempio, talvolta Cleo, giocando individualmente, eseguiva un tonfo di coda e poi si girava immediatamente, assumendo una posizione "a S" rivolta verso il vortice causato dal tonfo stesso. In altri contesti, però, lo stesso comportamento sembra avere connotati aggressivi: gli animali talvolta mostravano il tonfo di coda in associazione a chiari segnali aggressivi come il *jaw-clap*.

Il comportamento ludico dei tursiopi comprende anche l'emissione di bolle dallo sfiatatoio; esse possono essere di varie dimensioni e forme, quale quella ad anello: dopo averne prodotta una, Cleo la seguiva fino in superficie, oppure, prima che vi giungesse, la rompeva colpendola con il rostro o ancora ne produceva un'altra che andava a passare dentro la precedente. Gnone (1991) dice di aver osservato animali che emettevano bolle a forma di anello, che venivano poi seguite verso la superficie e quindi "addentate"; tuttavia egli sostiene che tale comportamento era molto più frequente negli adulti che nei giovani, mentre quello qui descritto, molto simile all'attività di cui ho già parlato Gnone, è stato rilevato soltanto in Cleo ed, occasionalmente, a Riccione, nella femmina adulta Pelè e nel giovane Tabo. Sempre a proposito del gioco individuale, soprattutto durante il primo ciclo di osservazioni, si è visto spesso Cleo nuotare in modo casuale con la bocca aperta, anche tenendo la lingua "a penzolini", spostata su un lato.

È probabile che il significativo incremento del comportamento ludico in Cleo dal primo al secondo periodo di osservazione sia stato determinato dall'inserimento dei giochi; tuttavia, pur essendo questi ancora presenti, nel terzo periodo di osservazione l'attività ludica si è riportata ai valori riscontrati nel primo: è evidente, perciò, che con il tempo, quando gli oggetti posti in acqua non costituiscono più una novità, gli animali perdono l'interesse verso di essi. Forse ciò potrebbe essere diverso se gli stimoli provenissero, anziché da oggetti inanimati, da altri organismi viventi, e se vi fosse la tendenza a ricreare il più possibile l'habitat naturale di questi animali, mentre invece le vasche dove vengono ospitati i tursiopi si presentano solitamente "sterili", nel senso che mostrano la pressoché totale assenza di stimoli ambientali.

Passando a parlare del nuoto di riposo in coppia, si è visto che esso decresce progressivamente dal primo al terzo periodo di osservazione. A nostro parere, l'iniziale calo che si registra durante il secondo ciclo di osservazioni, può essere dovuto a una minore disponibilità da parte di Cleo ad intraprendere tale attività con la madre: infatti il giovane animale era interessato ai giochi presenti in vasca e perciò spendeva più tempo nell'attività ludico-esplorativa. L'ulteriore diminuzione dell'incidenza del nuoto di riposo in coppia nel terzo periodo di osservazioni, invece, non può più essere giustificata dal comportamento ludico, in quanto questo è tornato ai valori iniziali; riteniamo invece, che una risposta la si possa trovare in una generale diminuzione dei comportamenti svolti in coppia dai due animali: si osserva infatti anche la diminuzione delle interazioni sociali non aggressive e degli sfregamenti tra madre e figlia. Durante tale periodo, l'incidenza dello stazionamento alle porte di Bonnie è elevata e si deve ricordare che, nel suo caso, anche il tempo dedicato a tale comportamento era notevole. Il motivo per cui Bonnie stazionasse così a lungo alle porte non è facile da capire; si possono però proporre alcune ipotesi: innanzi tutto è necessario spiegare che l'animale non ha mai attraversato spontaneamente tali porte; anche Cleo, durante le nostre osservazioni, non le ha mai oltrepassate, nonostante, soprattutto nel terzo periodo, vi si addentrasse parecchio, fino ad arrivare con il capo nella *holding*. Qui è poi stata improvvisamente trovata una mattina del gennaio 1998, solo che, pur vedendo e sentendo Bonnie nella vasca adiacente, non vi faceva più ritorno: entrambi gli animali si mostravano nervosi, ma nessuno dei due raggiungeva l'altro, cosicché gli addestratori hanno ricondotto forzatamente Cleo nella vasca principale. Però, dal momento in cui, un po' di tempo dopo, è stata eseguita nella *holding* una visita medica di Bonnie, Cleo ha imparato a passare senza alcun problema da una vasca all'altra; tuttavia non è mai stata seguita dalla madre. Tornando al motivo per cui Bonnie trascorrevva parecchio tempo alle porte, noi escluderemmo di interpretarlo come un tentativo di esplorazione di ciò che vi è oltre tali passaggi, nell'incapacità di vincere la paura ad attraversare quest'ultimi. Infatti, nonostante che noi non potessimo del tutto escludere la possibile presenza di una certa "curiosità" da parte di Bonnie circa l'ambiente al di là delle porte, abbiamo notato che lo stesso tipo di stazionamento, che di solito, nel caso di Bonnie, era in superficie, si verificava anche in corrispondenza dell'altra scogliera, nella quale non vi è alcun passaggio. Precisamente, lo stazionamento vicino alla scogliera di sinistra (sovrapponibile, per il motivo spiegato nella descrizione dei comportamenti osservati, a ciò che abbiamo definito "stazione in superficie") si è manifestato con un'incidenza maggiore nel primo ciclo di osservazioni, mentre ha subito un netto calo nel secondo; nel terzo, poi, è nuovamente in parte aumentato, ma senza raggiungere l'incidenza del primo periodo e comunque rimanendo sempre molto al di sotto dell'incidenza che caratterizzava lo stazionamento alle porte. In tempi successivi rispetto a quelli in cui avveniva la raccolta dei dati, Bonnie aveva iniziato a stazionare molto meno frequentemente davanti alle porte, mentre si fermava spesso in prossimità della scogliera di sinistra. Tutto ciò potrebbe essere interpretato come un cambiamento da parte di Bonnie nella scelta del luogo dove stazionare; non è semplice capire se, a tal proposito, esistessero fattori determinanti: si era pensato, per esempio, all'influenza che avrebbero potuto avere i rumori provenienti da un cantiere vicino all'Acquario.

Riteniamo importante chiederci per quale motivo l'animale stazionasse così a lungo e se ciò fosse da considerare anormale o patologico o se comunque potesse essere in qualche modo indice di scarso benessere. Osservando i soggetti presenti a Riccione, abbiamo notato la quasi totale assenza del comportamento di stazionamento in superficie, mentre, nei momenti di riposo, due o tre individui si univano ed eseguivano il nuoto di riposo assieme. A Genova, uno dei motivi della bassa incidenza del nuoto di riposo in coppia, poteva essere la scarsa disponibilità di Cleo, che, almeno durante il giorno, si dedicava maggiormente ad altre attività: è possibile, infatti, che di notte la situazione fosse diversa: durante la nostra osservazione notturna, gli animali hanno mostrato ininterrottamente, fino circa alle ore 5,00, il nuoto di riposo in coppia. Ci si può allora chiedere per quale motivo Bonnie, non potendo eseguire il nuoto di riposo in coppia con la figlia, non si impegnasse nel nuoto di riposo singolarmente. Si è cercato di trovare una risposta in base ai costi e benefici: supponendo che la condizione migliore per riposare sia quella data dal nuoto di riposo insieme ad almeno un altro individuo, visto che questa è la situazione che più frequentemente si presenta nei delfinari ed esistono testimonianze di comportamenti affini anche in natura (Norris e Dohl, 1980), si può pensare che, non essendo possibile per Bonnie il raggiungimento di tale condizione, essa trovasse più conveniente, in quel contesto, rimanere ferma in superficie, piuttosto che nuotare singolarmente. Successivamente al periodo di raccolta dei dati, si è visto che quando le condizioni ambientali venivano mutate, creando un maggior movimento della massa d'acqua, l'animale riprendeva a nuotare, e ciò forse perché, in seguito a tali mutamenti, lo stazionamento in superficie si sarebbe rivelato più dispendioso rispetto al nuoto. Se tutto ciò fosse corretto, il comportamento di Bonnie sarebbe stato da considerare semplicemente anormale. Per verificare che non fosse invece patologico, si dovrebbero studiare i cambiamenti comportamentali dell'animale ora che si trova inserito in un nuovo contesto sociale, che le permette contatti con individui adulti e perciò con le sue stesse esigenze: si dovrebbe verificare se il suo attuale comportamento sia paragonabile a quello che solitamente si osserva nei tursiopi in vasca o se invece continui a stazionare in superficie per tempi prolungati: in quest'ultimo caso tale comportamento sarebbe probabilmente da ritenersi patologico.

Le interazioni aggressive, nel primo e nel secondo periodo di osservazione, sono da considerare assenti; durante il terzo periodo, invece, Bonnie ha presentato aggressività, resa evidente da *jaw-claps*, *breaching* (l'animale fuoriesce dall'acqua con buona parte del corpo e quindi vi ricade su un fianco), inseguimenti e *tooth-rakes* sul corpo di Cleo. Contemporaneamente vi sono state la scomparsa dell'allattamento, la netta diminuzione delle interazioni non aggressive ed, in generale, le attività svolte in coppia dai due animali hanno subito un calo dell'incidenza. Tale aggressività, potrebbe essere il risultato del conflitto, al momento dello svezzamento, fra le opposte esigenze di madre e figlia: infatti, anche le cure parentali devono essere considerate in termini di costi e benefici: subito dopo la nascita, il piccolo trae un enorme beneficio dalla madre, senza la quale non sarebbe in grado di sopravvivere; quest'ultima, a sua volta, ha costi energetici contenuti ed inoltre ha convenienza ad aumentare le probabilità di sopravvivenza della prole al fine della trasmissione dei propri geni alle generazioni successive. Con il passare del tempo però, soprattutto dal momento in cui il figlio inizia a essere in grado di nutrirsi da solo, i benefici vanno via via per lui diminuendo, ma principalmente aumentano i costi per la madre. Così si crea un conflitto tra le esigenze opposte del genitore e del figlio che, traendo comunque un vantaggio, tende a massimizzare le richieste; così, man mano che i costi divengono eccessivi, la madre allontana la prole, rifiutando di nutrirla ulteriormente (Trivers, 1974). Dopo un po' di tempo, gli

episodi di aggressività tra i due animali sono andati diminuendo, fino a scomparire.

Descriviamo poi un comportamento interessante rilevato in Bonnie: un giorno in cui l'afflusso di visitatori era notevole e quindi vi era parecchio movimento di persone davanti all'acrilico, Bonnie, dopo alcuni tonfi di coda, ha iniziato a eseguire *jaw-claps* ed a picchiare violentemente la pinna caudale contro l'acrilico. Inizialmente abbiamo pensato che fosse stata in qualche modo disturbata dal pubblico, ma poi abbiamo assistito a comportamenti simili anche in occasioni in cui, almeno apparentemente, non vi erano fattori esterni che potessero causare particolare disagio. In un'occasione, però, abbiamo notato che poco prima che tale reazione di Bonnie si manifestasse, i due animali stavano eseguendo il nuoto di riposo in coppia; poi Cleo si è staccata dalla madre per intraprendere un'attività ludico-esplorativa: a questo punto Bonnie ha mostrato il comportamento descritto e subito dopo la figlia è tornata al suo fianco, riprendendo il nuoto che aveva interrotto. Tale comportamento potrebbe rappresentare un'attività ridiretta: infatti Bonnie, anziché dirigere la propria azione verso la causa che l'aveva evocata, l'ha indirizzata verso un oggetto diverso, inducendo la figlia, comunque minacciata, a cambiare il proprio comportamento.

Le interazioni sociali non aggressive presentano un'incidenza maggiore nei primi due periodi di osservazione; esse comprendono anche comportamenti dal contenuto chiaramente sessuale: diverse volte abbiamo visto Cleo che, nuotando con la madre, inseriva un apice della pinna caudale o di una pettorale di quest'ultima nella propria fessura genitale. In tali occasioni, spesso veniva anche manifestato un comportamento detto "allattamento invertito", caratterizzato da una sequenza di azioni identiche a quelle che si riscontrano in un normale allattamento, con la differenza che i ruoli dei due animali sono invertiti. Benoldi (1995) sostiene che tale comportamento possa avere una funzione a lungo termine, in quanto potrebbe rappresentare un'opportunità per la piccola di imparare una tecnica che un giorno, quando sarà a sua volta madre, le sarà utile. Secondo questa ipotesi, anche la madre trarrebbe vantaggio dall'allattamento invertito; infatti, solo se la figlia diventerà a sua volta una buona madre, la trasmissione del patrimonio genetico potrà essere assicurata. Per poter confermare tale ipotesi, l'osservazione di una sola coppia madre-figlia non è sufficiente, perciò bisognerebbe vedere se tale comportamento si verifica anche in altre coppie analoghe. Inoltre, a nostro parere, si dovrebbe comunque ammettere che tali comportamenti, al pari del comportamento ludico, siano anche immediatamente remunerativi. Infatti, per quanto si ritenga interessante l'ipotesi della Benoldi, riteniamo non debba essere sottovalutata la semplice funzione di coesione sociale di simili comportamenti.

La masturbazione è spesso presente nei tursiopi: noi abbiamo talvolta visto Cleo sfregare la zona genitale sul fondo o su vari oggetti presenti in acqua; in particolare ricordiamo di averla vista usare una maniglia dotata di due ventose, che serviva ai sommozzatori durante la pulizia della vasca e che era stata dimenticata in acqua. Dapprima Cleo vi si sfregava contro e poi, lasciandola appoggiata sul fondo, ha inserito parte di una delle ventose nella propria fessura genitale. Un particolare che abbiamo notato è che, durante i comportamenti sessuali, sia nel caso in cui si trattasse di interazioni con la madre, sia quando era previsto l'uso di oggetti, Cleo apriva la bocca.

A partire dal secondo periodo di osservazione, oltre ai giochi, sono stati introdotti i *food-dispensers*. Questi altro non sono che contenitori di plastica dotati di alcuni fori; una volta messo il pesce all'interno, essi venivano gettati in acqua: muovendoli, gli animali dovevano fare in modo che il pesce fuoriuscisse. Tutto ciò era finalizzato al prolungamento del periodo appetitivo che precedeva, in questo caso, l'attività di alimentazione. In natura, infatti, gli animali impiegano molto tempo nella ricerca del cibo, cosa che non avviene in cattività, dove, data la carenza di stimoli ambientali, molti moduli comportamentali scompaiono, mentre contemporaneamente si manifestano comportamenti anormali (Pigozzi, 1992). La prima a utilizzare i *food-dispensers* è stata Cleo, mentre Bonnie inizialmente quasi li ignorava, avvicinandosi a essi quando ormai la figlia li aveva svuotati del contenuto. Inoltre, la prima volta in cui i *food-dispensers* sono stati messi in vasca senza prima far eseguire alcun esercizio agli animali, Bonnie è rimasta per parecchio tempo vicino al bordo vasca come in attesa di una normale sessione e non ha affatto considerato i *food-dispensers*; dopo un po' di tempo, comunque, anch'essa ha iniziato a utilizzare i *food-dispensers* non appena questi venivano posti in acqua dimostrandosi molto abile; tuttavia l'incidenza nell'uso dei *food-dispensers* era diversa nei due animali e, precisamente, maggiore in Cleo: questa, infatti, dopo averli svuotati, continuava a usarli come un gioco, mentre, per quanto riguarda Bonnie, tale aspetto era mancante. E' importante notare, però, che nella femmina adulta si è registrato un deciso aumento del comportamento esplorativo durante la fase appetitiva: infatti, con l'avvicinarsi del momento del pasto, Bonnie mostrava un comportamento di ricerca ben evidente e che si manifestava attraverso l'ispezione del fondo, la spazzata ed il soffiare sul fondo; inoltre Bonnie ispezionava quei giochi che apparivano simili ai *food-dispensers*. Il prolungamento del periodo appetitivo è stato registrato anche in Cleo.

Per quanto riguarda le interazioni con i sommozzatori, queste si svolgevano durante le operazioni di pulizia della vasca. Talvolta Cleo mostrava un comportamento particolare: nuotava rimanendo vicina alla superficie e, quando passava in corrispondenza di un sub, eseguiva un tonfo di coda. In genere, all'ingresso in vasca dei sommozzatori, gli animali nuotavano in coppia rimanendo vigili e poi vi si avvicinavano, talvolta urtandoli volontariamente; tuttavia tale comportamento non era mai aggressivo, ma rappresentava piuttosto un invito al gioco e all'interazione. Inoltre gli animali (Cleo in particolar modo) si fermavano vicino ai sub, osservando ciò che questi stavano facendo; l'osservazione delle azioni umane da parte dei tursiopi si riscontra frequentemente nella bibliografia. Da quanto abbiamo visto, gli animali, soprattutto Cleo, potevano essere interessati non solo a ciò che accadeva all'interno della vasca, ma anche oltre l'acrilico: per esempio, nell'occasione in cui due tecnici hanno svolto un lavoro di circa 20 minuti in prossimità di questo, Cleo è rimasta tutto il tempo a osservare, riemergendo solo per respirare.

Le interazioni con l'osservatore ed i visitatori avevano un'incidenza maggiore in Cleo rispetto a Bonnie.

Conclusioni

Per quanto riguarda il quadro comportamentale generale degli animali osservati, l'alta incidenza dello stazionamento rappresenta senz'altro un fenomeno insolito. Nel contesto in cui è stato osservato potrebbe trattarsi di un comportamento adattativo e quindi anormale. Si dovrebbe invece considerare patologico nel caso in cui continuasse a manifestarsi, senza più rappresentare una risposta adattativa, in nuovi contesti ambientali.

L'inserimento dei giochi ha condotto a un rapido aumento dell'attività ludica in Cleo, che però, nel tempo, è ritornata ai valori iniziali, probabilmente in seguito a un fenomeno di assuefazione.

I *food-dispensers* hanno invece avuto successo nel prolungare il periodo appetitivo dei due animali.

Parole chiave: Delfinidi, *Tursiops truncatus*, arricchimento ambientale, comportamento.

Key words: Bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, environmental enrichment, behaviour.

Mots clé: Delphinidés, *Tursiops truncatus*, enrichissement du milieu, comportement.

Riassunto

La ricerca era finalizzata alla valutazione dello stato di benessere di due esemplari di *Tursiops truncatus* in cattività. Osservando la coppia, costituita da madre e figlia, si è cercato di capire come esse trascorressero il proprio tempo e quindi sono stati studiati i cambiamenti comportamentali successivi all'introduzione di stimoli ambientali, quali giochi e *food-dispensers*. Subito dopo l'introduzione dei giochi, Cleo, la figlia, ha mostrato un aumento dell'attività ludica, ma successivamente vi è stata assuefazione. Diversamente, i *food-dispensers* hanno avuto successo nel prolungamento del periodo appetitivo nei due animali. Inoltre sono state fatte ipotesi circa il significato di alcuni comportamenti osservati.

Summary

The research aimed to value the welfare of two bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in captivity. Observing the mother-calf pair, we tried to understand how they used to spend their time and then we studied the behavioural changes following the introduction of environmental stimuli, like toys and food-dispensers. Just after the introduction of toys, Cleo, the calf, increased her playing activity, but subsequently habit arose. Otherwise, food-dispensers were successful in prolonging the appetitive period in the two specimens. We also tried to give hypotheses about the meaning of some particular behaviours observed.

Résumé

La recherche était visée à l'évaluation de l'état de bien-être de deux des exemplaires de *Tursiops truncatus* en captivité. En observant le couple, composé par la mère et la fille, on a cherché de comprendre comment elles passaient leur temps et pour cela on a étudié les changements du comportement qui vont suivi l'introduction de stimulus du milieu, tels que des jeux et des *food-dispensers*. Aussitôt après l'introduction des jeux, Cleo, la fille, a montré une augmentation de l'activité ludique, mais successivement il y a eu l'habitude. Différemment, les *food-dispensers* ont eu un succès dans la prolongation de la période appetitive dans les deux animaux. En outre on a fait des hypothèses sur la signification de certains comportements observés.

Bibliografia

- BENOLDI C., 1995. Ontogenesi del comportamento di un tursiopo (*Tursiops truncatus*) in cattività. Tesi di laurea.
- CSERMELY D., 1992. Comportamento anormale. Dizionario di Etologia, diretto da Danilo Mainardi. Ed. Einaudi, Torino.
- FLANIGAN W.T., 1974. Nocturnal behaviour of small Cetaceans. 1. The bottlenosed porpoise *Tursiops truncatus*. Abstracts 14th. Ann. Meeting of APSS, Jackson Hole, Wyoming, vol 32, pp. 26-28
- FRASER A.F., BROOM D.M., 1997. *Farm animal behaviour and welfare*. Third edition.
- GNONE G., 1991. *Tursiops truncatus*. Uno studio etologico in cattività. Tesi di laurea.
- LILLY J.C., 1964. *Animals in aquatic environment. Adaptation of Mammals to the ocean*. Handbook of Physiology, vol I, pp.741-757. Am. Physiol. Soc., Washington.
- LUGLI M., 1992. Stereotipia. Dizionario di Etologia, diretto da Danilo Mainardi. Ed. Einaudi, Torino.
- MC BRIDE A., KRITZLER H., 1951. Observations on Pregnancy, Parturition, and Post-Natal Behavior in the Bottlenose Dolphin. *Journal of Mammology* 32(3):251-267.
- MUKHAMETOV L.M., 1984. Unihemispheric Slow Wave Sleep in the Brain of Dolphins and Seals.
- NORRIS K.S., DOHL T., 1980. The Structure and Functions of Cetacean Schools. *Cetacean Behavior: Mechanisms and Functions*. Ed. Herman L. 211-255.
- PIGOZZI G., 1992. Noia. Dizionario di Etologia, diretto da Danilo Mainardi. Ed. Einaudi, Torino.
- PILLERI G., 1986. *Investigations on Catacea*. Vol XIX.
- TAVOLGA M.C., ESSAPIAN F.S., 1957. The Behavior of the Bottlenosed Dolphin (*Tursiops truncatus*): Mating, Pregnancy, Parturition and Mother-Infant Behavior. *Zoologica* 42:11-31.
- TRIVERS R.L., 1974. Parent-Offspring Conflict. *Amer. Zool.* 14:249-264.
- VALSECCHI P., 1992. Imitazione. Dizionario di Etologia, diretto da Danilo Mainardi. Ed. Einaudi, Torino.

Ringraziamenti

Si ringraziano l'Acquario di Genova, il Delfinario di Riccione, ed il Museo Civico di Storia Naturale "G. Doria" di Genova. Inoltre, per la loro disponibilità, Danilo Mainardi, Ada Bocchi, Davide Csermely, Giuseppe Notarbartolo di Sciarra e Nicola Maio.

ALLEVAMENTO, RIPRODUZIONE E REINTRODUZIONE IN AMBIENTE NATURALE DI TROTE FARIO DI "CEPPO MEDITERRANEO",
Salmo (trutta) trutta, L.

PierPaolo Gibertoni*, Federico Jelli**, PierGiovanni Bracchi***

* *Medico Veterinario*

** *Biologo specializzato in Ittiologia*

*** *Istituto di Informatica e Biomatematica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma*

Introduzione

Trattare di allevamento animale equivale a definire il rapporto che si viene a creare tra l'uomo (allevatore) e l'animale (allevato) stesso. Rapporto complesso, poliedrico, che unisce il senso di soddisfazione, di bellezza, di fruibilità di una risorsa naturale con il senso di preoccupazione ed angoscia per eventuali fallimenti nell'intento.

Tali preoccupazioni si manifestano maggiormente quando si allevano animali assai differenti da noi, come i pesci, abitanti di ambienti acquatici di cui si hanno solo conoscenze parziali.

Se poi si tratta di allevamento di pesci selvatici a rischio di estinzione, il discorso si arricchisce di responsabilità e di domande, alle quali è davvero difficile dare risposte concrete.

Innanzitutto il grande problema è come allevare soggetti abituati all'ambiente naturale, ma anche come sfruttare al meglio le loro potenzialità riproduttive, specie se proprio questa è la finalità primaria: ottenere progenie da riproduttori selvatici di ceppi autoctoni per salvaguardarne l'integrità genetica e la loro reintroduzione in quegli ambienti nei quali, per svariati motivi, le popolazioni si sono fortemente contratte o estinte.

La presente ricerca non ha la presunzione di essere l'unico modo per raggiungere il già menzionato obiettivo, ma è il frutto di esperienza decennale, osservazioni e tentativi effettuati direttamente sul campo. Tentativi non sempre riusciti, ma che, passo dopo passo, hanno permesso di mettere a punto tecniche foriere di risultati positivi.

Tutto ciò va inquadrato nell'ottica della salvaguardia del "ceppo mediterraneo" di trota fario, *Salmo (trutta) trutta*, L., che, per cause diverse, ha rischiato e sta tuttora rischiando di estinguersi.

Per questo scopo è inoltre indispensabile adottare una adeguata gestione delle acque vocate a salmonidi; gestione per la quale si avanza una proposta concreta.

Ipotesi sulle origini della trota fario di "ceppo mediterraneo" e sua attuale diffusione

La forma anadroma di *Salmo trutta* può essere considerata la progenitrice di varie altre forme, specie e sottospecie di trote viventi in gran parte d'Europa (3).

Per la loro filogenesi sembra siano stati determinanti gli aspetti morfologici dei bacini idrografici, in relazione alle vicende climatiche e geografiche svoltesi durante le glaciazioni. In particolare, per quanto riguarda il bacino del Mediterraneo, il ruolo di progenitore delle diverse forme autoctone potrebbe essere assegnato a *Salmo (trutta) macrostigma* (1, 3).

Bisogna però ricordare che gli studi riguardanti la sistematica e la zoogeografia dei *Salmo* risultano spesso difficili, anche per l'intervento dell'uomo che, visto l'interesse commerciale e della pesca sportiva, in questo ultimo secolo ha svolto cospicui ripopolamenti con materiale selezionato ed allevato in piscicoltura (14). Tutto ciò senza preoccuparsi troppo delle acque già popolate da forme autoctone. La pratica delle immissioni ha pertanto alterato il quadro distributivo originale e provocato così effetti di "inquinamento genetico" delle popolazioni indigene. Questo è anche dovuto alla facilità con la quale le varie forme di *Salmo* si ibridano tra loro (1, 6, 8).

Il risultato è la sempre maggiore difficoltà nell'individuare popolazioni autoctone pure, quelle che cioè non hanno subito fenomeni di introgressione genetica da parte del materiale introdotto.

Recenti ricerche propongono una distribuzione originale della trota fario di "ceppo mediterraneo" nelle acque appenniniche che si estende dalle Marche al Piemonte nel versante adriatico, e quelle alpine, limitatamente alle zone alte, con probabile esclusione delle Alpi orientali (2, 7).

Caratteristiche fenotipiche della trota fario di "ceppo mediterraneo"

Le osservazioni svolte in questi anni confermano che le trote fario di alcuni tratti di torrenti appenninici della provincia di Reggio Emilia e dei soggetti che da diversi anni popolano le vasche rinaturalizzate della "Troticoltura Alta Val Secchia", presentano le caratteristiche descritte da alcuni autori (2, 7, 9). In sintesi:

- macchia preopercolare scura, ben definita, circondata generalmente da macchiettatura nera;
- macchie parr verdastro-azzurre lungo i fianchi, anche nei soggetti adulti sino ad una lunghezza di circa 45-50 cm, corrispondente ad una età di 5-7 anni;
- macchiettatura fine diffusa sui fianchi e sulle pinne dorsali e adiposa;
- la colorazione della macchiettatura, che può essere rada o fitta, è generalmente diversa da soggetto a soggetto. Possiamo riscontrare soggetti con macchiettatura solo rossa, solo nerastra o bruna o ancora mista. Spesso le popolazioni di un corso d'acqua presentano differenze nel numero e nella disposizione delle macchie rispetto a quelle di altri corsi d'acqua, pur mantenendo in comune le altre caratteristiche;
- corpo slanciato e snello (specie nei soggetti di sesso maschile);
- testa relativamente grande e pinne ben sviluppate (Fig. 1).

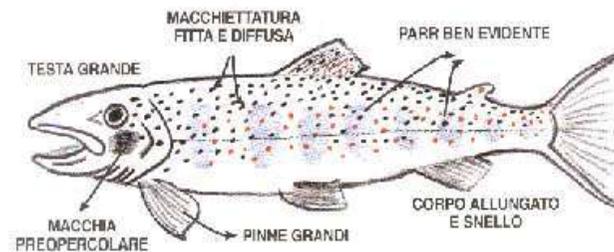


Fig. 1. Caratteristiche fenotipiche della trota fario di "ceppo mediterraneo".

Attuale diffusione della trota fario di "ceppo mediterraneo". *Salmo (trutta) trutta l.*

L'attuale diffusione della trota fario di "ceppo mediterraneo", come risulta da diversi studi, è fortemente ridotta (2,3,9). E' evidente che non si sono operati censimenti in ogni corso d'acqua della penisola, ma le ricerche compiute hanno evidenziato che anche in quelle acque dove sono presenti soggetti autoctoni, si ritrovano trote di ceppo atlantico e forme intermedie.

Questo fatto, come già esposto, è dovuto ad immissioni eseguite di solito per incrementare la pescosità e la taglia media dei soggetti nelle acque di interesse piscatorio. Infatti popolazioni di "ceppo mediterraneo" più omogenee e "pure" si riscontrano in acque di difficile accesso, in assenza di strade per automezzi e di sentieri di facile fruibilità, o in corsi d'acqua di scarso interesse piscatorio, scampati così alle semine di materiale di allevamento. Anche ostacoli o barriere, naturali o artificiali, come cascate, rapide, briglie e dighe, possono avere paradossalmente concorso alla salvaguardia di tratti che sono divenuti "oasi" di naturale protezione del ceppo autoctono, scongiurando cioè il rischio di introgressione genetica da parte di ceppi estranei. Il paradosso deriva dal fatto che di norma gli sbarramenti, specie se artificiali, portano degrado ed impoverimento della fauna ittica per palese ostacolo alle normali e talvolta indispensabili migrazioni trofiche e riproduttive.

I bacini idrografici nei quali è stata accertata da diversi Ittiologi la presenza di popolazioni "mediterranee" sono:

bacino della Dora Riparia e del Pellice (Torino), bacino del Magra (La Spezia), bacini del Secchia e dell'Enza (Reggio Emilia), bacino dell'Arno (Alto Casentino) e del Marecchia (Pesaro).

E' possibile, e quanto mai auspicabile, che diversi corsi d'acqua in altri bacini idrografici ospitino popolazioni stabili di Salmo (trutta) trutta. Comunque sino a quando altrove non ne sarà accertata la presenza, le aree sopra menzionate debbono essere ad ogni titolo considerate "preziose" e vi si dovranno in ogni modo preservare le popolazioni autoctone di trota fario.

Allevamento e riproduzione artificiale della trota fario di "ceppo mediterraneo"

Caratteristiche dei riproduttori

Tutti i riproduttori attualmente presenti nell'impianto sono stati pescati nei corsi d'acqua vicini alla piscicoltura, alto tratto del fiume Secchia, torrente Riarbero, torrente Ozola e torrente Dolo, mediante tecniche di pesca poco cruenta (pesca con la mosca), mantenuti vivi in appositi contenitori ossigenati e, successivamente, trasportati nelle vasche di stabulazione.

La selezione dei soggetti migliori da avviare alla fecondazione artificiale è stata e viene tuttora attuata tenendo in considerazione rispettivamente l'età, il sesso e le caratteristiche fenotipiche dei pesci. In particolare, l'età media dei riproduttori di sesso maschile va dai due ai cinque anni, mentre quella delle femmine spazia dai tre agli otto anni. Inoltre gli animali vengono sottoposti a rigorosa profilassi sanitaria e sostituiti per progressivo turnover, con eliminazione diretta o per mortalità naturale degli individui più anziani e debilitati, al fine di evitare l'insorgenza di possibili tare genetiche nelle progenie.

Selezione dei riproduttori

La selezione dei riproduttori è incentrata essenzialmente su 5 parametri:

- o caratteristiche fenotipiche*
- o accrescimenti medi annui*
- o numero di uova prodotte per Kg di peso vivo*
- o dimensioni delle uova prodotte*
- o periodo di maturazione delle uova.*

Per poter seguire la crescita dei riproduttori si è provveduto al campionamento di buona parte dei soggetti più significativi, circa 90 su 130.

Per non arrecare danni o lesioni ai riproduttori si sono effettuate sotto anestesia le misurazioni del peso in grammi (Bw) e della lunghezza totale in mm (L.T.), e si è provveduto a fotografare i soggetti, riposti su di un fianco, per potere così cogliere elementi distintivi della livrea per future identificazioni e misurazioni. Con tale metodo, in questi ultimi tre anni, si è potuto constatare anche il mutare della livrea di taluni soggetti. In questo modo è possibile seguire, anno dopo anno, lo sviluppo e i cambiamenti dei diversi riproduttori presenti in vasca.

Tornando alle modalità di selezione, le caratteristiche fenotipiche prese in considerazione sono quelle già esposte nei paragrafi precedenti, e cioè la presenza della macchia preopercolare, della macchiettatura fine, fitta o rada, delle macchie parr sui fianchi, ecc. (Figg. 2-3).



Fig. 2 e Fig. 3 - Riproduttori di sesso maschile e di sesso femminile, con caratteristiche fenotipiche selezionate, utilizzati nell'impianto per le operazioni di fecondazione artificiale.

Il campionamento e il costante controllo degli accrescimenti dei riproduttori ha consentito in questi anni di calcolare un "intervallo" dal quale è possibile riconoscere anomalie nell'accrescimento legate probabilmente alle peculiarità genetiche dei soggetti.

Altri caratteri selettivi riguardano il numero di uova prodotte per Kg di peso vivo e la dimensione delle stesse.

Recenti studi sulle popolazioni di trote autoctone dell'Appennino Reggiano (7, 9) hanno evidenziato che il numero medio di uova prodotte per Kg peso vivo è 1428,25 con diametro medio pari a 4,485 mm.

Il numero di uova prodotte varia anche con l'età del soggetto; si è potuto constatare che una trota presumibilmente di "ceppo mediterraneo" produce per Kg di peso vivo: all'età di tre anni in media 1300-1600 uova, dai quattro ai cinque anni d'età mediamente 1400-1800 uova, dai sei agli otto anni d'età in media 1500-1700.

Per quanto concerne la dimensione delle uova, si effettua la selezione delle femmine scegliendo quelle con uova di diametro compreso tra i 4 e 4,7 mm.

Anche in questo caso la crescita del soggetto influisce sulle dimensioni dell'uovo: femmine primipare producono uova di circa 3,8-4,1 mm di diametro; fattrici al quinto sesto anno di età producono uova con diametro pari a 4,5-4,8 mm.

Trote fario di allevamento, di presunto "ceppo atlantico", arrivano a produrre dalle 2.000 alle 2.700 uova per Kg di peso vivo con diametro compreso tra 5 e 5,5 mm.

Questi due parametri selettivi, numero e dimensione delle uova, assieme all'accrescimento medio annuo dei soggetti, rappresentano indici quantitativi strettamente legati al genotipo. Infatti in questi ultimi decenni l'acquacoltura tradizionale, cioè quella indirizzata alla velocità di accrescimento dei pesci e alla loro capacità di utilizzazione del cibo somministrato, ha sempre operato selezioni premianti la domesticità, il rapido accrescimento, il maggior numero di uova prodotte, la maggior dimensione della larva alla nascita (che è direttamente proporzionale al diametro dell'uovo), ecc. (4, 12); tutto questo a discapito della rusticità e della capacità di adattamento ad ambienti naturali.

La "Troticoltura Alta Val Secchia" opera selezioni in senso inverso.

Il periodo di maturazione delle uova si è rivelato un buon indicatore di riconoscimento della trota fario di "ceppo mediterraneo".

Recenti indagini eseguite per la Provincia di Reggio Emilia hanno evidenziato come nei corsi d'acqua appenninici sia breve il periodo di frega. Più in particolare le popolazioni di trote indigene del torrente Dolo depongono le uova nell'arco di tre settimane, a partire dalla metà di dicembre; quelle del torrente Riarbero due settimane prima, in coincidenza con quelle dell'alto fiume Secchia.

Si effettua così la selezione dei riproduttori stabulati anche scartando i soggetti che non depongono nei mesi di dicembre e gennaio.

Nella Tabella 1 sono riportate le percentuali sulla totale produzione di uova rispetto al periodo. Come si può evincere dai dati, il momento di massima produzione è tra il 20 dicembre ed il 20 gennaio.

Periodo	% di uova mature fecondate
01/12-10/12	10,1
11/12-20/12	11,4
21/12-30/12	19,0
31/12-10/01	23,0
11/01-20/01	21,5
21/01-30/01	10,0
31/01-10/02	5,0

Tabella 1

La selezione operata dalle piscicoltura tradizionali è invece orientata alla distribuzione delle fecondazioni artificiali in un tempo più lungo possibile; ciò evita il sovraffollamento delle avannotterie, dilazionando il periodo di incubazione delle uova in vari mesi, e potendo così avere trote di taglia o da porzione in ogni momento dell'anno. Si sono già ottenuti ceppi di trote fario con maturazione delle uova da ottobre a marzo.

Tecnica di allevamento dei riproduttori

I riproduttori, la cui biomassa attuale è valutabile in circa 130 Kg, sono stabulati in un'apposita vasca rinaturalizzata (Fig. 4), la quale ha la peculiarità di offrire un certo numero di ripari naturali, come massi di fondo, piante acquatiche, tronchi semi-sommersi, e di avere un "giro d'acqua" come una buca di un fiume. Infatti le trote possono scegliere se nuotare in corrente dove entra l'acqua, oppure in acque più calme e profonde in prossimità dello scarico.



Fig. 4 - Vasca rinaturalizzata per la stabulazione fissa dei riproduttori.

Nella zona d'ingresso dell'acqua la presenza di massi posizionati in ordine sparso garantisce alle trote di recente immissione, quelle più selvatiche, la possibilità di "possedere" un territorio da difendere: non è raro, infatti, assistere ad aggressioni a seguito di invasioni tra le "ultime arrivate" e le trote già adattate.

La gestione della vasca rinaturalizzata deve essere mirata ad un elevato livello di pulizia perché la presenza di sponde con sassi, di vegetazione acquatica, di massi e di rifugi sul fondo, facilita l'accumulo di sedimento rappresentato da feci, da resti di mangime non ingerito e da foglie in decomposizione. Particolare attenzione si deve prestare alle sponde che devono garantire un certo grado di ombreggiatura naturale. Cespugli, piccoli alberelli ubicati direttamente sul ciglio della sponda, sono da preferire ad alberi di grandi e medie dimensioni. Infatti, l'eccessiva presenza di foglie crea problemi di gestione della vasca in autunno quando queste cadono.

Se è difficile creare un ambiente ideale per i soggetti di recente immissione, lo è ancor più dare una corretta alimentazione.

Nel primo anno di stabulazione le trote selvatiche di presunto "ceppo mediterraneo" dimostrano una certa difficoltà ad accettare il cibo, specie se questo è rappresentato da mangimi pellettati o carne tritata.

Bisogna fornire loro prede vive: insetti, lombrichi da terra e soprattutto pesce-foraggio vivo (vaironi, alborelle, ...). Solo successivamente si possono somministrare pesci e gamberetti morti frammisti a mangime. Quest'ultimo in questa fase serve per "aromatizzare" l'alimento primario, facendo così abituare le trote al suo "gusto". A partire dal secondo anno di stabulazione si somministra solo mangime pellettato.

Inoltre vi sono periodi, novembre - gennaio, nei quali le fattrici mostrano scarso appetito, probabilmente per l'ingombro delle uova in maturazione; in questi mesi si riduce la somministrazione di alimenti.

Nel dettaglio, ai 130 Kg di biomassa totale dei riproduttori, da febbraio alla fine di settembre, viene fornita una quantità di mangime per riproduttori "Hendrix Trouvit - Europa Repro" pari a 5 Kg/settimana in 4-5 somministrazioni, con l'aggiunta di 100 alborelle vive e 300 gr di pesciolini o gamberetti scongelati in un'unica soluzione, una volta alla settimana. Da ottobre alla fine di gennaio dell'anno successivo la dose di mangime si riduce a 3 Kg/settimana in 3-4 somministrazioni e la quantità di pesce scongelato scende a 100 gr alla settimana. Per il solo mese di Ottobre vengono fornite anche 200 alborelle vive in 4 soluzioni.

Il mangime per riproduttori è estruso con diametro di circa 6 mm, ed è prodotto con farine di pesce, cereali in grani, oli e grassi, prodotti e sottoprodotti semi-oleosi, prodotti derivati da animali terrestri.

Le operazioni di fecondazione artificiale vengono effettuate con la tecnica "a secco" (4, 13), in apposita struttura adiacente alla vasca di stabulazione, previa anestesia dei riproduttori, sottoposti a digiuno forzato nei quattro giorni antecedenti la spremitura.

Una volta fecondate e risciacquate, le uova vengono sistemate in appositi contenitori con acqua corrente per il periodo di incubazione.

Tali contenitori sono chiamati "embrionatori verticali" e sono molto vantaggiosi perché consentono di incubare discrete quantità di uova con ridotto approvvigionamento idrico rispetto alle tradizionali "vaschette californiane", nelle quali le uova sono incubate su griglie in monostrato.

In questi anni si è osservato che le uova di trota fario di presunto "ceppo mediterraneo" necessitano di una incubazione di 420-450 gradi/giorno.

In altri termini, ad una temperatura dell'acqua pari a 10°C, il periodo fecondazione - schiusa dura 42-45 giorni.

Giunti al 38°-40° giorno di incubazione, le uova vengono distribuite sui cestelli delle batterie di svezzamento in attesa della schiusa. Dopo la schiusa, le larve di trota fario, fornite di sacco vitellino, cadono, attraverso le maglie del cestello fessurato, nell'acqua sottostante. E' bene, ogni tanto, scuotere delicatamente il cestello per favorire il passaggio delle larve. Una volta nell'acqua, le larve continuano a nutrirsi delle riserve contenute nel sacco vitellino, di norma per un periodo di 33-37 giorni ad una temperatura dell'acqua di 10°C, pari a 330-370 gradi/giorno.

Riassorbito il sacco vitellino, i neonati divengono più attivi e per qualche tempo risalgono alla superficie, nuotando all'insù. A questo stadio è molto importante che l'acqua della vasca non sia più profonda di 7-10 cm, poiché così si riduce al minimo l'energia impiegata dalle larve per venire in superficie a riempire la vescica natatoria e per cominciare ad alimentarsi.

E' questo un periodo molto critico per la vita della giovane trota, poiché, se essa non riesce ad alimentarsi autonomamente entro pochi giorni, perde la capacità di farlo ed inevitabilmente muore. Comunque non è ancora chiaro se la larva comincia già a mangiare non appena risale in superficie o se attende ancora un giorno o due. E' consigliabile comunque offrire alle larve un po' di cibo, sminuzzandolo tra le dita e distribuendolo sulla superficie dell'acqua, per vedere come esse reagiscono. Se non lo afferrano, è bene ritentare più volte a intervalli di poche ore. Sembra quasi che le piccole trote abbiano bisogno di incoraggiamento e richiedono comunque in questa fase di essere seguite con molta pazienza (4, 13).

Si definisce avannotto il soggetto che ha terminato l'assorbimento del sacco vitellino e che inizia ad alimentarsi attivamente; dopo i 3 cm di lunghezza il piccolo pesce viene definito trotella.

La tecnica di primo allevamento applicata in avannotteria è essenzialmente basata sui seguenti punti cardine:

- *Utilizzo di vasche longitudinali di 350 cm di lunghezza minima e 80 cm di larghezza massima (comunque non meno larghe di 50 cm); profondità regolabile da 5 a 25 cm.*
- *Bassa concentrazione degli avannotti nelle vasche che è bene non superino i 5.000 soggetti/mq.*
- *Ricambio idrico costante, pari a 0,4 litri/secondo per un quantitativo massimo di 10.000 soggetti.*
- *Nessuno stress da spostamento per almeno 60 giorni dalla schiusa delle uova; per logica conseguenza è corretto depositare nelle vasche di schiusa e svezzamento il quantitativo giusto in rapporto alla superficie e all'approvvigionamento idrico.*
- *Sifonamento quotidiano delle feci e dei residui alimentari per evitare formazione di sedimenti ed accumuli sul fondo; se questa operazione non viene eseguita con pazienza e dedizione, le giovani trote possono andare incontro ad una mortalità anche del 90-100%.*

- Alimentazione con mangime commerciale "Hendrix-Trouvit Perla" dalla granulometria 4.0 (0,3-0,5 mm di diametro) alla 2.0 (0,7-1 mm di diametro); il 4.0 viene somministrato per le prime cinque settimane di alimentazione attiva, ad iniziare dallo stadio di avannotto a sacco vitellino riassorbito. Il mangime viene fornito continuamente, nell'arco di otto ore, con l'utilizzo di mangiatoie ad orologio modello "Scharfling" funzionante a tapis roulant, senza necessità di energia elettrica ed è somministrato in funzione del 3% della biomassa ittica complessiva in razioni giornaliere decrescenti in relazione all'aumentare della taglia corporea dei soggetti.

Il mangime utilizzato è composto da farina di aringhe, farina di pesce norvegese, olio di fegato di merluzzo, solubili di pesce essiccati, amido di frumento, farina di frumento, lecitina di soia, betaina, BHT, L-lisina e DL-metionina.

I punti cardini sui quali si fonda la tecnica di svezzamento fin qui illustrata è frutto di anni di esperienze e di tentativi non sempre andati a buon fine.

Tale tecnica è, inoltre, molto differente da quelle tradizionali che, per motivi economici, finiscono per essere fundamentalmente speculative; basti pensare che alcuni allevatori arrivano a svezzare avannotti di trota fario ad una densità pari a 35.000 soggetti/mq, in vasche di circa 3 mq, alimentate da 1 litro/secondo di acqua corrente. A tali densità di affollamento delle vasche gli avannotti di trota fario di "ceppo mediterraneo" non sopravviverebbero più di sei giorni; in effetti ogni evento stressante è difficilmente tollerato dai soggetti in questa fase, i quali divengono fortemente sensibili ad ogni possibile agente patogeno.

Una volta raggiunti i 3,5-4 cm, tra maggio e luglio, le trotelle sono in grado di essere trasferite nelle vasche di accrescimento o di essere immesse nei corsi d'acqua per le operazioni di ripopolamento.

Da trotella a riproduttore

Ogni anno una piccola parte della produzione rimane in impianto per la rimonta e l'incremento numerico dei riproduttori. Solamente i soggetti di sesso femminile, dopo avere passato tutte le fasi delle selezioni già citate, possono entrare in produzione e divenire così "fattrici" a pieno titolo.

I maschi invece sono catturati nei corsi d'acqua e, superata la selezione, sono ospitati nella vasca rinaturalizzata al massimo per tre anni, per poi essere "riformati" e reintrodotti nelle acque di origine.

Il periodo "trotella-fattrice" dura circa tre anni, anche se vi sono soggetti precoci che già al secondo inverno di vita presentano uova mature; queste però sono generalmente poche, di dimensioni ridotte e a bassa resa di fecondazione. In questa fase le trote sono mantenute in vasche di accrescimento, rettangolari in cemento, di 2 metri di larghezza e quattro di lunghezza, e una profondità di 50 cm. Ogni vasca è alimentata da 1-2 litri/secondo di acqua corrente e possiede uno scarico di fondo per le periodiche operazioni di pulizia.

Alla fine del terzo anno di età da ogni vasca descritta è possibile ottenere 100 femmine del peso di circa 250-350 gr ciascuna, con perdite perdite complessive di circa il 30% dei soggetti stabulati.

La gestione delle vasche deve essere protesa ad una perfetta igiene mediante quotidiano sifonamento delle feci e dei residui di mangime.

Nella stagione estiva si utilizzano teli ombreggianti per ridurre l'esposizione ai raggi solari, consentendo una omogenea distribuzione delle trote sulla superficie disponibile, evitando così fenomeni patologici da stress.

Alla fine del secondo anno di accrescimento, si opera una prima selezione per scartare i maschi ed i soggetti di sesso femminile più grandi, che mostrano cioè notevole attitudine ad un rapido accrescimento corporeo. Infatti, seguendo lo sviluppo in vasca di trote fario di presunto "ceppo mediterraneo", con misurazioni di un campione casuale, si è potuto tracciare un "ideale" grafico di accrescimento (Fig. 5) e redigere una tabella con valori medi di lunghezza (LT) e peso (Bw) con i rispettivi valori di Deviazioni Standard (Tab. 2).

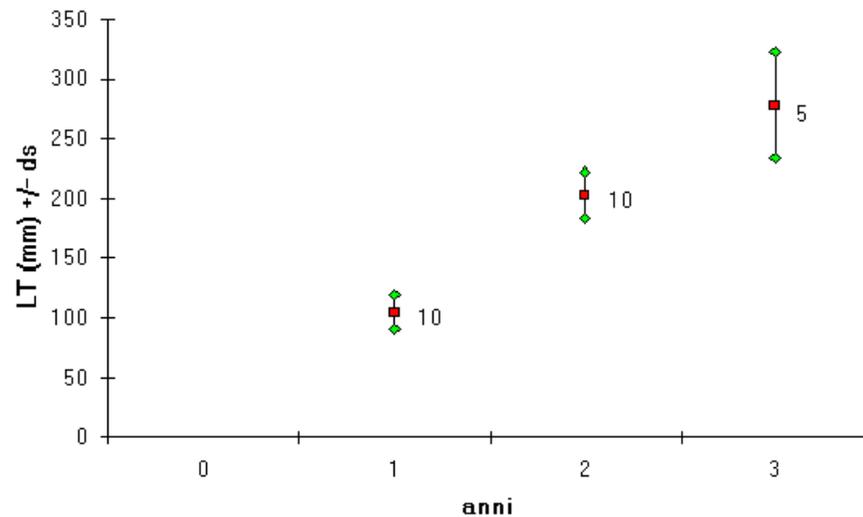


Fig. 5 - Accrescimento reale in LT (+/- ds) di trota fario, *Salmo (trutta) trutta*, L., allevata in vasca.

Età (anni)	LT (mm) ± ds	BW (gr) ± ds
1 (10)*	104,8 14,91	14,5 6,38
2 (10)	203 19,32	124,7 31,1
2 (5)	258 29,49	245,8 55,61

Tabella 2 - Accrescimento reale medio in lunghezza totale (LT) e in peso corporeo (BW), con relativi valori di deviazione standard (\pm ds).

* Tra parentesi il numero di individui appartenenti a ciascuna classe di età.

L'alimentazione è rappresentata esclusivamente da mangime "Hendrix - Trouvit Europa trote 19" composto da: farina di pesce, farina di aringhe, olio di pesce, farina di estrazione di soia tostata, farina di sangue, farina di carne suina, amido e farina di frumento, solubili di pesce essiccati, BHT, lecitina di soia, betaina, DL-metionina, L-lisina.

Viene somministrato in ragione del 1,5-2% della biomassa totale in una unica soluzione quotidiana cinque giorni alla settimana.

Dai dati in Tab. 2 emerge che l'accrescimento dei soggetti in vasca nei primi tre anni di vita è quasi doppio rispetto a quello in natura (7). Bisogna però considerare che in impianto le trote si sviluppano ad una temperatura dell'acqua costante, in ogni periodo dell'anno, contrariamente ai torrenti appenninici nei quali le oscillazioni di temperatura dell'acqua impediscono un adeguato accrescimento per circa cinque mesi all'anno. Infatti nei mesi invernali le acque dei torrenti misurano da 1°C a 4°C; temperature alle quali ogni energia disponibile per il pesce è utilizzata per il mantenimento e non per lo sviluppo.

Patologie riscontrate e profilassi

La tecnica di allevamento fin qui esposta è sostanzialmente finalizzata ad una riduzione delle possibili situazioni di stress nelle diverse fasi di accrescimento e di sviluppo delle

trote.

Infatti, in acquacoltura nella maggior parte dei casi, è proprio lo stress un fattore facilitante l'insorgere di patologie virali, batteriche o parassitarie. Sovraffollamento delle vasche, cattiva alimentazione, eccessive manipolazioni e cattive condizioni igienico-sanitarie sono in genere i determinanti di problemi più frequenti in trotaicoltura.

Comunque, benché il management aziendale sia orientato ad un elevato grado di "benessere animale", nelle diverse fasi dell'allevamento, da uovo fecondato a riproduttore, è bene effettuare opportune misure profilattiche per prevenire così possibili patologie.

Incubazione delle uova

L'incubazione delle uova si può suddividere in due fasi:

- o periodo di "uovo fecondato";
- o periodo di "uovo embrionato".

Nel primo periodo le uova devono rimanere immobili e non possono subire manipolazioni. È indispensabile però intervenire sulle uova morte per evitare che compromettano lo sviluppo delle uova vive. In effetti le uova morte sono rapidamente invase da germi della putrefazione e su di esse si impiantano e crescono rapidamente le saprolegnie, funghi ubiquitari di tutte le acque naturali, che conferiscono ad esse un aspetto cotonoso. La crescita di questi miceti può estendersi anche alle uova vicine ancora vive, finendo col danneggiarle (4, 11).

Il rimedio è rappresentato da disinfezioni con:

- a. verde di malachite ($C_{23}H_{25}ClN_2$) alla concentrazione di 1,5-3 ppm (mg/l) per un'ora una volta ogni 2 o 3 giorni;
- b. formaldeide (HCHO) in soluzione acquosa al 30% nota come "formalina" in diluizione 1:600 per 15 minuti ogni giorno o alla dose di 1-2 cc per litro di acqua fluente per 15 minuti al giorno.

Oggi, essendo vietato l'uso di verde di malachite, si fa uso principalmente di formalina.

Nella fase di uovo embrionato, cioè dopo che sono ben visibili gli abbozzi oculari dell'embrione, si sospendono le disinfezioni. Si procede allora alla pulizia delle uova con l'aumento del flusso d'acqua in entrata che provoca un lento rimescolamento delle uova nell'embrionatore verticale. Questo porta le uova morte, con aspetto cotonoso, a "galleggiare" sulla massa di uova vive, potendole così facilmente togliere per sifonamento.

Svezamento degli avannotti sino ai 4 cm di lunghezza

Dalla schiusa delle uova sino al momento dell'abbandono dell'avannotteria da parte delle trote, le vasche devono essere quotidianamente ripulite dalle feci, dai residui alimentari e dai soggetti eventualmente morti.

Si effettuano disinfezioni contro eventuali parassitosi branchio-cutanee generalmente provocate da protozoi che possono colpire i salmonidi determinando non poche perdite.

Ci si riferisce alla Costiasi da *Costia natrix*, all'Ictiofitiriasi da *Ichthyophthirius multifiliis*, alla Trichodiniasi da *Trichodina* sp., mentre tra le verminosi è da ricordare la Girodattilosi da *Gyrodactylus salaris*.

Si tratta di patologie facilmente prevenibili controllando i pesci regolarmente con raschiati branco-cutanei osservati a fresco al microscopio, in modo da sapere quando intervenire con "bagni corti" di formalina o sale marino (5).

Più dettagliatamente, ogni 2-3 settimane si effettuano disinfezioni con:

- a. *sale marino (NaCl) 1 Kg ogni 100 litri di acqua della vasca in una unica soluzione;*
- b. *formalina a 300 ppm per 30 minuti 24 ore dopo l'intervento a.;*
- c. *sale marino alle stesse concentrazioni del punto a., 24 ore dopo il trattamento del punto b..*

Fase di accrescimento

*Nei tre anni del periodo di sviluppo per diventare riproduttori, le trote sono sottoposte a terapie contro la Foruncolosi da *Aeromonas salmonicida* tramite la somministrazione di mangimi medicati con "Trimetosulfa" (sulfadiazina-trimetoprim), alla concentrazione di 300 gr di medicamento ogni ql di mangime, per una settimana, nei mesi di giugno e ottobre.*

Si effettuano anche disinfezioni con formalina (250 ppm/30 minuti), solo se necessarie, una volta appurata la presenza di parassiti branchio-cutanei.

Inoltre si procede sempre alla pulizia quotidiana delle vasche dai residui alimentari e dalle feci.

Riproduttori

La vasca rinaturalizzata dei riproduttori è gestita in modo differente.

Infatti le operazioni di pulizia del fondo e delle pareti si effettuano due volte l'anno, in primavera ed in autunno.

I riproduttori sono trattati con mangimi medicati contro la Foruncolosi, come per la fase di accrescimento, in giugno e ottobre.

Generalmente si effettuano disinfezioni nel periodo riproduttivo, con formalina alla concentrazione di 150 ppm/30 minuti, una volta alla settimana, come misura profilattica alle operazioni di spremitura manuale.

Proposta di gestione delle acque pubbliche vocate a salmonidi

E' evidente che la tutela delle popolazioni ittiche autoctone, soprattutto delle specie più minacciate, è strettamente collegata alla protezione della riproduzione naturale e degli habitat specifici.

A questo proposito è indispensabile che gli Enti preposti alla salvaguardia degli ambienti naturali e alla pianificazione territoriale intensifichino gli sforzi per rendere gli impatti antropici sulle acque (arginature, estrazioni di ghiaia, costruzione di sbarramenti, svasi di bacini idroelettrici, ecc.) meno pesanti per gli ecosistemi acquatici.

E' fondamentale favorire la possibilità di riproduzione e di insediamento naturale delle popolazioni ittiche, secondo il principio che solamente un ambiente altamente differenziato è in grado di offrire rifugio ad un elevato numero di specie e di soddisfarne le esigenze particolari nei diversi stadi di vita e nelle diverse attività biologiche (10).

Considerato inoltre che le popolazioni indigene in grado di automantenersi abitano corsi d'acqua, o porzioni degli stessi, che sono in un qualche modo scampati alle ingiurie dell'uomo, ne consegue che la gestione delle acque, specie di quelle vocate a salmonidi, deve forzatamente partire da una profonda ed accurata analisi delle condizioni ambientali.

Ci tengo a precisare che per "ingiurie dell'uomo" non intendo solo gli interventi tecnici sulle acque, ma anche gli interventi gestionali del passato, che possono avere aggravato ulteriormente la già pesante condizione delle popolazioni indigene di trota fario.

In questo ultimo capitolo è mia intenzione avanzare una concreta proposta gestionale delle acque da salmonidi, considerando la situazione ambientale delle acque da una parte e la qualità della fauna ittica oggi esistente dall'altra, quali punti basilari per una corretta programmazione degli interventi futuri.

Diversificazione delle acque

I corsi d'acqua possono essere suddivisi in:

- *acque pregiate;*
- *acque non pregiate.*

Le acque pregiate, a loro volta, possono essere suddivise in:

- *acque pregiate con ambiente e fauna ittica indigena integri, chiamate d'ora in avanti "Acque di Classe A";*
- *acque pregiate con ambiente integro ma con fauna ittica autoctona compromessa, definite "Acque di Classe B".*

Le acque non pregiate sono ascrivibili a quegli ambienti acquatici che hanno perso irrimediabilmente l'integrità ambientale, per la presenza di sbarramenti permanenti, di grosse derivazioni idriche, di inquinamento da scarichi fognari, ecc., e che presentano popolazioni ittiche, anche autoctone, difficilmente in grado di svolgere un adeguato ciclo biologico; queste verranno definite "Acque di Classe C".

Ognuna di queste tipologie necessita di mirati interventi di tutela, di ripopolamento e di gestione della pesca.

Le "Acque di Classe A"

Sono da ritenersi "isole felici"; purtroppo una vera rarità.

In questi corsi d'acqua è indispensabile adoperarsi per una totale tutela ambientale esigendo la costruzione di scale di risalita per pesci, se dovesse rendersi necessaria la costruzione di sbarramenti, impedire la derivazione di acque o limitarla se già esistente, bandire ogni attività in alveo, specie le escavazioni.

Non ultimo, vigilare sulle possibili fonti di inquinamento, se già esistenti, e impedirne delle eventuali future.

E' inoltre indispensabile la protezione della fauna ittica autoctona previo:

- *divieto di immissione di materiale ittico di allevamento (uova, avannotti, trotelle o adulti);*
- *interventi di "pulizia genetica" da farsi annualmente e non più tardi della fine del mese di ottobre;*
- *immissioni di materiale ittico proveniente dagli incubatoi di valle, ottenuto da spremiture di riproduttori selvatici dello stesso bacino idrografico;*
- *limitazione parziale o totale della pesca.*

In queste acque è possibile effettuare la cattura di soggetti indigeni per le operazioni di fecondazione artificiale da effettuarsi negli appositi incubatoi di valle, in numero annuo tale da non compromettere la capacità di automantenimento della popolazione autoctona del corso d'acqua d'origine.

Per quanto concerne la pesca, questa può essere limitata con l'istituzione di "Zone a Regime Speciale di Pesca", o bandita con la creazione di "Oasi della Trota Fario Autoctona".

Le "Acque di Classe B"

Con questa definizione si intendono tutti quei corsi d'acqua che posseggono tuttora una buona valenza ambientale, ma che per effetto di interventi umani (eccessiva pressione piscatoria, ripopolamenti con materiale ittico non idoneo ripetuti nel tempo, sbarramenti che impediscono le migrazioni, ecc.) o naturali (forti piene, siccità, ecc.) hanno perduto l'integrità e la consistenza delle popolazioni ittiche indigene.

La gestione di queste acque deve essere orientata verso:

- la tutela dell'ambiente naturale;
- l'eventuale limitazione della pressione piscatoria;
- il reinserimento di materiale ittico di "ceppo mediterraneo" o presunto tale, anche di allevamento;
- il controllo, previo campionamenti ittici, delle popolazioni di trota fario da ripetersi almeno una volta ogni due anni;
- il divieto di prelievo di soggetti autoctoni per la fecondazione artificiale negli incubatoi di valle.

L'obiettivo di una tale gestione è quello di ripristinare nel più breve tempo possibile la riproduzione naturale, con riqualifica ad "Acque di Classe A".

Le "Acque di Classe C"

Queste acque hanno perso irrimediabilmente l'integrità ambientale.

Considerato che è ovviamente difficile il recupero ambientale totale, si può indirizzare la gestione verso la creazione di "valvole di sfogo" per l'attività piscatoria, alleggerendo così i corsi d'acqua più pregiati.

Sono acque nelle quali è possibile:

- effettuare cospicue immissioni di novellame e di trote fario adulte di allevamento;
- istituire zone di divieto di pesca per l'accrescimento del pesce immesso;
- effettuare la cattura di trote fario di presunto "ceppo mediterraneo" da immettere nelle "Acque di Classe B";
- istituire zone di pesca facilitata con indirizzo "turistico" e zone "no kill", anche previa vendita di permessi a carattere oneroso.

In questa classificazione è possibile comprendere anche i laghi, ad esclusione di alcuni, la cui possibile gestione sarà approfondita nei prossimi paragrafi.

Indirizzi di carattere generale

Per poter contare su di un numero di trote di "ceppo mediterraneo" da immettere nei corsi d'acqua per il recupero e l'incremento delle popolazioni autoctone, è indispensabile un buon funzionamento degli incubatoi di valle. Questi devono essere dotati di vasche rinaturalizzate per la stabulazione permanente di un certo numero di riproduttori, i quali accrescendosi incrementano la produzione di uova ogni anno.

Per preservare il "ceppo mediterraneo" non è da escludere la creazione di "serbatoi genetici", per esempio certi laghi di scarso interesse piscatorio, nei quali, dopo accurata sterilizzazione da altri salmonidi, immettere un certo numero di soggetti indigeni. Questi potrebbero essere utilizzati in futuro, in conseguenza di forti calamità naturali, come lo sono le alluvioni, per garantire la sopravvivenza della specie.

Nelle "Acque di Classe A, B e C" è possibile l'immissione di specie ittiche di interesse piscatorio minore, quali il vairone, il barbo canino, ecc., per un corretto riequilibrio dell'ecosistema e della catena alimentare.

E' inoltre importante, ai fini di una corretta gestione, conoscere i precisi prelievi nei diversi corsi d'acqua. Per tale scopo è indispensabile rivedere l'attuale "Tesserino Segnacature" della Regione Emilia-Romagna per renderlo più dettagliato nella definizione dei diversi corsi d'acqua di ogni bacino idrografico.

Resta inteso che nel caso della pesca a carattere oneroso, una congrua quota delle entrate così realizzate dovrà essere utilizzata per la tutela, l'incremento ed il controllo delle popolazioni ittiche autoctone.

Conclusioni

Dalla presente ricerca emerge quanto ancora sia necessario approfondire le ricerche per giungere ad una migliore distinzione genetica delle popolazioni autoctone di trota fario

dell'Appennino settentrionale. Infatti se dall'analisi elettroforetica del DNA mitocondriale è possibile distinguere il "ceppo mediterraneo" da quello "atlantico", risulta piuttosto difficile la separazione genetica all'interno delle tre semispecie italiane appartenenti al complesso *Salmo trutta* (*marmorata*, *macrostigma* e *fario*) per la non completa rottura delle barriere interspecifiche.

Per quanto concerne l'allevamento della trota *fario* di "ceppo mediterraneo" emerge la necessità di studiare forme di alimentazione più corrette per soggetti selvatici abituati ad una alimentazione di tipo insettivoro-larvale. Potrebbe essere interessante la formulazione di mangimi preparati anche con farina di crisalidi, per la particolare configurazione amminoacidica che forse meglio si avvicina alle abitudini alimentari tipiche della specie.

Inoltre la selezione dei riproduttori da avviare alla fecondazione artificiale dovrebbe basarsi sempre meno sulle caratteristiche fenetiche della livrea dei soggetti, a meno che non sia possibile dimostrare scientificamente una correlazione certa tra alcune caratteristiche della stessa con il genotipo della trota *fario* autoctona.

Sul fronte "gestione delle acque pubbliche" è sempre più evidente che la conservazione e l'incremento delle popolazioni indigene di trota *fario* debba passare inevitabilmente attraverso la salvaguardia degli habitat naturali e la limitazione delle operazioni di immissione effettuate con materiale ittico di allevamento. In effetti, corsi d'acqua ambientalmente integri, nei quali è stata sospesa ogni forma di ripopolamento e nei quali risiedeva ancora una piccola popolazione autoctona di trota *fario*, sono quelli che oggi preservano popolazioni indigene stabili e in grado di automantenersi. Questa situazione potrebbe essere anche favorita da limitazioni della pressione piscatoria.

Parole chiave: trota *fario*, *Salmo* (*trutta*) *trutta*, L., allevamento, reintroduzione.

Key words: brown trout, *Salmo* (*trutta*) *trutta*, L., farming, reintroduction.

Mots clé: truite *fario*, *Salmo* (*trutta*) *trutta*, L., élevage, reintroduction.

Riassunto - Dalla fine degli anni '80 un discreto numero di soggetti selvatici di trota *fario*, riconducibile al fenotipo mediterraneo, *Salmo* (*trutta*) *trutta*, L., catturati con tecniche di pesca poco cruenta (pesca a mosca), mantenuti vivi in appositi contenitori ossigenati, sono stati stabulati in vasche artificiali rinaturalizzate per essere avviati, dopo una attenta selezione, alle operazioni di fecondazione artificiale. I riproduttori, la cui biomassa attuale è valutabile in circa 130 Kg, vengono progressivamente abituati all'assunzione di cibo, costituito in parte da mangime composto integrato ed in parte da pesce foraggio vivo. La selezione dei soggetti da avviare alla riproduzione artificiale è essenzialmente incentrata su 5 parametri: caratteristiche fenotipiche, accrescimenti corporei medi annui, numero di uova prodotte per Kg di peso vivo, dimensione delle uova prodotte e periodo di maturazione delle stesse. Le operazioni di fecondazione artificiale vengono effettuate a secco, previa anestesia dei riproduttori sottoposti a digiuno forzato. Inoltre gli animali sono sottoposti a rigorosa profilassi sanitaria e sostituiti per progressivo turnover, con eliminazione diretta o per mortalità naturale degli individui più anziani e debilitati, al fine di evitare l'insorgenza di possibili tare genetiche nella progenie. Una adeguata tecnica di incubazione delle uova e di svezamento degli avannotti consente di contare ogni anno su di una discreta produzione, circa 130.000 soggetti, di trote *fario* ad alta rusticità utilizzate per ripopolare corsi d'acqua dalla comprovata integrità ambientale. Ed è proprio l'integrità ambientale il fondamento su cui si basa una metodologia gestionale delle acque vocate a salmonidi per la quale si avanza una proposta concreta.

Summary - In the last ten years a discrete number of wild brown trouts, "Mediterranean phenotype", *Salmo* (*trutta*) *trutta*, L., caught by fly fishing, live in a renaturalized artificial tank. Alimentation is based on artificial feeding and little alive fishes. After rigorous selection they are used for artificial reproduction. Selection is founded on five elements: phenotype characters, annual body growth, eggs number produced by Kg body weight, eggs dimension, eggs maturation period. Adequate incubation, hatching and first growth stages, give 130'000 young wild brown trouts each year, used to controlled restocking in pure water streams. Pure and upright habitat is guide to an efficient salmonid waters management proposal.

Résumé - Dans les derniers dix ans un discret nombre de truites *fario* sauvages, phénotype méditerranéen, *Salmo* (*trutta*) *trutta*, L., capturées au moyen de la pêche à mouche, vivent dans un bassin artificiel renaturalisé. Les truites sont alimentées avec de la nourriture artificielle et avec des petits poissons vivants. Après une sélection rigoureuse, elles sont utilisées pour la reproduction artificielle. La sélection se base sur cinq éléments: caractères phénotypiques, croissance corporelle annuelle, nombre des oeufs produits pour Kg de poids corporel, dimension et période de maturation des oeufs. Une convenable technique d'incubation des oeufs, d'élevage larvaire et de grandissement des alevins, permet de produire 130.000 jeunes truites *fario* sauvages tous les ans, utilisées pour les repeuplements des torrents avec eaux pures et intègres. L'intégrité du milieu fluvial c'est aussi le fondement d'une correcte gestion des eaux avec vocation salmonicole, par laquelle on présente une proposition concrète.

Bibliografia

- DUCHI A. 1996. "Prime indagini per la conservazione della trota *macrostigma*, *Salmo* (*trutta*) *macrostigma*, Dum., in Provincia di Ragusa". Atti Cong. IV Conv.naz. A.I.I.A.D., Trento; 423-434.
- FORNERIS G., PASCALE M., SICURO B., PALMEGIANO G.B. 1996. "Analisi biometrica di tre popolazioni di *Salmo* (*trutta*) *trutta*, L.". Atti del V Conv.naz. A.I.I.A.D. Montecchio Maggiore (VI); 53-62.
- GANDOLFI G., ZERUNIAN S., TORRICELLI P., MARCONATO A. 1991. "I pesci delle acque interne italiane". Ist. Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma; 277-303.
- GHITTINO P. 1985. "Tecnologia e Patologia in Acquacoltura - Vol. I e II". Tipografia Emilio Bono, Torino; 104-212 (I).

- GIORGETTI G. 1990. "Produzione, patologia, diagnostica, profilassi dei Salmonidi allevati." *Atti del corso di perfezionamento per trotilcoltori, Trento*; 38-55.
- IELLI F., DUCHI A. 1990. "Indagini preliminari sulle caratteristiche morfologiche di alcune trote marmorate, *Salmo (trutta) marmoratus*, Cuv., pure ed ibride del torrente Avisio (Val di Fiemme. Trento)". *Atti del III Conv.naz.A.I.I.A.D. Riv.di idrobiologia, Perugia*; 275-280.
- IELLI F., ALESSIO G. 1994. "L'ambiente e le trote del torrente Riarbero (Appennino Reggiano)"; "Studio preliminare del popolamento a Salmonidi del torrente Liocca (Appennino Reggiano) e considerazioni sugli interventi gestionali per il recupero dei ceppi autoctoni". *Atti del V Conv.naz. A.I.I.A.D., Montecchio Maggiore (VI)*; 129-138.
- IELLI F., ALESSIO G., DUCHI A. 1996. "Biologia della trota marmorata, *Salmo (trutta) marmoratus*, Cuv." *Atti del IV Conv.naz.A.I.I.A.D. ,Trento*; 47-76.
- IELLI F., ALESSIO G. 1996. "Recupero e conservazione di piccole popolazioni di trota di torrente, *Salmo (trutta) trutta*, L., dell'Appennino Reggiano". *Atti Congressuali IV Conv.naz.A.I.I.A.D., Trento*; 459-466.
- LOCATELLI R. 1997. "La pesca nel Cantone Ticino - I e II Vol.". FTAP, Mendrisio-CH; 389-445.
- ROBERTS R. 1990. "Patologia dei Pesci". *Ed.italiana a cura di Giorgio Giorgetti. Edagricole, Bologna*.
- SAROGLIA M., INGLE E. 1992. "Tecniche di Acquacoltura". *Edagricole, Bologna*; 133-149.
- STEVENSON J.P. 1983. "Allevamento della Trota". *Edagricole, Bologna*.
- TORTONESE E.1970. "Fauna d'Italia-Vol.X-Osteichthyes-Pesci ossei". *Calderini, Bologna*; 113-138.

Evoluzione delle conoscenze parassitologiche e microbiologiche nell'epoca pre-spallanzaniana

Franco Brindani*

* Università degli Studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria, Istituto di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale.

PREMESSA

La storia della conquista del pensiero scientifico, evolutasi in più millenni, è appassionante: essa va dalla credulità popolare alla biologia molecolare.

Appare giustificato che agli albori del pensiero scientifico la mente dell'uomo, ancora ignara dell'esistenza di esseri infinitamente piccoli, abbia concluso, in modo semplicistico, che questi esseri, di origine invisibile o apparentemente ignota, si generassero spontaneamente dal fango, dalle sostanze in putrefazione o, più poeticamente, da una goccia di rugiada.

Meno giustificabile è, invece, che l'evolversi di questo pensiero sia stato ostacolato dalla dabbenaggine di molti "scienziati", dall'interferenza di forze conservatrici e dall'incanalamento di molte risorse, economiche e di ingegno, verso opere di guerra tese all'affermazione di questo o quel potere politico. Se ciò non fosse avvenuto e tali risorse fossero state spese nella ricerca scientifica, l'umanità non avrebbe atteso millenni per poter giungere al benessere sanitario e sociale di cui gode oggi.

GRECIA ANTICA

L'osservazione e lo studio dei parassiti, con metodi che potremmo definire scientifici, inizia nella Grecia del V-IV

ecolo a.C. Appare evidente come l'oggetto di queste prime osservazioni fossero i macroparassiti, visibili ad occhio nudo.

Meritano di essere segnalate le figure di Ippocrate (460-375 a.C.) e di Aristotele (384-332 a.C.), entrambi sostenitori della generazione spontanea.

Secondo Ippocrate, la cui figura appare indubbiamente ingigantita dall'assenza di una letteratura medica a lui antecedente, gli endoparassiti, mirabilmente descritti con una terminologia ancora in uso, si genererebbero in seguito ad un prolungato ristagno delle feci nell'intestino, mentre gli ectoparassiti deriverebbero dagli umori dell'organismo.

Le osservazioni scientifiche di Aristotele hanno un più largo respiro rispetto a quelle del suo predecessore, ma su queste egli speculò cerebralmente, ignorando completamente la fase sperimentale e giungendo a conclusioni completamente errate.

Pur conoscendo perfettamente il ciclo evolutivo degli insetti, che descrive utilizzando una terminologia ancora attuale (larva, ninfa, crisalide), egli non riesce a fornire altra spiegazione, se non quella della generazione spontanea, per quegli animali inferiori che non derivano da animali simili a loro.

Non risulta, dalle antiche opere greche, che Ippocrate, Aristotele e gli altri autori minori, avessero mai neppure sospettato l'esistenza di esseri piccolissimi, invisibili ad occhio nudo, ai quali attribuire la causa delle malattie. Pur intuendone la contagiosità di alcune, ne avevano attribuito l'eziologia a cause cosmo-telluriche (terremoti, inondazioni, eclissi, ecc.) che avrebbero causato alterazioni dell'aria (aria cattiva).

Si ritiene, comunque, che Aristotele, se non fosse rimasto "vittima" delle conclusioni a cui lo hanno portato le sue speculazioni filosofiche, applicate al campo

scientifico, avrebbe avuto elementi per confutare la generazione spontanea e per porre le basi di conoscenze microbiologiche, che avrebbero potuto realizzarsi secoli prima. Purtroppo invece, l'opera di Aristotele venne per secoli considerata perfetta ed accettata acriticamente (*Ipse dixit*). In tal modo il progresso che la Grecia fece compiere alle scienze biologiche, ed alla parassitologia in modo particolare, finì con il condizionare per più di duemila anni l'evoluzione del pensiero scientifico, costituendone una remora ad ulteriori progressi.

EPOCA ROMANA

Differentemente dai Greci, i Romani, pur non portando fondamentali contributi al progresso scientifico, avevano compreso la contagiosità di alcune malattie, anche se da taluni tale contagio era attribuito ad "untori" che avrebbero trasmesso il morbo pungendo di nascosto le vittime.

A Celso (53 a.C.-7 d.C.), considerato l'Ippocrate della latinità, dobbiamo l'individuazione delle forme malariche, che egli già distingue in quartana, terzana lieve e perniciosa, e della loro epidemiologia, nonché la descrizione di lesioni cutanee sia di origine micotica, che da lui ancora oggi prendono il nome di "cherion di Celso", sia di una sindrome cutanea riconducibile alla scabbia. Nei confronti di quest'ultima, come pure per le teniasi, suggerisce anche razionali metodi di cura.

Sia Celso, sia il più grande naturalista latino dell'epoca, Plinio il vecchio (23-79 d.C.), seguivano pedissequamente la teoria della generazione spontanea sostenuta da Ippocrate e da Aristotele.

L'incontestabile merito di aver intuito la natura dei contagi e di aver compreso l'esistenza di animaletti infinitamente piccoli ed invisibili, va, comunque, riconosciuto a Terenzio Varrone (116-27 a.C.). Egli ammetteva, cioè, l'esistenza di animali di minute

dimensioni che non si possono vedere con gli occhi ma che, per mezzo dell'aria, penetrano tramite la bocca e le narici nel corpo e vi causano malattie.

A Roma, dunque, duemila anni prima dell'era microbiologica, era stata intuita con precisione l'eziologia di alcune malattie infettive e chiarito il meccanismo con cui i microrganismi si trasmettono da uomo a uomo. Erano state gettate le basi della futura microbiologia, anche se questi aspetti positivi esistenti nella letteratura medica romana non ebbero alcuna influenza sul futuro evolversi delle scienze. Per molti secoli Celso fu dimenticato e le geniali intuizioni di Terenzio Varrone furono accantonate. Solamente fecero scuola le pagine di Plinio, contenenti nozioni erronee, fantasiose, ai confini con la magia.

EPOCA BIZANTINA

Ben pochi contributi scientifici sono dovuti alla scuola medica di Bisanzio. Viene attribuita, in questo periodo, una enorme importanza ai vermi che vengono ritenuti causa delle più svariate e complesse affezioni che nulla hanno a che vedere con le elmintiasi.

Dai primi autori greci e dai pochi latini, la parassitologia non solo non fa progressi, ma anzi arresta la sua evoluzione "inbizantineggiandosi", se così si può dire. Siamo in una fase regressiva del pensiero scientifico.

IL MEDIOEVO (500-1492 d.C.)

Le conoscenze parassitologiche del primo Medioevo furono molto limitate: nulla di nuovo si aggiunse al sapere scientifico e si dimenticarono nozioni già note ai dotti di un tempo. Erano diffuse, in questo periodo, credenze fantasiose e terapie magiche o mistiche.

Le conoscenze naturalistiche non erano molto evolute: gli insetti venivano confusi con i vermi e viceversa. Si distinguevano nove specie di vermi; il numero nove

dipende più da ragioni magiche che da osservazioni zoologiche: in quanto nove erano le sostanze che componevano i decotti delle streghe.

La parassitologia della scuola medica salernitana, molto in auge in questo periodo, è di derivazione greca, ma le conoscenze in proposito sono imperfette perchè i compilatori dei codici salernitani riportavano, spesso in modo errato, quanto i Greci avevano già scritto. Nel passaggio da un libro all'altro e nella copiatura di un codice al successivo, gli errori si sono moltiplicati ed il testo originale si è reso indecifrabile.

Il più grande naturalista del Medioevo, Albert von Bollstaedt (1193-1280), dominicano, noto come Albertus Magnus, fu un allievo spirituale di Aristotele, di cui cristianizzò i concetti filosofici e prese ad esempio il metodo sperimentale, contribuendo al risorgere dello studio della natura, ma anche al perpetuarsi degli errori aristotelici nel campo della biologia: primo fra tutti quello relativo all'irriducibile concetto della generazione spontanea.

Durante tutto il Medioevo terribili epidemie sconvolsero il mondo: peste, vaiolo, tifo, influenza, lebbra. Tali epidemie, per il loro continuo succedersi ed il loro andamento, convinsero medici e profani come esse fossero dovute a morbi che si trasmettevano direttamente da uomo malato a uomo sano o, indirettamente, per mezzo delle cose toccate dagli ammalati e venute a contatto con gli indenni. Sorse, in tal modo, profondo e radicato, il concetto del contagio, accettato non soltanto dagli uomini di scienza, ma anche da letterati, artisti, uomini di governo.

Con l'idea del contagio prende piede la convinzione che l'aria venga contaminata dall'alito, carico di veleno, dei malati. Ammesso questo principio, si pensò di purificare l'aria malsana, bruciando grandi quantità di incenso e di fiori di camomilla.

Ci si sforzava di spiegare la ragione delle malattie contagiose che sarebbero dovute ad un'alterazione dello stato normale dell'atmosfera a seguito della presenza di elementi o esalazioni terrestri che si spargono in questa, vi rimangono sospesi e sono assorbiti dagli uomini.

Per difendersi dalle pestilenze venivano isolati gli ammalati, in particolar modo i lebbrosi, e si proibiva l'ingresso nelle città agli uomini ed alle merci sospette creando stazioni di sosta quarantenarie come fu fatto, per la prima volta, a Marsilia nel 1383.

L'esistenza di organismi infinitamente piccoli, comunque, non è mai stata neppure sospettata anche se, verso la fine del Medioevo, l'idea del contagio assume tale consistenza da costituire la base sulla quale nel Cinquecento si impernierà la teoria del "*contagium animatum*".

IL RINASCIMENTO

Nuove idee si fanno strada in campo parassitologico nel Rinascimento: le fantasticherie medioevali cedono il passo ad osservazioni razionali. Nuovi parassiti vengono scoperti (botriocefalo, filarie, gastrofili), si sente il bisogno di scrivere monografie su di essi ed ecco comparire i primi trattati e le prime illustrazioni. Le credenze sulla generazione spontanea sono ancora in auge, ma le osservazioni di Ulisse Aldrovandi (1522-1605), che segue tutto il ciclo di sviluppo delle mosche, forniranno a Francesco Redi, nel secolo seguente, l'arma per demolire tali teorie.

Gli antichi scritti vengono riletti con attenzione e spirito critico; l'*Ipse dixit* comincia a sgretolarsi lentamente, l'osservazione scientifica si sostituisce all'elucubrazione intellettuale, cominciano a comparire i primi trattati per poi succedersi gli uni agli altri sempre più rapidamente grazie all'invenzione della stampa.

Un'altra grande conquista viene fatta in questo periodo: i vermi non sono più considerati come una conseguenza di stati morbosi, ma sono ritenuti essi stessi causa di malattia. Viene, in tal modo, rivoluzionato tutto l'antico sapere. Jacques Oullier (?-1562) formula un aforisma che sintetizza questo nuovo approccio scientifico: "*Lumbricus non est morbus sed morbi causa*".

Sebbene il concetto fondamentale dell'origine parassitaria delle malattie fosse stato intuito nel I secolo avanti Cristo da Terenzio Varrone, esso si riaffaccia e si afferma solamente nel Rinascimento. Il merito di questo va indiscutibilmente riconosciuto a Girolamo Fracastoro (1478-1553).

Le malattie contagiose, scrive Fracastoro, sono sostenute da semenze vive (*seminaria* o *virus*) che contaminano gli uomini e in questi si riproducono causando la malattia. Queste semenze sono particelle impercettibili che passano dall'uomo malato a quello sano come i germi dell'acino d'uva putrefatto passano a quello sano.

L'organismo può essere raggiunto da queste particelle per contatto diretto, tramite oggetti inanimati, oppure per mezzo dell'aria respirata nella quale i *virus*, con meraviglia dell'autore, sopravviverebbero molto a lungo. Essi, poi, penetrano attraverso piccoli pori, vene ed arterie sino al cuore. Perchè la malattia si manifesti, occorre che i *seminaria*, fissatisi a particelle che non sono visibili ai nostri occhi (cellule ?), si moltiplichino dando vita a nuovi esseri, aventi le stesse caratteristiche dei primi, che infetteranno l'intero organismo.

Fracastoro, dunque, con una chiaroveggenza sorprendente, si rende conto dell'eziologia infettiva delle malattie contagiose; comprende, oltre 300 anni prima di Pasteur che la fermentazione acetica e quella casearia sono sostenute da esseri viventi, che

generano altri esseri viventi simili a se stessi e che si spostano da un luogo all'altro o per contatto o perchè veicolati dall'aria o da un altro mezzo. Ma egli si spinge oltre, rilevando che esistono malattie contagiose delle piante che non si trasmettono agli animali e malattie che colpiscono solamente una specie animale e non altre; come pure esistono *virus* che presentano affinità solo per determinati organi, dei quali egli sembra aver intuito la struttura cellulare.

Un dubbio rimane: Fracastoro è stato una specie di veggente che ha semplicemente intuito i suoi *seminaria* o fu uno sperimentatore che per primo li vide? In effetti egli descrive, in una sua opera (1538), un "istrumento a due lenti" che permette di vedere le cose da vicino e molto più grandi. Aveva forse inventato il microscopio circa 80 anni prima di Galileo? Non ci è dato saperlo. L'opera di Fracastoro riveste, comunque, un'importanza eccezionale: le sue osservazioni e le sue deduzioni travalicano il secolo in cui è vissuto. Egli può considerarsi il grande precursore dell'epidemiologia moderna e, certamente, il padre della microbiologia nonché il primo demolitore delle teorie sulla generazione spontanea.

IL SEICENTO

In questo secolo la parassitologia da empirica, descrittiva e speculativa diviene scientifica e sperimentale. Negli uomini di scienza si fa strada la necessità di osservare direttamente la natura prescindendo da divagazioni ragionate non basate sull'esperimento.

Queste nuove concezioni furono completate ed esaltate dalla scoperta del microscopio e dalle sue applicazioni allo studio degli esseri viventi; tale scoperta domina nel Seicento l'intera ricerca biologica e rivoluziona il modo di pensare degli studiosi, agli occhi dei quali un nuovo mondo si dischiude all'improvviso. Gli organismi infinitamente piccoli non sono più una conseguenza di

profetiche intuizioni o di ragionamenti logici, ma divengono una realtà osservabile che apre nuove prospettive alla scienza dei contagi e all'eziologia delle malattie.

Anche se le prime lenti per la correzione della vista vennero costruite nel XIII secolo, nessuno ebbe l'idea di utilizzarle per osservare piccole forme di vita sino al 1539, quando Girolamo Fracastoro riferisce di un apparecchio a due lenti che permette di vedere le cose molto più grandi. Il Fracastoro aveva compreso, già dal 1546, che le malattie infettive erano sostenute da particelle impercettibili da lui chiamate *seminaria*.

Nel Seicento la teoria dei *seminaria* assunse forma e consistenza poichè il microscopio permise finalmente di osservare quegli *animalcula*, di cui Terenzio Varrone, con sorprendente chiarezza, aveva intuito l'esistenza ben quindici secoli prima.

Ma bisogna arrivare sino a Galileo Galilei (1564-1642) per avere finalmente a disposizione il primo strumento utilizzabile, la cui costruzione può essere datata tra il 1610 ed il 1614; mentre è del 1625, ad opera di Giovanni Faber, la denominazione di questo marchingegno come microscopio.

Galilei aveva anche risolto il problema di fissare l'oggetto da osservare, ideando un cerchio mobile corrispondente all'attuale tavolino traslatore; inoltre il suo strumento consentiva di avvicinare e discostare le lenti dall'oggetto, mettendolo a fuoco.

E' invece a Francesco Redi (1626-1698) che dobbiamo la sperimentazione in campo parassitologico. Le osservazioni fatte dagli autori precedenti risultavano casuali e superficiali: si segnalava la presenza di parassiti, accompagnata da descrizioni sommarie, solo se casualmente ci si imbatteva in essi. Nessuno aveva mai avuto l'intuizione di andarli a reperire in esseri viventi, di sezionarli e di cercare di capire la funzione

dei vari organi individuati. Vengono, in tal modo, descritti e disegnati vari parassiti (*Toxocara canis*, *Fasciola hepatica*, *Cisticercus pisiformis*, cisti idatidea, filaria, pidocchio, ecc.), viene individuato il ciclo biologico della zanzara.

Il Redi, inoltre, introduce il metodo sperimentale nello studio dell'efficacia di un medicamento, comprendendo la necessità di inserire, in ogni esperienza, un esperimento di controllo come verifica e rendendosi conto che una cosa è la sperimentazione in vitro ed un'altra è la realtà che si verifica nel corpo umano.

La teoria della generazione spontanea rimaneva, comunque, un ostacolo insormontabile per fornire una spiegazione razionale alla genesi delle parassitosi, almeno sino a che Girolamo Fabrizi (1537-1619) e William Harvey (1578-1657) giungevano, già nei primi anni del Seicento, alla conclusione che "*omne vivum ex ovo*", cioè che tutti gli esseri viventi derivano da genitori simili a loro tramite uova. Spetta, comunque, al Redi l'indiscutibile merito di avere demolito sperimentalmente la teoria della generazione spontanea, mediante esperienze eseguite con il metodo comparativo (carni e formaggi posti in vasi accessibili alle mosche ed in vasi sigillati).

Spesso, però, le nuove idee del Redi non trovarono facile accoglimento ed il suo spirito razionale non venne neppure compreso da molti contemporanei, che vollero ad ogni costo criticarlo.

La generazione spontanea relativa ai batteri, organismi peraltro ancora da scoprire, sopravviverà e bisognerà attendere le esperienze di Spallanzani e di Pasteur per confutarla definitivamente.

Colui che può essere ritenuto il primo microbiologo sperimentale della storia, in considerazione delle sue fondamentali ricerche di microbiologia, è Athanasius Kircher (1602-1680), un padre gesuita tedesco, poi

stabilitosi a Roma, noto anche per i suoi profondi studi di archeologia. Egli non si limitò a ricercare i suoi "*minutissima animalcula*", che designa con diversi nomi (*vermes*, *vermiculi*, *serpentuli*, *animalcula*, *seminaria*, *virus*), in svariate sostanze alimentari, nelle quali, egli riferisce, nascono innumerevoli generazioni di *vermes* invisibili all'occhio nudo: li ricercò anche negli ammalati. Nel corso di un'epidemia di peste, che infierì a Roma nel 1656, egli vide e descrisse, nei malati e nei cadaveri, vermicoli talmente tenui e sottili (*Pasteurella pestis?*) da sfuggire ai nostri sensi, se non osservati con il microscopio. La peste è dunque sostenuta, secondo questo studioso, da un germe (*pestiferum virus*) che passa da uomo ad uomo con la respirazione oppure per mezzo di veicoli inanimati o animati, come le mosche. Kircher aveva, comunque, la sensazione di affermare concetti che non sarebbero stati creduti dai suoi contemporanei. "I medici che non comprenderanno questi paradossi", egli sostiene, "dovranno ricredersi perchè molte cose, ancora nascoste nella natura, ed ignote agli antichi, sono state scoperte e dimostrate vere grazie all'uso del microscopio". Da Roma le esperienze di Kircher si diffusero in tutto il mondo e furono ampiamente citate e riprese da moltissimi studiosi.

Quasi nello stesso periodo un altro personaggio entra di diritto nella storia della scienza, pur senza essere certo uno scienziato: Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723). Questo strano olandese non aveva una cultura scientifica o umanistica: si occupava della gestione del suo negozio di tessuti e, più tardi, fece il custode del tribunale di Delft. Era, però, attirato morbosamente dalle lenti, che egli stesso costruiva nel suo tempo libero (allestì più di 500 microscopi) e che utilizzò per le sue osservazioni. Van Leeuwenhoek era un individuo curioso, paziente, dotato di uno spirito di osservazione eccezionale ed acutissimo che lo induceva ad osservare con il suo rudimentale microscopio, capace di 50-300 ingrandimenti, tutto ciò che gli capitava tra le mani. Egli non aveva mai letto i lavori di Kircher nè di altri e non aveva sufficienti mezzi

culturali per trarre dalle proprie ricerche deduzioni di qualsiasi genere: è stato un semplice osservatore e si è limitato sempre a descrivere quello che vedeva. Van Leeuwenhoek osservò batteri, lieviti, protozoi, persino acari sulle zampe delle pulci (primo caso segnalato di iperparassitosi) descrivendoli sempre nello stesso modo: poche parole sulla forma, sulle dimensioni, sul movimento. La sua opera fu molto letta dagli studiosi del tempo, ma non solo da questi; anche uomini della strada, filosofi, sovrani se ne interessarono. Questo interesse, però, era dettato più dalla curiosità che non dalla considerazione della sua opera come un fondamentale contributo scientifico. D'altra parte Van Leeuwenhoek non conosceva le ricerche di Fracastoro o quelle di Kircher e non poté quindi mai inserire le proprie osservazioni nel quadro dell'evoluzione scientifica del suo tempo, venendo considerato come un ricercatore di cose curiose, l'osservatore, per svago e curiosità, di un mondo invisibile. L'opera di questo autore, pertanto, per quanto grande sia stata, non influenzò profondamente l'evoluzione del pensiero scientifico: pochi furono gli studiosi che da lui presero le mosse.

Nella seconda metà del Seicento altri studiosi si dedicarono alla microscopia controllando, se così si può dire, le osservazioni dell'autore olandese: tra questi meritano di essere ricordati Robert Hook (1635-1703) che ci ha tramandato bellissime illustrazioni di quanto vide e Filippo Bonanni (1638-1725), padre gesuita, che lavorava a Roma, dove la microbiologia aveva fatto i suoi primi passi con Athanasius Kircher.

Ma ormai non ci si poteva più accontentare di osservazioni accidentali: si cominciò a ricercare, si inventarono i controlli e si ragionò sui risultati delle ricerche compiute. Dalla descrizione superficiale dei parassiti si passò alla individuazione della loro struttura interna, ed anche ai primi accenni di metabolismo.

Anche l'idea di malattia veniva sempre più associata

alla presenza di parassiti o di esseri microscopici: i germi della peste erano stati intravisti, si era scoperto il rapporto tra microrganismi e putrefazione. Facevano capolino la profilassi delle malattie infettive ed i primi concetti di immunità acquisita, come pure la coltivazione dei microrganismi. Il progresso scientifico realizzatosi nel Seicento può, quindi, senza dubbio, definirsi enorme.

IL SETTECENTO

In questo secolo il dogmatismo scolastico ha ormai cessato di esistere: non si crede più alla pura speculazione, non ci si basa più su fantasie filosofiche, ma sull'esperienza e sull'osservazione scientifica. In tal modo verrà definitivamente dimostrato l'assurdo della generazione spontanea; verranno individuate le affinità che collegano tra loro gli esseri viventi, tanto da consentirne una classificazione sistematica che porterà alla scoperta di nuove specie e alla comprensione dei loro cicli di sviluppo.

Verrà, inoltre, dimostrata l'enorme diffusione di esseri microscopici anche all'interno di esseri viventi, ed infine, sul finire del secolo, si acquisirà la consapevolezza di poter prevenire le malattie infettive (vaiolo) con la vaccinazione.

La scoperta del microscopio, fatta all'inizio del Seicento, ha, sin dai primi anni del Settecento, influenzato le ricerche parassitologiche ponendo gli autori di fronte alla realtà di un mondo biologico nuovo e insospettato. Tale realtà ha spinto i ricercatori a collocare gli abitanti di questo nuovo mondo entro i confini del mondo biologico sino ad allora noto: in tal modo gli animaletti osservati dagli autori del Seicento vennero inclusi tra gli insetti ed i vermi. Pertanto, nella letteratura dell'epoca esiste una grande confusione tra vermi, insetti e microbi, tanto che questi ultimi venivano inseriti nei trattati di elmintologia; si riteneva, inoltre, che le loro uova, piccole e leggere, potessero essere

facilmente trasportate dal vento nell'acqua e sulla terra, ove, in condizioni favorevoli, avrebbero germogliato.

I medici di inizio secolo cominciarono a pensare seriamente che le malattie infettive potessero essere sostenute da germi viventi, grazie al fatto che una schiera di cacciatori di animali invisibili aveva dimostrato e andava dimostrando l'esistenza, sia nell'ambiente naturale sia all'interno degli esseri viventi, di un "*mundus invisibilis*" prima ignorato.

Numerose osservazioni epidemiologiche, anche se spesso empiriche ed inesatte, indussero, poi, ad ammettere l'esistenza di un contagio animato e la possibilità di prevenire alcune malattie tramite l'isolamento e la quarantena.

Lo studioso di parassiti e di contagi che più emerge, all'inizio del Settecento, è senza dubbio Antonio Vallisneri (1661-1730), che può, idealmente, considerarsi un seguace e un continuatore dell'opera del Redi. Egli sosteneva, infatti, che non si può giungere alla verità se non eliminando tutti i pregiudizi del passato, non stancandosi mai di osservare e di rifare esperienze. In tal modo vennero da lui portati contributi fondamentali nel campo della elmintologia (ermafroditismo dei cestodi, origine dei vermi dalle uova) e degli insetti (ciclo di sviluppo di *Gastrophilus*, delle pulci e dei parassiti dei vegetali).

Pure la teoria della generazione spontanea, almeno per gli animali visibili, viene definitivamente affossata dal Vallisneri, che riprende le esperienze del Redi. Per quelli microscopici, invece, essendo le conoscenze ancora superficiali e le tecniche per studiarli ancora da proporre, la disputa continuerà e bisognerà attendere prima le esperienze dello Spallanzani sugli infusori e poi quelle di Pasteur, verso la metà dell'Ottocento, per dirimere definitivamente la questione.

Relativamente al rapporto tra malattie e microrganismi,

che il Vallisneri definisce "*vermicelli pestilenziali*", tale autore descrive le modalità con cui questi invadono e distruggono l'organismo, prevedendone le possibili azioni patogene con una descrizione che può ancora apparire attuale (invasione, moltiplicazione in circolo, produzione di tossine, infiammazione e degenerazione dei tessuti). Il Vallisneri comprende pure l'esistenza, nella malattia, di un periodo di incubazione, la possibilità che il microrganismo presenti delle oscillazioni di virulenza e che esistano più specie di microrganismi, ognuno dei quali sostiene una differente malattia, alcune delle quali possono essere comuni ad animali e uomo (zoonosi).

Questo studioso, nonostante l'esattezza dei suoi ragionamenti e delle sue deduzioni, non cercò di controllare sperimentalmente le sue affermazioni: i tempi per affrontare simili esperienze non erano ancora maturi.

Nel Settecento vengono individuati nuovi parassiti come il tricocefalo (1740) e sono chiariti cicli parassitari relativamente complessi, come quello dei distomi (1753), della *Taenia multiceps* (1786), del botriocefalo (1794), che abbisognano di più ospiti per il loro completamento.

Come prima riportato, le idee sulla sistematica zoologica erano, all'inizio del secolo, piuttosto confuse. D'altra parte, il sempre maggior numero di specie scoperte creava difficoltà per contraddistinguerle con un nome che permettesse di individuarle facilmente, scegliendo ogni studioso, a caso, il nome con cui indicare questo o quell'essere vivente. Fu lo svedese Karl von Linnè (1707-1778) lo studioso che impostò il problema della classificazione secondo precise regole sistematiche, creando le classi, gli ordini, i generi e le specie, indicando queste ultime con una nomenclatura binomiale. L'impostazione sistematica che egli diede agli esseri viventi, tentando di includere nel suo *Systema* anche gli animaluoli che il microscopio aveva

consentito di osservare, fece immediatamente scuola e permise un rapido sviluppo a varie discipline: zoologia, botanica, parassitologia.

Sin dalla prima edizione della sua opera (*Systema Naturae*), pubblicata nel 1735, Von Linnè ebbe la percezione esatta del sistema che voleva creare, senza però riuscire ad elaborarlo con quella chiarezza che contraddistingue l'ultima edizione, la dodicesima, del 1766. Nella prima egli aveva già creato, senza ben delimitarlo nè definirlo, un gruppo di esseri cui aveva dato il nome di *Microcosmus* ma si deve attendere l'ultima per vedere inclusi gli *animalcula* nella classe dei *Vermes* e nel nuovo ordine *Chaos*, nel quale ordine egli include anche termini coniatati da altri studiosi come *Proteus* (amebe) e *Infusoria*. Nel *Chaos* vengono incluse anche delle "*obscurae moleculae vivae*", sulle quali, egli afferma, solamente i posteri potranno pronunciarsi. Queste "*moleculae vivae*" potrebbero essere, secondo Von Linnè, gli agenti eziologici delle febbri esantematiche, della sifilide e quelli causali della fermentazione e della putrefazione, avvicinandosi, così, alle teorie sostenute da molti medici. Rimane strano, e difficile da spiegare, come egli includa nell'ordine *Chaos* anche gli spermatozoi.

Dobbiamo ad Otto Friedrich Muller, seguace di Von Linnè, il primo studio sistematico e la prima classificazione attendibile dei batteri (1784). Egli suddivide gli *Infusoria* in numerosi generi la cui denominazione, almeno in parte, sussiste tuttora (*Monas*, *Vibrio*, *Paramecium*, *Cercaria*). I cocchi ed i bastoncini vengono, da questo studioso, inclusi nel genere *Monas*: sono distinti e raffigurati vibrioni, cocchi disposti a catenella (streptococchi), cocchi agglomerati a grappolo (stafilococchi) e sono introdotti, per la prima volta, i termini *bacillus* e *spirillum*.

Ma è Lazzaro Spallanzani (1729-1799) colui che possiamo considerare il fondatore della microbiologia sperimentale moderna. In seguito ad una disputa con

un suo contemporaneo, John Needham (1713-1781), ancora sostenitore della teoria della generazione spontanea, lo Spallanzani intraprese una lunga serie di esperimenti, saggiando differenti tempi e temperature, per eliminare i microrganismi dagli infusi organici. Egli ebbe modo di rilevare che la termoresistenza di tali microrganismi era variabile e che, sigillando ermeticamente i contenitori, gli infusi rimanevano sterili per lungo tempo; ma se questi venivano a contatto con l'aria si intorbidavano rapidamente. I microrganismi venivano, quindi, veicolati dall'aria.

Queste esperienze, ripetute più volte, consentirono allo Spallanzani di osservare che gli individui di una qualsiasi specie di animalucoli, comparsi in una infusione, dapprima aumentano gradatamente di numero, poi raggiungono un livello massimo, quindi diminuiscono sin quasi ad annullarsi. Rappresentando questi concetti con un grafico, otterremmo quello corrispondente ad una curva di sviluppo dei microrganismi, così come è stata individuata solamente in questi ultimi decenni. Sulla base della loro termoresistenza, egli suddivise, poi, i microrganismi in almeno due ordini: quelli che erano facilmente uccisi dall'ebollizione, che egli definisce "di ordine superiore" (probabilmente protozoi) e quelli "di ordine inferiore", che resistono molti minuti all'ebollizione (verosimilmente schizomiceti).

Altri meriti vanno indubbiamente riconosciuti a questo studioso, come quello di aver dato inizio alle ricerche sperimentali sui disinfettanti, cimentando i suoi animalucoli con varie sostanze: canfora, trementina, zolfo, alcool, ecc. e quello di aver coniato una nuova espressione per indicare gli organismi infinitamente piccoli: "germi". Tale espressione fu subito adottata dal linguaggio scientifico internazionale e viene tuttora ancora impiegata.

L'opera dello Spallanzani è, dunque, andata ben al di là del fine che si proponeva (contestare il Needham e la teoria della generazione spontanea). Dai suoi studi

prenderanno le mosse altri studiosi, che nel secolo seguente continueranno la sua opera: Nicolas Appert (1752-1841), Louis Pasteur (1822-1895), John Lister (1827-1912), senza dimenticare i nostri Agostino Bassi (1773-1856) e Bartolomeo Bizio (1791-1862).

Parole chiave: evoluzione scientifica, parassitologia, microbiologia, Spallanzani.

Key words: scientific evolution, parasitology, microbiology, Spallanzani.

Schlüsselwörter: Wissenschaftliche Evolution, Parasitologie, Mikrobiologie, Spallanzani.

RIASSUNTO. Vengono ripercorse, sia pure sinteticamente, le tappe più significative che hanno caratterizzato l'evoluzione della parassitologia e della microbiologia, dai pensatori dell'antica Grecia sino allo Spallanzani. Sono, in questo contesto, abbozzate le figure di quegli studiosi che, grazie alle loro intuizioni ed alle loro scoperte, hanno consentito al pensiero scientifico di evolversi, nel corso dei secoli, sia pure con un cammino faticoso e spesso ostacolato dalla "scienza" ufficiale. Si è così passati dalle convinzioni frutto della credulità popolare ai risultati degli esperimenti, condotti con metodo e rigore scientifico, del ricercatore reggiano.

SUMMARY - Evolution of parasitological and microbiological knowledge in the age before Spallanzani. The paper briefly illustrates the most meaningful steps that characterized the evolution of parasitology and microbiology from the thinkers of ancient Greece to Spallanzani. In this context the author outlines the characters of those scholars who, thanks to their insights and their discoveries, made the development of scientific thought possible in the centuries, even though progress was not easy and was often hindered by the official "science". It was so possible to move from the beliefs based on popular gullibility to the results of Spallanzani's tests based on scientific rigour and method.

ZUSAMMENFASSUNG - Evolution des

parasitologischen und mikrobiologischen Wissens in der Zeit bis Spallanzani Der Artikel handelt im kurzem von den bedeutungsvollsten Etappen, die die Entwicklung der Parasitologie und der Mikrobiologie von den Denken des alten Griechenlandes bis zu Spallanzani kennzeichneten. In diesem Kontext werden die Gestalten jener Gelehrten entworfen, die im Laufe der Jahrhunderten dank ihrer Intuition und Entdeckungen die Evolution des Wissenschaftlichen Gedankes ermöglichten, selbst wenn die Entwicklung schwierig war und oft von der offiziellen "Wissenschaft" verhindert wurde. Man konnte somit von den Überzeugungen der Völkleichtgläubigkeit zu den Versuchen von Spallanzani übergehen, die sich auf wissenschaftliches Verfahren und Genauigkeit berührten.

LEISHMANIASIS IN A DOG: LANGERHANS CELLS HARBOUR *L. INFANTUM* AMASTIGOTES DURING NATURAL INFECTION.

Kramer L., Passeri B., Rossi G.*

Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria, Università di Parma

**Dipt. di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Università di Pisa*

INTRODUCTION

In the mammalian host, *Leishmania* are obligate intracellular parasites that invade macrophages. The accessory functions of these host cells are important for regulation of the specific cellular immune response to the parasite characterized by infiltration into the site of infection, initiation of a T cell response, maintenance of immunity and the effector mechanisms that control intracellular parasite replication. Immunohistochemical studies of cutaneous lesions caused by different *Leishmania* species in humans and in mice models have infact described the presence of CD4+ and CD8+ T cells, upregulation of MHCII expression on many cells, including keratinocytes and vascular endothelium, and the infiltration of immunoglobulin-secreting plasma cells, all part of the local immune response that may or may not be effective in controlling parasite replication (Isaza et al, 1996).

Few immunohistochemical studies have been carried out to evaluate the local immune response and to identify host cells in canine leishmaniasis (CL), caused by infection with *L. infantum*. Recently, Marchal et al (1997) reported evidence that canine Langerhans cells harbour *Leishmania* in the skin and in draining lymph nodes and that these cells are likely important antigen-presenting cells in canine leishmaniasis.

Here, the authors report the results of immunohistochemical analysis of cutaneous lesions and regional lymph nodes taken from a dog affected by canine leishmaniasis, with particular emphasis on the immunophenotype of infected host cells.

MATERIALS AND METHODS

A nine month-old Argentine Dogo dog presented with multiple cutaneous lesions, characterized by nodules on the head and trunk, a few of which were ulcerated. The lesions had been present for several months and were refractory to antibiotic therapy. Serum samples were taken for *Leishmania* serology (IFAT) and a skin biopsy was performed for histologic examination of one of the lesions. Due to progressive deterioration of the dog's condition, the owner opted for euthanasia. Samples of skin and regional lymph nodes were obtained during necropsy and fixed in 10% buffered formalin or snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen. Frozen samples were stored at -70°C.

Immunohistochemical analysis was carried out with a panel of 7 monoclonal antibodies: anti-canine MHCII , anti-canine CD4 , anti-canine CD8 , anti-canine CD18 , anti-canine CD45RO, anti-canine CD1a and anti-canine CD1c (monoclonal antibodies were kindly provided by Prof. Peter F. Moore, University of California, Davis, CA). Briefly, cryostat sections of skin and lymph nodes were placed on polylysine-treated slides and fixed in cold acetone (+4°C) for 5 minutes. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 3% H₂O₂ for 10 minutes. Blocking of unspecific binding sites was obtained by incubation in 10% goat serum for 20 minutes. Serum was tapped off and tissue sections were then incubated with the monoclonal antibodies for 60 minutes in a humid chamber at room temperature. After rinsing in phosphate buffer (PBS, 10mM, pH 7.4), sections were incubated with a biotin-conjugated goat anti-mouse monoclonal antibody for 20 minutes, followed by a streptavidin-peroxidase link for a further 20 minutes (LSAB kit, DAKO, ITALY). Immunoreactivity was revealed using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC staining kit, SIGMA, ITALY), a bright red chromogen. Sections were counterstained in Mayer's heamatoxylin for 2 minutes and mounted in an aqueous mounting medium (Glycergel, DAKO, ITALY). Immunohistochemical staining for *Neospora caninum* with a goat polyclonal immune serum was carried out according to manufacturer's instructions (VMRD, Pullman, WA).

RESULTS

Histologic examination of the initial skin biopsy and of skin samples obtained during necropsy revealed dense infiltration of macrophages, plasma cells and lymphocytes in the deep dermis and subcutaneous adipose tissue, with some scattered neutrophils. Small, intracellular protozoa, some within vacuoles, were observed in the cytoplasm of numerous macrophages and occasionally, in fibroblasts and were suggestive of *Leishmania*. Lymph nodes were characterized by a breakdown in lymphoid architecture and a depletion of small lymphocytes. Plasma cells were numerous. Some macrophages and cells with a dendritic morphology containing intracellular parasites were observed. Indirect immunofluorescence (IFAT) analysis on the serum of the dog gave a positive titre of 1:640 for anti- *L.infantum* antibodies.

In the skin, several CD1c-positive cells harboured *Leishmania* amastigotes in the cytoplasm. The parasites were normally few in number in these cells. Interestingly, many of the macrophages that were heavily parasitized did not stain with MHCII antibodies. In lymph nodes, most infected cells with dendritic morphology stained positively for CD1c.

The immunophenotype of the infiltrating inflammatory cells within the skin lesions revealed a predominance of CD8+ T lymphocytes, particularly in those areas where parasite load was heaviest. Very few cells stained positively for CD4 (T helper) while no positive staining was observed for CD45RO (B lymphocytes).

Immunohistochemistry for *Neospora caninum* resulted in slight positive staining of intracellular organisms in the skin and lymph nodes.

DISCUSSION

Cutaneous lesions are very common in canine leishmaniasis and likely represent the dissemination of the disease to the skin, in that other organs such as spleen, bone marrow and lymph nodes, are also involved. The case reported here was unusual in that the nodular form of the disease is considered rare and may be due to an insufficient cell-mediated immune response (Ferrer et al,

1988). In fact, nodular skin lesions of *Leishmania* normally contain many parasites, as was seen in this animal. Resistance to infection with *Leishmania* requires the stimulation of a Th1-immune response characterized by the activation and proliferation of T lymphocytes capable of producing IL-2, IFN γ and other cytokines which in turn induce host macrophages to produce reactive nitrogen intermediates that are critical for the killing of the intracellular parasites. In the susceptible host, there is a Th2 response with production of IL-4, IL-10 and other cytokines which stimulate the proliferation and differentiation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting plasma cells (Bogdan et al, 1996). This humoral response is not protective against infection. It is likely that the dog reported here was unable to mount an effective cell-mediated immune response and thus the large number of parasites in the skin lesion and the intense plasmacytosis observed in the draining lymph node. Also, it is of interest to note that *Leishmania*-containing macrophages did not stain very often, nor very intensely, with the anti-MHCII antibody. Antigen presentation by macrophages requires MHCII synthesis and expression on the cell membrane, associated with the elaborated antigen. It has been reported that intracellular amastigotes of *Leishmania* are able to actively destroy newly synthesized MHCII molecules, thus inhibiting antigen-presentation and consequent stimulation of specific T lymphocytes (De Souza-Leao S et al, 1995). Due to the high parasite load observed in infected macrophages in this case, it is possible that they were unable to express sufficient MHCII.

CD1c-positive Langerhans cells in the skin harboured *Leishmania* amastigotes, as they also did in the lymph node of the dog reported here. These results confirm the only other report of *Leishmania*-infected dendritic cells in canine leishmaniasis in the literature (Marchal et al, 1997). The low number of parasites within the infected cells also confirms the earlier report. Langerhans cells are dendritic antigen-presenting cells that reside in the epithelium of the skin and mucosal surfaces. Following antigen up-take and elaboration, these cells migrate to the regional lymph nodes where they become interdigitating dendritic cells (IDDC) that present antigen to T cells in the paracortex, thus stimulating an antigen-specific, T-cell immune response. It is therefore quite likely that also in canine leishmaniasis, these cells play an important role in the immune response to infection. Infection of Langerhans cells/IDDC by *Leishmania* has been extensively studied in human leishmaniasis and in mice models of the disease (Flohe et al, 1997; Moll et al, 1995; Will et al, 1992; for review, see Bogdan et al, 1996). These studies have shown that LC are highly efficient in presenting *Leishmania* antigen to T cells and that their stimulating capacity is persistent. It is thus hypothesized that LC/IDDC play a role not only in the initial immune response to the parasite, but also in the continuous

stimulation of memory T cells, which may be responsible for further resistance to infection.

Finally, it is interesting to note that we observed slight cross-reactivity of *Leishmania* amastigotes with a polyclonal serum against *Neospora caninum*. Cross reactivity to *N.caninum* has been reported for *Toxoplasma*, (Dubey et al, 1996) but, to the authors knowledge, never to *Leishmania*. *N. caninum*, an intracellular protozoa belonging to the Sarcocystidae, can also cause nodular and ulcerating dermatitis in the dog. Usually, microscopic evaluation of routine histology preparations (heamatoxylin/eosin) is sufficient to distinguish *Leishmania* amastigotes from *Neospora* tachizoites. In the event that immunolabelling is used for differential diagnosis, cross-reactivity should be taken into consideration.

SUMMARY. Langerhans cells (LC) and interdigitating dendritic cells (IDDC) are antigen presenting cells that are important for the stimulation of a T-cell specific immune response in many diseases. Their role in the immunopathogenesis of *Leishmania* has been studied in human disease and in experimental animal models. Here, the authors report the immunohistochemical labelling of LC and IDDC in the skin and regional lymph nodes of a dog naturally infected with *L.infantum*. Several LC of the skin and IDDC in the lymph nodes were infected with *Leishmania* amastigotes. It is likely that these cells play an important role in the immune regulation of disease in the case of canine leishmaniasis.

RIASSUNTO. Le cellule di Langerhans (LC) e le cellule dendritiche interdigitanti (IDDC) sono cellule presentanti l'antigene, importanti per la stimolazione della risposta immunitaria cellulo-mediata in molte patologie. Il loro ruolo nell'immunopatogenesi della leishmaniosi è stato studiato ampiamente nell'uomo e negli animali da laboratorio. Nel presente lavoro, gli autori riportano l'identificazione immunoistochimica delle LC/IDDC nella cute e nei linfonodi regionali di un cane affetto da leishmaniosi da *L.infantum*. Amastigoti di *L.infantum* sono stati osservati in alcune LC della cute ed in IDDC del linfonodo. E' probabile che, anche nel caso della leishmaniosi canina, le cellule dendritiche della cute svolgano un ruolo importante nella immunoregolazione in corso di infezione.

REFERENCES

- Bogdan C., Gessner A., Solbach W., Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Current Opinion in Immunology* 1996, 8:517-525.
- De Souza -Leao S., Lang T, Prina E., Hellio R., Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci.* 1995, 108:3219-3231.
- Dubey JP and Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 1996, 67:1-59.
- Ferrer L. Rabanal R., Fondevila D., Ramos JA, Domingo M. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 1988, 29:381-388.
- Flohe S., Lang T., Moll H. Synthesis, stability, and subcellular distribution of major histocompatibility complex class II molecules in Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infection and Immunity* 1997, 65:3444-3450.
- Isaza DM, Restrepo R., Caceres-Dittmar G., Tapia FJ. Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1996, 55(4): 365-369.
- Marchal ISA, Marchal T., Moore PF, Magnol JP, Bourdoiseau G. Infection of canine Langerhans cells and interdigitating dendritic cells by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. *Revue de medecine Veterinaire* 1997, 148:1, 29-36.
- Moll H., Flohe S., Rollinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbour persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *European Journal of Immunology* 1995, 25:3, 693-699.
- Will A., Blank C., Rollinghoff M., Moll H. Murine epidermal Langerhans cells are potent stimulators of an antigen-specific T-cell response to *Leishmania major*, the cause of cutaneous leishmaniasis. 1992, 22:6, 1341-1347.

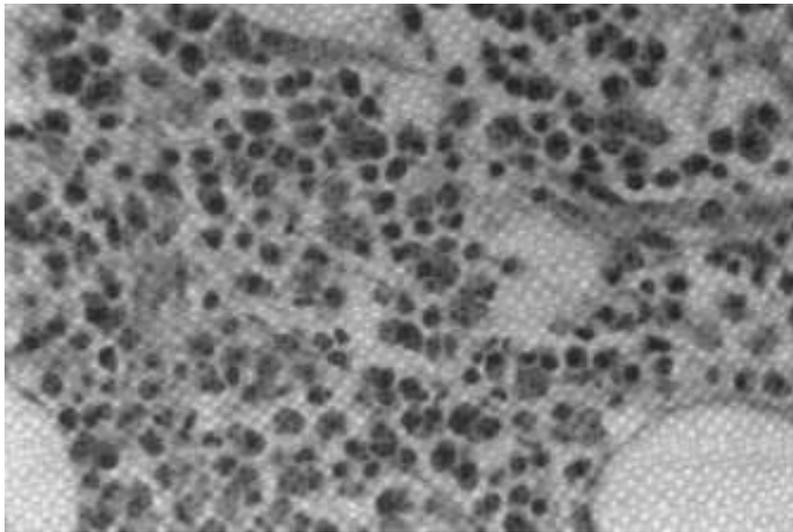


Figure 1. Numerous cells harbouring *Leishmania* amastigotes in the skin of the affected dog

(haematoxylin-eosin x 200).

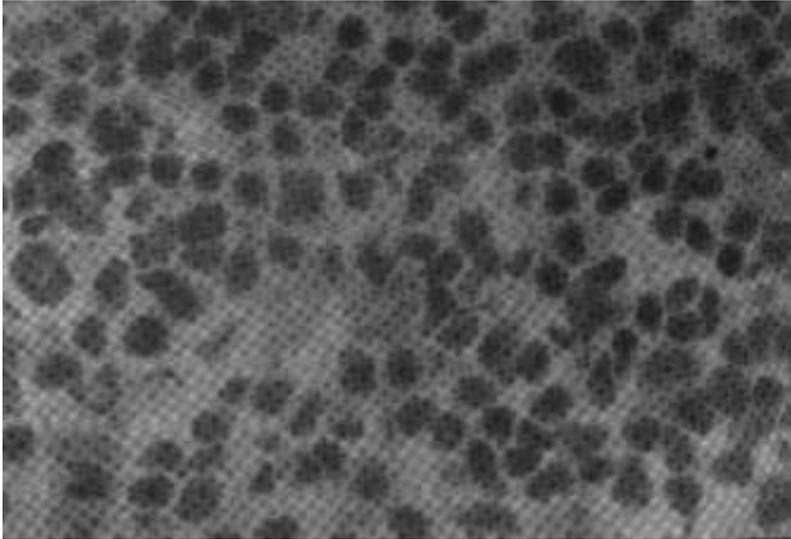


Figure 2. CD1c-positive interdigitating dendritic cell in the lymph node of the affected dog. Note the intracellular amastigotes in the cytoplasm (peroxidase x 1000).

L'INFESTAZIONE DA TRICOSTRONGILI ABOMASALI NEL CAMOSCIO (*Rupicapra rupicapra* L.): ASPETTI EPIDEMIOLOGICI ED IMMUNOPATOLOGICI*

L. Kramer, A. Piaia, B. Passeri, R. Termunian*

Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria, Università di Parma

**Agente di Vigilanza Provinciale, Provincia di Belluno.*

INTRODUZIONE

E' impossibile pensare a biocenosi assolutamente indenne da interventi antropici intesi come alterazioni degli ecosistemi e degli equilibri locali o come precisa azione rivolta alla gestione dell'ambiente naturale, gestione non più procrastinabile vista l'inattuabilità di equilibri naturali che prescindano dalla presenza e quindi dall'azione dell'uomo stesso. Tutti questi interventi hanno comunque alterato il comportamento e le condizioni di vita degli animali selvatici inducendo anche la possibilità che l'elmintofauna abbia subito modificazioni nei rapporti quali-quantitativi in relazione alle situazioni di densità delle popolazioni selvatiche e di contatto con animali domestici. E' possibile infatti che le variazioni della popolazione dei parassiti dell'apparato digerente possono incidere sulla dinamica e sui ritmi di ripopolamento anche del camoscio nell'arco alpino, nonché contribuire all'indebolimento dei soggetti, rendendoli in tal modo più sensibili ad altri agenti patogeni. La maggior parte degli studi condotti sulla parassitosi gastrica negli ruminanti selvatici dimostrano la c.d. "distribuzione binomiale negativa" o *overdispersion* dei parassiti nella popolazione ospite, in cui si osserva un elevato numero di soggetti con carica parassitaria ridotta, finanche assente, e un limitato numero di soggetti con elevata carica parassitaria. Tale distribuzione all'interno della popolazione ospite dipende dalla risposta immunitaria dei soggetti in seguito alla ripetuta esposizione agli antigeni parassitari, risulta nella resistenza acquisita. Recenti studi svolti ad identificare i meccanismi immunologici che vengono attivati nei bovini e negli ovini in corso di infestazione da tricostrongili, hanno dimostrato che la risposta cellulo-mediata locale, a livello della mucosa e del tessuto linfoide mucosa-associata (MALT), è fondamentale per l'elaborazione di una risposta immunitaria efficace nei confronti di tali parassiti (Almeria et al, 1996). In questo senso, può anche essere intesa la resistenza di alcuni ospiti alla infestazione sempre dovuta alla risposta immunitaria, ma può essere quantitativamente diversa nei vari soggetti in base ad alcune differenze genetiche, come già dimostrato per varie specie di ruminanti domestici (Kassai T. e Srèter T.;1992).

Gli scopi del presente lavoro sono stati: 1) di condurre un'indagine preliminare sull'elmintofauna gastrica nelle popolazioni di camoscio presenti nella provincia di Belluno, che ci ha consentito di avere una notevole mole di dati preliminari sulla frequenza e sulla prevalenza dei tricostrongili gastrici in questa zona; 2) di valutare la risposta immunitaria dei soggetti parassitati attraverso indagini immunostochimiche, volte ad identificare le sottopopolazioni linfocitarie che intervengono nello sviluppo della resistenza acquisita, indagine finora mai condotte sui ruminanti selvatici.

Nel presente lavoro illustriamo i risultati ottenuti dallo studio su camosci abbattuti nei mesi di novembre e dicembre 1997 e di un camoscio abbattuto nel mese di aprile 1998 nella provincia di Belluno.

MATERIALI E METODI

Lo studio ha interessato 24 camosci, di cui 7 maschi e 17 femmine di età compresa tra 6 mesi e 15 anni, abbattuti in un programma di caccia di selezione durante l'autunno 1997; un soggetto è stato abbattuto in primavera poichè fortemente colpito da rogna sarcoptica tanto da giustificare l'abbattimento in un periodo diverso da quello di caccia. I comuni da cui provengono gli animali presentano sul loro territorio altri ruminanti sia selvatici

[Cervo (*Cervus elaphus*.), capriolo (*Capreolus capreolus* L.), muflone (*Ovis ammon* L.), stambecco (*Capra ibex* L.)] sia domestici in coabitazione con il camoscio o comunque pascolanti alternativamente col camoscio sugli stessi pascoli.

Dagli animali è stato isolato l'abomaso, insieme all'omaso, dopo legatura degli osti reticolo-omasale e pilorico e contestualmente si è prelevato parte del piccolo omento con i linfonodi tributari. Si è proceduto, quindi, a separare l'abomaso dalla sua aderenza con l'omaso (successivamente eliminato) e si è aperto l'organo lungo la grande curvatura; si è raccolto il contenuto abomasale e l'organo è stato risciacquato in poca acqua.

Il contenuto e il liquido di lavaggio sono stati filtrati in filtri in acciaio con pori di 250 µm e 38 µm. Il materiale così ottenuto è stato poi diluito in soluzione di formalina tamponata al 10 %. La conta dei parassiti è stata effettuata su aliquote di 50 ml e i parassiti maschi sono stati montati in lattofenolo per l'identificazione di genere e di specie attraverso la valutazione degli spicoli dell'organo genitale maschile.

Dall'abomaso fresco si sono prelevati campioni biotici, in parte congelati in isopentano raffreddato in azoto liquido e in parte fissati in formalina tamponata al 10%; stesso trattamento è stato riservato ai linfonodi isolati dall'omento. I campioni congelati sono stati toccati a -80 °C fino alla esecuzione delle prove di immunoistochimica; per i campioni in formalina si è proceduto con le tecniche istologiche di routine, sia di fissazione che di colorazione. Per i campioni congelati prelevati dall'abomaso e dai linfonodi si sono ricavate sezioni al criostato di 6 µm di spessore, successivamente incubate con i seguenti anticorpi: T3-4B5 (anti-CD3, 1:50; DAKO, Italia), Th16B (anti-MHCII, 1:50), CACT138A (anti-CD4, non diluito), CACT80C (anti-CD8, 1:10), CACT61A (anti-γδ, 1:10, VMRD, Pullman, WA). Un complesso streptavidina-biotina-perossidasi (LSAB2 kit, DAKO, Italia) è stato utilizzato, insieme al substrato rosso 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC staining kit, DAKO, Italia), per la visualizzazione dell'immunoreazione; le sezioni sono state infine controcolorate con l'ematosilina di Mayer.

RISULTATI

Tutti i camosci esaminati hanno presentato condizioni generali soddisfacenti, fatto salvo per alcuni soggetti affetti da rogna sarcotica e un soggetto fortemente debilitato da una ferita da fuoco alla mandibola con frattura della stessa, condizioni quindi non riferibili alla parassitosi gastrica.

Alla osservazione macroscopica, la mucosa abomasale ha presentato nella maggioranza dei casi sparsi noduli ombelicati di piccole dimensioni e poco rilevati; non sempre erano presenti piccole lesioni emorragiche da riferire alla attività istoematofaga del genere *Haemonchus*, ma in due casi queste hanno assunto le note di una gastrite emorragica diffusa. In taluni soggetti si sono osservate inoltre noduli linfoidi rilevati nello spessore della mucosa, sia a carico delle pieghe spirali che della parete.

Le specie di parassiti osservati ed identificati sono riportate nella tabella 1: nella prima colonna è riportata la percentuale di camosci infestati dalla stessa specie di nematodi, nella seconda la percentuale di ogni singola specie rispetto all'intera popolazione parassitaria rinvenuta. Le specie prevalenti sono risultate: *Marshallagia marshalli*, rinvenuta nel 91,6% dei camosci esaminati e rappresentante il 56,1% dei nematodi adulti isolati, *Teladorsagia circumcincta* e *Ostertagia occidentalis*, anch'esse presenti in una alta percentuale di soggetti e rappresentanti rispettivamente il 14,6% e il 8,5% dei nematodi adulti. Interessante si è dimostrata la frequenza del *Trichostrongylus axei*, in quanto elevata, e anche la sua percentuale rispetto alla intera popolazione parassitaria è risultata significativa. Similmente si è comportato l'*Haemonchus contortus* pur con valori più contenuti. Altre specie rinvenute sono comunque poco rappresentate.

Per quanto riguarda la valutazione della risposta immunitaria locale, a presenza di nematodi reperite nell'abomaso è caratterizzata dall'infiltrazione di numerosi linfociti T (CD3+). I linfociti T CD8+ e γδ+ rappresentano le sottopopolazioni predominanti. Inoltre, numerose cellule con morfologia dendritica, positive per il MHCII, sono distribuite fra le ghiandole della mucosa e sulla superficie mucosale, spesso in stretto contatto con il parassita. I linfociti CD4+ sono stati rinvenuti in numero limitato. Gli aggregati linfoidi sottoepiteliali hanno mostrato espansione paracorticale con numerose cellule T γδ+ e up-regulation dell'espressione di MHCII. L'esame immunoistochimico dei linfonodi abomasali ha messo in evidenza iperplasia paracorticale, infiltrazione di

numerose cellule MHCII+ nei centri germinativi ed una netta predominanza di linfociti CD8+ e $\gamma\delta$ +

DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio hanno permesso di far luce sulla prevalenza delle diverse specie di parassiti gastrici nel camoscio in una zona che, fino ad ora, non era stata esaminata e hanno permesso di confermare la grande diffusione delle parassitosi gastriche in questa specie come già segnalato da altri ricercatori (Genchi *et al.*, 1982; Genchi *et al.*, 1983; Traldi *et al.*, 1986). E' interessante notare come in questa zona assuma rilevanza il riscontro di parassiti quali il *T.axei* e l'*H.contortus* (presenti rispettivamente nel 66,6% e 33,3% dei camosci esaminati) forse da ricondurre a infestazioni crociate tra camosci e mufloni compresenti nella stessa area e probabilmente anche ad ovini e bovini domestici in alpeggio; meno frequente, invece, l'incidenza di parassiti derivati dal capriolo (nello specifico le specie di *Spiculoptergia spiculoptera*, e *Trichostrongylus capricola*). In concordanza con altri studi confermiamo la presenza anche in queste zone della specie *Ostertagia leptospicularis*, presenza segnalata solo di recente nei ruminanti (Manfredi e Zecchini, 1986).

Le indagini istologiche hanno accertato la presenza di larve incistate nella mucosa e probabilmente in ipobiosi a conferma della stagionalità della infestazione da tricostrongili, anche se rimane da chiarire se tutte le specie siano ugualmente capaci di dare origine al fenomeno dell'ipobiosi o se la presenza di certe specie derivi esclusivamente dalla contaminazione dei pascoli. Questi aspetti andrebbero meglio valutati in primavera ed estate, ma si pone il problema del reperimento dei soggetti in un periodo diverso da quello di caccia.

I risultati del nostro studio, inoltre, hanno messo in evidenza che l'infestazione da tricostrongili nel camoscio è caratterizzata da una forte risposta immunitaria cellulo-mediata. La presenza di cellule dendritiche MHCII-positivo (cellule responsabili per la presentazione dell'antigene, APC), spesso in stretto contatto con il parassita presente nelle ghiandole gastriche e con i nematodi presenti sulla superficie della mucosa, indica che gli antigeni parassitari sono fortemente immunogeni. La risposta cellulo-mediata è evidente non solo per la infiltrazione di linfociti T nella mucosa, ma anche per la iperplasia paracorticale degli aggregati linfoidi, sede primaria di elaborazione antigenica a livello del tratto gastrointestinale. La predominanza di linfociti T CD8+ e $\gamma\delta$ + è analoga a quella osservata nei ruminanti domestici in corso di infestazione da nematodi (Almerià *et al.*, 1997) e conferma l'importanza di tali sottopopolazioni. Si è ipotizzato, infatti, che i linfociti T $\gamma\delta$ + possano riconoscere gli antigeni presentati dagli APC e che la loro attivazione sarebbe responsabile della stimolazione di cellule immunocompetenti, in modo particolare i T CD8+, in grado di controllare la popolazione parassitaria (Almerià *et al.*, 1997). L'iperplasia paracorticale dei linfonodi regionali, inoltre, è caratteristica della risposta T-mediata nei confronti di antigeni derivati dalla mucosa gastrica.

CONCLUSIONI

Le indagini fin qui svolte hanno solo carattere preliminare ma mettono in luce importanti aspetti riguardanti la convivenza sullo stesso territorio di ruminanti selvatici e domestici e sui possibili scambi di parassiti tra gli stessi con risvolti sulla salute e quindi sulla tutela delle specie selvatiche. Alcuni studi, infatti, hanno già dimostrato sensibili modificazioni nella prevalenza e nell'incidenza di diverse, e talvolta nuove specie elmintiche nel camoscio in altre zone geografiche (Genchi *et al.*, 1982; Genchi *et al.*, 1983; Traldi *et al.*, 1986). Nel nostro caso, facciamo riferimento in particolare al muflone, di recente introduzione e la cui presenza può incidere sulla salute dei camosci soprattutto attraverso un aumento della prevalenza e della intensità delle infestazioni da *H. contortus*.

Riteniamo infine che i dati ottenuti possano essere utili per studiare le diversità di comportamento delle parassitosi nei ruminanti domestici (distribuzione casuale dei parassiti) o nei selvatici (fenomeno della *overdispersion*), in relazione alla resistenza maggiore degli ultimi su base immunitaria e alla interferenza nei primi della chemioterapia.

SUMMARY. The results obtained in a survey on the abomasal helminths of 24 chamois from the Alpine area of Northeast Italy, shot during the November 1997 hunting season, are reported. *Marshallagia marshalli* was the predominant nematode species, however *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus axei* represented the predominant species in several cases. It is clear from our results that, also in chamois, abomasal nematodes stimulate a T cells response. $\gamma\delta$ t cells appear to be quite important, even though their role in ruminant immunology is still far from clear. MCHII expression, both on mononuclear cells and mucosal epithelium, would indicate that antigen presentation is an essential step in the immune response to these parasites. CD8+ cells are cytotoxic and its expression on $\gamma\delta$ t cells is associated with cell activation. This is the first report of the use of monoclonal antibodies against mucosal lymphocytes surface antigens in the chamois.

RIASSUNTO. Vengono riportati i risultati ottenuti da una indagine sui parassiti abomasali di 24 camosci provenienti dalla provincia di Belluno e abbattuti durante la stagione di caccia del 1997. La specie parassitaria predominante è risultata essere *Marshallagia marshalli*, sebbene *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus axei* abbiano raggiunto in parecchi animali una intensità significativa. Dai nostri risultati emerge che, anche nel camoscio, i nematodi abomasali stimolano una risposta T mediata; i linfociti T $\gamma\delta$ + sembrano assumere un importante ruolo ma siamo ancora lontani dal chiarire appieno la loro funzione. L'espressione dell'antigene MCHII sia sui mononucleati che sull'epitelio della mucosa starebbe ad indicare che la presentazione dell'antigene sia un momento essenziale nella risposta immunitaria contro questi parassiti. I linfociti CD8+ sono linfociti citotossici e la loro espressione sui linfociti T $\gamma\delta$ + sarebbe associata alla attivazione cellulare. Questa è la prima descrizione dell'uso di marcatori immunostochimici per lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie nel camoscio.

BIBLIOGRAFIA

- ALMERIA' S., CANALS A., ZARLENGA D.S., GASBARRE L.C. 1997 Isolation and phenotypic characterization of abomasal mucosal lymphocytes in the course of a primary Ostertagia ostertagi infection in calves. *Vet. Imm. Immunopath.*, 57:87-98.
- DE BATTISTI R., MASUTTI L. Piano faunistico-venatorio per la Provincia di Belluno (per il quinquennio 1994-98). Amministrazione provinciale di Belluno, Assessorato Caccia e Pesca.
- GENCHI C., MANFREDI M.T., RONCAGLIA R., SIOLI C., TRALDI G. 1982. Contributo alla conoscenza degli elminti gastrointestinali dei ruminanti selvatici: osservazioni sul camoscio (*Rupicapra rupicapra* L.) nella riserva della Val Belviso. *Parassitologia* 24:197-203.
- GENCHI C., MANFREDI M. T., TOSI G., FRIGO W., 1983. Composizione della popolazione dei nematodi gastrointestinali del camoscio (*Rupicapra rupicapra* L.) in relazione alla variazioni di ambiente di alcune zone nell'arco alpino centrale. *Parassitologia* 25: 1-3.
- GENCHI C., BOSSI A., MANREDI M.T., 1985. Gastrointestinal nematode infections in wild ruminants *Rupicapra rupicapra* and *Dama dama*: influence of density and cohabitation with domestic ruminants. *Parassitologia* 27:211-223.
- KASSAI T., SRE'TER T., 1992 Genetic aspects of host resistance to helminthic infections. *Research and Reviews in Parasitology* 52 (3-4):67-75.
- MANFREDI M.T., ZECCHINI O., 1986 Composizione dell'elmintofauna abomasale in popolazioni di *Capreolus capreolus*. *Parassitologia* 28:276.

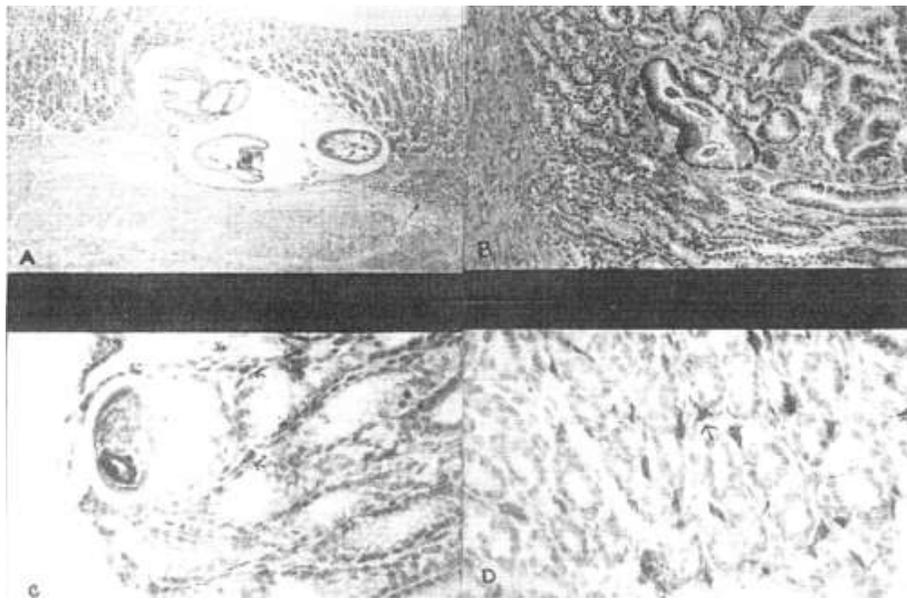


Figura 1. Mucosa abomasale: a-b) nematodi penetrati nella mucosa gastrica (H/E x 200); c-d) numerose cellule MHCII+ distribuite nel tessuto ghiandolare, anche in vicinanza del parassita. Notare la morfologia dendritica (freccia) (Perossidasi x 400).

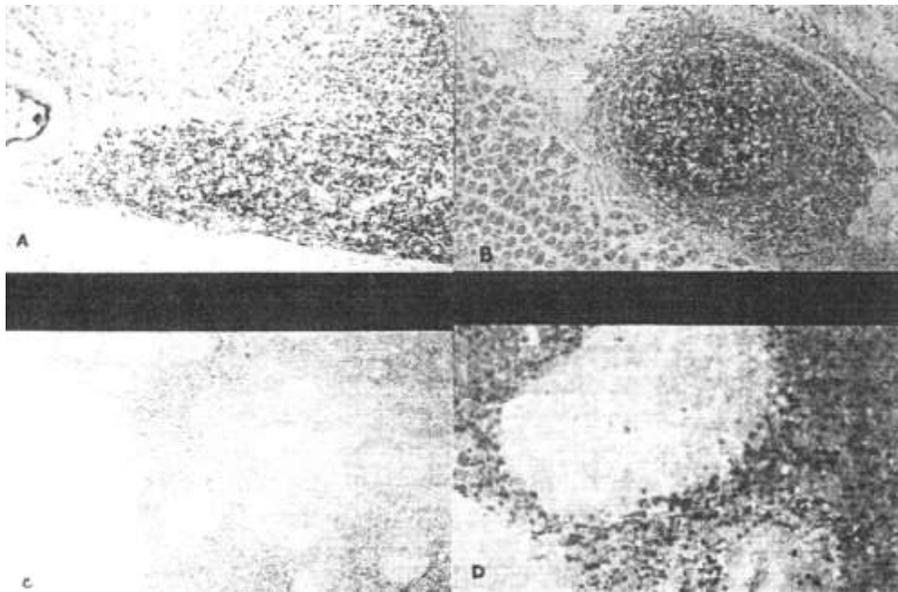


Figura 2. a) aggregato linfoide adiacente ad un nematode con numerose linfociti T che invadano la mucosa (CD3+, Perossidasi x 200); b) nodulo

linfoide della sottomucosa abomasale con intensa espressione di MHCII nel centro germinativo (Perossidase x 200); c) linfonodo abomasale con iperplasia paracorticale (H/E x 100); d) linfociti CD γ δ + predominano nella immunoreazione ai nematodi abomasali (Perossidasi X 400).

RILIEVI IMMUNOISTOPATOLOGICI IN DUE CANI INTOSSICATI DA METHOMYL

Luppi A., Perillo A.

Istituto di Anatomia Patologica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Parma

PREMESSA

Per pesticida secondo il gruppo di lavoro della Federal Environment Pesticide Control dell'O.M.S., si intende "una sostanza o una miscela di sostanze atte a prevenire, distruggere, allontanare o attenuare qualsiasi avversità (insetto, nematode, fungo, erbe nocive ed altre forme di piante terrestri ed acquatiche, sia di vita animale o di virus, batteri o altri microrganismi al di fuori di quelli che colpiscono l'uomo o gli altri animali viventi) e qualsiasi sostanza o miscela di sostanze usate come influenzanti la vita delle piante, compresi i defoglianti e gli essicanti".

In Italia al termine di pesticida di origine anglosassone viene preferito quello di fitofarmaco o, sebbene più limitativo, quello di antiparassitario.

La grande varietà di fitofarmaci (fertilizzanti fogliari, fisiofarmaci, fitoregolatori, diserbanti, fungicidi, insetticidi, acaricidi, nematodocidi, limacidi, ecc.) e la continua modificazione strutturale dei principi attivi per aumentarne l'efficacia spiega l'enorme diffusione raggiunta nella lotta contro gli insetti, dove senza alcun dubbio sono stati ottenuti i successi più numerosi e costanti. Tuttavia accanto alla loro indiscussa utilità questi composti prospettano un grave inconveniente: l'elevatissima tossicità per gli animali e per l'uomo.

La loro immissione nell'ambiente rappresenta, quindi, una continua fonte di rischio, polimorfa, quantitativamente ingente, che espone al pericolo di intossicazioni acute o croniche, anche gravi l'uomo e molte specie animali, non solo quelle confinabili al mondo agricolo-rurale, ma investendo pure gli animali dell'ambiente urbano, dove i casi di intossicazione da insetticidi non sono del tutto infrequenti da registrare.

Lo studio delle intossicazioni da pesticidi, dolose od accidentali, negli animali d'affezione ed in particolare nel cane costituisce pertanto un capitolo della patologia veterinaria importante, complesso e sempre attuale.

Il rischio tossicologico per il cane, se non di natura dolosa mirata è per lo più legato, alla somministrazione accidentale del fitofarmaco nell'acqua di bevanda o nell'alimento, oppure dovuto ad un'esposizione occasionale, allorchè l'animale sosta o transita su un terreno (per lo più frutteto) irrorato direttamente dall'insetticida; oppure indirettamente, per effetto della ventilazione, che sposta il tossico su un altro terreno, introduce, inala o assorbe il principio attivo irrorato. Altra possibilità non infrequente d'intossicazione deriva dall'utilizzo di recipienti, che hanno contenuto e nel quale è residuata parte del pesticida, per l'abbeverata od il pasto dell'animale stesso.

In un simile rischio connesso all'uso di pesticidi si inserisce la presente nota, intesa a descrivere due episodi d'intossicazione acuta da noi osservati a distanza di circa un mese l'uno dall'altro, su due cani boxer, madre e figlia, appartenenti allo stesso proprietario e che vivevano in un ambiente rurale, intossicati da methomyl (S-metil N-metilcarbamoil-ossi tioacetimidato) meglio conosciuto con il nome di Lannate (Lannate, 25, Terlate), un carbammato eterociclico, appartenente alla V° classe dei presidi sanitari, usato prevalentemente come insetticida.

La tossicità acuta di formulati commerciali contenenti carbammati eterociclici come principio attivo è ormai sufficientemente conosciuta (Delaunoy et al 1997) e viene per lo più correlata alla sintomatologia clinica, alle valutazioni ematochimiche, ad indagini anamnestiche, a determinazioni chimiche, alla ricerca biologica nonché al quadro necroscopico.

Il Lannate, appartiene ad una grande famiglia di pesticidi a larghissima diffusione, i carbammati eterociclici, e grazie ad alcune sue caratteristiche (tossicità meno grave e di durata più breve nei confronti dei mammiferi, ridotta permanenza nell'ambiente e formazione di metaboliti scarsamente dannosi) sta rimpiazzando gradualmente altri prodotti ad azione analoga come gli organofosfati.

Pure in quest'ambito il methomyl tra i carbammati è uno dei più tossici, la sua DL50 per via orale nel ratto è pari a 17 mg/Kg di P.V., quando il propoxur (Baygon) od il Carbaryl hanno rispettivamente una DL50 di 83-104 e 250-721 mg/Kg di P.V. (1).

TAB.1: Principali carbammati. Valori della DL₅₀ nel ratto (modificata da Soffiotti-Nebbia)

Nome comune	Nome commerciale	Usi	DL50(mg/Kg p.v.)
Aldicarb	Ternik	I.N.	0.6-1
Carbofuran	Furadan	I.N.A.	5-11
Aminocarb	Matacil	I.M.	30-60
Methomyl	Lannate	I.	17
Dioxacarb	Elocron	I.	80-150
Methiocarb	Mesuroi	I,A,M	100-130
Promecarb	Carbamult	I	74-108
Propoxur	Baygon	I,A	83-104
Primicarb	Primor	I	147
Barban	Carbyne	E	600
Dimetilan	Snip	I	47-64
Benomyl	Benlate	F,A	9500
Isolan	Isolan	I	13-23
Mobam	Mobam	I	234

I = Insetticida **N** = Nematodocida **F** = Fungicida **A**: Acaricida **E** = Erbicida

Il methomyl risulta essere ugualmente tossico per inalazione, per contatto con le mucose, buccale, nasale, congiuntivale e con la cute (DL50 pari a 1000 mg/kg se la cute presenta delle escoriazioni).

Dopo ingestione viene rapidamente assorbito nel tratto digestivo e la sua emivita, come per gli altri carbammati, è piuttosto ridotta. Nelle 24 ore successive all'assunzione, l'80-90% della dose ingerita è eliminata attraverso le urine (1).

Il processo di assorbimento attraverso l'apparato digerente può essere più o meno rapido a causa della possibile formazione di composti insolubili o di degradazione, l'insorgenza e la intensità di vomito e diarrea ed in relazione all'integrità funzionale del fegato, organo principalmente interessato alla sua metabolizzazione.

Anche l'inalazione di vapori, di goccioline fini o di polveri può rivestire particolare importanza nella comparsa dell'intossicazione, in ragione della vasta superficie di assorbimento rappresentata dal letto alveolare e per la possibilità che ha il tossico di raggiungere rapidamente le strutture nervose

senza l'intervento di quei processi metabolici di protezione che entrano in funzione quando l'assorbimento avviene tramite l'apparato digerente. L'intossicazione da carbammati può avvenire anche per contatto attraverso la cute, specie se lesa; per questa via assorbimenti protratti di microdosi di carbammati possono provocare per il loro tropismo anche quadri di reattività cutanea allergica (Rosenstein and Brice 1975).

L'azione tossica del methomyl consiste in una inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi responsabile della degradazione dell'acetilcolina, il neuromediatore del sistema nervoso parasimpatico. L'acetilcolina, non più distrutta, si accumula a livello delle sinapsi nervose, provocando una stimolazione esagerata dei recettori colinergici (2).

La maggior labilità del legame enzima-carbammato, contrariamente a quello che si osserva per gli organofosforici, è reversibile, ed esita nella liberazione spontanea di una certa quantità di acetilcolinesterasi attiva. La determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi ematica, per questo motivo, non è altrettanto valida come nel caso di intossicazione da organofosforici (3).

Da un punto di vista funzionale, quindi, il blocco della normale attività colinesterasica esercitato dai carbammati si traduce in un'anomala inibizione dei processi fisiologici di idrolisi enzimatica dell'acetilcolina che, non venendo distrutta nel tempo utile fisiologico, continua ad esercitare la mediazione chimica nervosa, creando uno stato di abnorme iperfunzionalità del sistema nervoso colinergico. Si instaura così, a livello di molteplici distretti organici, una grave e complessa fenomenologia morbosa, non raramente mortale, che riconosce appunto, come principale momento patogenetico, l'alterata funzionalità della regolazione nervosa vegetativa e motorio-somatica.

L'accumulo di acetilcolina nei siti colinorecettivi colinergici provoca quindi una rapida iperstimolazione parasimpatica che si manifesta con effetti di tipo muscarinico, nicotinico e centrale.

I segni clinici che si osservano in caso di intossicazione acuta possono essere di tre tipi:

I primi sintomi che vengono normalmente rilevati corrispondono alla stimolazione dei recettori muscarinici dell'acetilcolina: scialorrea, scolo nasale sieroso, debolezza muscolare, miosi, sudorazione, aumento del tono e della peristalsi del tubo gastro-enterico, che si manifesta con dolorabilità addominale, vomito, diarrea, tenesmo, defecazione e minzione involontarie. A livello respiratorio, il broncospasmo e l'aumento della secrezione bronchiale sono note, così come l'edema polmonare che in certi casi può condurre a morte (collasso cardio-respiratorio). In questa prima fase osserviamo inoltre un effetto bradicardizzante (2, 4).

Alla prima fase segue una sindrome nicotinica, per stimolazione degli omonimi recettori, con comparsa di crampi, convulsioni, fascicolazioni muscolari. Ipertermia, tachicardia e midriasi sono fenomeni facilmente osservabili in questa seconda fase. La morte sopravviene normalmente per paralisi dei muscoli respiratori (2,3).

Nel terzo ed ultimo stadio compaiono sintomi come fobia, letargia, abbattimento del sensorio, ipotensione che può sfociare in una condizione comatosa dell'animale (4).

L'avvelenamento cronico, più supposto che reale, si manifesterebbe generalmente in quegli animali che hanno superato la fase acuta (2).

E' fuori dubbio che di fronte alla morte improvvisa di un animale la diagnosi di sospetto avvelenamento, doloso od accidentale, può essere formulata se si tiene presente che l'evento risulta possibile. Va da sé che in corso di intossicazione acuta da methomyl, prevalentemente caratterizzata da effetti tossici funzionali, da diversi riscontri clinici e scarsi reperti anatomopatologici, al perito settore non è facile formulare una corretta diagnosi, se non ha il prezioso conforto delle informazioni anamnestiche, sull'ambiente in cui vive l'animale, sul sospetto di una possibile esposizione al tossico,

nonché il supporto dell'esame chimico di identificazione del fitofarmaco. In un simile contesto l'accertamento necroscopico sembrerebbe perdere di valenza diagnostica, mentre nella realtà dei fatti assume importanza fondamentale nell'indirizzare ed integrare le ricerche (chimiche ed eventualmente biologiche) per una diagnosi di certezza.

Va precisato che l'identificazione di un pesticida non sempre ha valore conclusivo, se non è dimostrato che quantitativamente la concentrazione rinvenuta può risultare mortale per lo stesso animale.

Infatti solo una corretta collaborazione tra proprietario, clinico ed anatomopatologo può fornire i dati necessari al lavoro del tossicologo. L'esame tossicologico infatti deve essere mirato all'individuazione di non più di una o due molecole, dal momento che risulta pressochè impossibile determinare gli oltre 300 principi attivi ad azione fitofarmacologica registrati presso il nostro Ministero della Sanità, nonché i relativi 5000 formulati commerciali, tenendo ben presente l'oneroso costo delle indagini ed il tempo necessario per portarle a termine.

Avendo avuto occasione di osservare due casi di intossicazione acuta da methomyl in due cani boxer, abbiamo ritenuto opportuno riportare i rilievi fatti a scopo peritale, anche perché in letteratura i casi mortali accidentali correlati direttamente a tale insetticida sono del tutto infrequenti.

L'EVENTO

Presso il nostro Istituto sono stati portati 2 cani di razza boxer di sesso femminile, con età di 3 ed 1 anno (rispettivamente madre e figlia), deceduti a distanza di un mese l'una dall'altra.

Il proprietario aveva richiesto che sui due animali venisse eseguito un esame autoptico, avanzando l'ipotesi che i cani fossero stati oggetto di avvelenamento dal momento che circa 40 giorni prima gli era morto improvvisamente anche un altro soggetto di 6 mesi necroscopicamente refertato dal veterinario curante come quadro di cardiomiopatia dilatativa idiopatica pur avendo presentato anamnesticamente andatura vacillante, decubito apatico, disturbi respiratori, inappetenza e scialorrea.

Dei due soggetti venuti alla nostra attenzione la madre era stata trovata morta dal proprietario nella campagna circostante la propria abitazione, senza che questi potesse osservare alcun sintomo intravitali nell'animale. La figlia, invece aveva manifestato, poco prima del decesso, una sintomatologia caratterizzata da tremori muscolari, dispnea, rigidità degli arti, scialorrea, inappetenza, miosi, pollachiuria e lacrimazione.

Tutti gli animali erano tenuti liberi in un ampio terreno recintato, confinante con un frutteto e sorvegliavano un piccolo allevamento di tacchini.

ESAME NECROSCOPICO

I due animali si presentavano in buone condizioni generali di nutrizione ed all'esame autoptico si metteva in evidenza il tatuaggio identificativo nel piatto interno della coscia destra senza rinvenire alcunchè di anomalo all'esame esterno della cute.

Estese macchie ipostatiche di color rosso vinoso si presentavano nelle regioni declivi.

Sparsa infiltrazioni emorragiche si evidenziavano a carico del sottocute nelle regioni toraciche ed addominali. Le mucose apparenti risultavano fortemente congeste.

Nulla da rilevare alle parti molli che ricoprono il cranio che si presentava integro con la dura madre non aderente di aspetto e spessore normale;

Intensa la congestione meningo-encefalica.

Cervello, cervelletto, bulbo e ponte in sezione non rivelavano lesioni e si confermava la diffusa congestione. All'apertura della cavità toracica veniva repertato in entrambi i cadaveri la presenza di liquido siero-emorragico.

Modesti i versamenti nel cavo pericardico e in quelli pleurici.

Il cuore aumentato di volume si presentava di aspetto globoso per sfiancamento del ventricolo destro con il miocardio piuttosto flaccido, congesto e con segni di miocardiosi.

I polmoni espansi, di colorito rosso-cianotico apparivano edematosi senza essere in preda a processi flogistici. Al taglio non si apprezzavano lesioni a focolaio, ma un'abbondante infiltrazione di liquido schiumoso, rossastro che diffondeva anche in bronchi e trachea.

Tutti questi riscontri a livello di cuore e polmoni risultavano più appariscenti nella cagna giovane rispetto al cadavere della madre.

All'apertura della cavità addominale si rinveniva un limitato versamento siero-emorragico con sierosa peritoneale liscia, lucente e vasi mesenterici fortemente iniettati.

Il fegato, congesto, aumentato di volume, evidenziava in superficie minute aree giallastre sparse, di aspetto distrofico, particolarmente evidenti (0.5-1 cm di diametro) nell'animale giovane che venivano confermate anche alla sezione di taglio.

La cistifellea appariva ripiena di bile fluida color giallo-verdastro.

Fenomeni di congestione erano evidenti nei due animali a carico della milza discretamente megalica, che al taglio presentava la polpa rossa ben trattenuta, i follicoli malpighiani e la trabecolatura poco appariscenti.

Nulla di patologico, macroscopicamente visibile a carico del pancreas, tranne un'intensa congestione.

Lo stomaco dilatato era parzialmente ripieno di materiale alimentare indigerito asciutto, rappresentato da penne, piume, zampe di volatili (verosimilmente tacchinotti) nella madre, mentre nello stomaco della figlia si rinveniva analogo contenuto, sempre ricco di piume ma abbastanza fluido. A livello intestinale il tenue si presentava vuoto mentre il grosso intestino evidenziava feci poltigliose bruno-verdastre senza rinvenire masse fecali formate.

I reni apparivano congesti, di consistenza e volume normali, facilmente scapsulabili. Al taglio non si apprezzavano lesioni.

Anche le surrenali risultavano congeste senza manifestare almeno macroscopicamente alcunchè di patologico. La vescica non conteneva urina e non evidenziava fenomeni patologici. Da segnalare che nella carcassa della madre più manifesti apparivano i fenomeni autolitici a livello parenchimale, dal momento che l'esame necroscopico è stato effettuato circa 72 ore dopo la morte della cagna.

PRELIEVO ED INVIO DI MATERIALE.

Eseguite le necroskopie si provvedeva ad effettuare prelievi di porzioni di organi (polmone, rene, fegato, milza, surrenali, pancreas, encefalo e midollo spinale) per effettuare indagini istopatologiche, seguendo le comuni tecniche di fissazione (formalina 10%), di paraffinazione e di colorazione (PAS, ematossilina-eosina, Van Gieson, Luxol Fast blue) ed indagini immunoistochimiche solo su campioni di midollo spinale, previamente congelati in isopentano preraffreddato, utilizzando un anticorpo monoclonale specifico biotinilato anti-acetilcolintransferasi (anti-ChAT, clone 11-255 Boehringer Mannheim), visualizzato con il complesso ABC-perossidasi, seguendo la metodica ottimizzata dalla casa produttrice.

Considerato il sospetto di intossicazione da fitofarmaci, ed in particolare da insetticidi organofosforici o da carbammati, si procedeva a prelevare in toto il materiale alimentare presente nello stomaco dei due soggetti a raccogliarlo in due distinti sacchetti di plastica per poi congelarlo a -18° C.

Successivamente il suddetto materiale veniva inviato al laboratorio chimico dell'Istituto di Medicina Legale e Assicurazioni del nostro Ateneo perché, su specifica nostra richiesta, provvedesse alla ricerca degli antiparassitari testé accennati.

RISULTATI

ESAME ISTOLOGICO

I quadri morfologici osservati istologicamente sui campioni di organi prelevati ripetevano globalmente con assoluta costanza gli stessi aspetti in tutti e due i casi.

A livello polmonare l'esame microscopico rivelava aspetti di edema polmonare associato a fenomeni congestizi, confermando il quadro macroscopico.

In ambito epatico le sezioni allestite mostravano quadri di congestione associati ad aree in preda a distrofia ipossica epatocitaria. La PAS dimostrava scarsa reattività, particolarmente accentuata nella zona periferica del lobulo.

Il rene, oltre all'aspetto congestizio, mostrava sofferenze glomerulari e fenomeni di degenerazione vacuolare ed idropica a carico dell'epitelio tubulare, interessando prevalentemente la parte prossimale dei tubuli contorti e meno intensamente quella dei tubuli retti.

Nel surrene gli aspetti osservati, al di fuori di una discreta congestione vasale, non presentavano particolari scostamenti dalla norma nell'aspetto cromatico e morfostrutturale.

Anche nelle sezioni istologiche della milza e del pancreas non si rilevano apprezzabili differenze morfologiche rispetto alla norma, se non il prevalere di una condizione congestizia generalizzata.

A carico dell'encefalo del midollo spinale nulla di particolarmente anomalo da segnalare se non quadri di congestione vasale diffusa.

ESAME IMMUNOISTOCHIMICO

Per quanto attiene l'esame del midollo spinale delle due cagne intossicate la reazione immunoistochimica è porsa sempre molto tenue (foto 1) e comunque decisamente inferiore a quella ottenuta nei controlli (foto 2), utilizzando in quest'ultimo caso sezioni di midollo di cani morti per altre cause non coinvolgenti il midollo spinale.

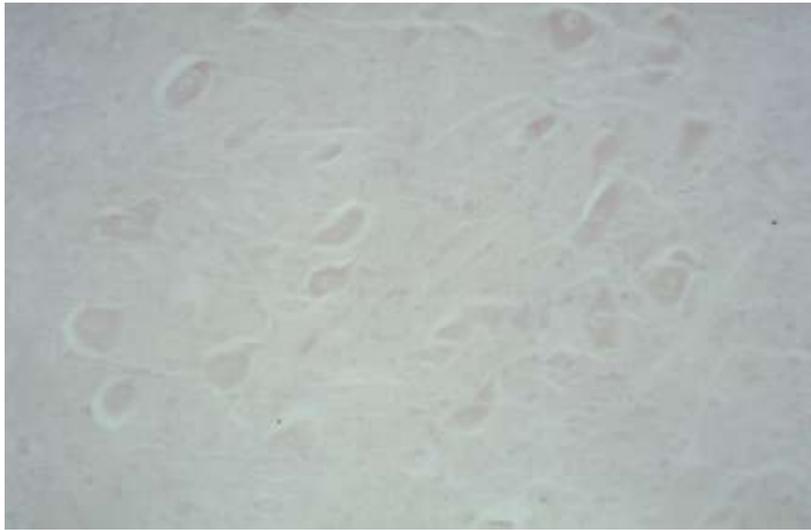


Foto 1. Debole reazione immunoistochimica all'anticorpo anti-acetilcolintransferasi (anti-ChAT) osservata a livello di midollo spinale della madre (200 X).

In alcune sezioni, sempre dei soggetti in esame, la reattività è stata quasi del tutto negativa.

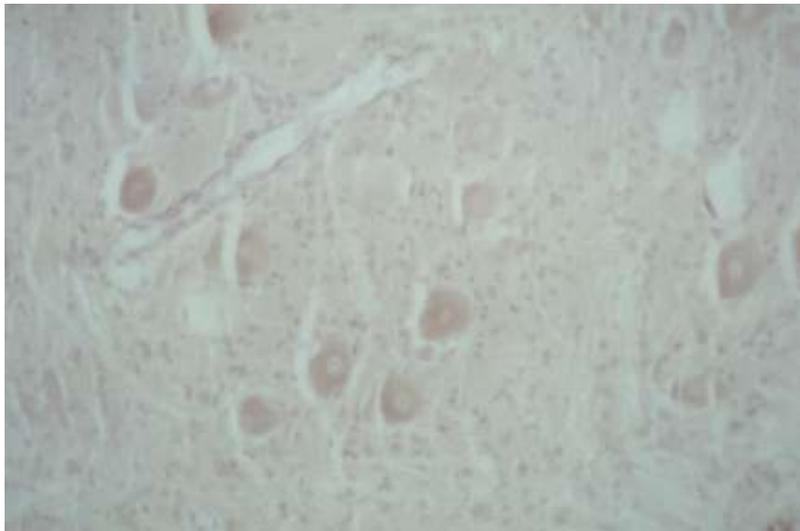


Foto 2. Normale reazione immunoistochimica all'anticorpo anti-acetilcolintransferasi (anti-ChAT) osservata a livello di midollo spinale di controllo (200 X).

ESAME TOSSICOLOGICO

Seguendo le tecniche ufficiali di analisi previste dalle normative vigenti per la ricerca di pesticidi su materiali omogenati acidificati ed estratti con cloroformio i riscontri di carbammati eterociclici ed in particolare del methomyl (S-metil N-metilcarbamoil-ossi tioacetimidato) sono risultati positivi. Più specificamente veniva osservata la presenza massiva di methomyl nel campione prelevato dallo stomaco della madre ed in tracce in quello della figlia (vedi figure 1 e 2). Data la natura chimica del gruppo attivo, il dato qualitativo, anche a detta del responsabile del laboratorio di tossicologia dell'Istituto di Medicina Legale del nostro Ateneo che ha eseguito le analisi, può essere considerato sufficiente per la formulazione di una corretta diagnosi di avvelenamento da methomyl, trattandosi di un tossico particolarmente potente (V classe).

Negativa è risultava la ricerca di composti organofosforici nei campioni esaminati.

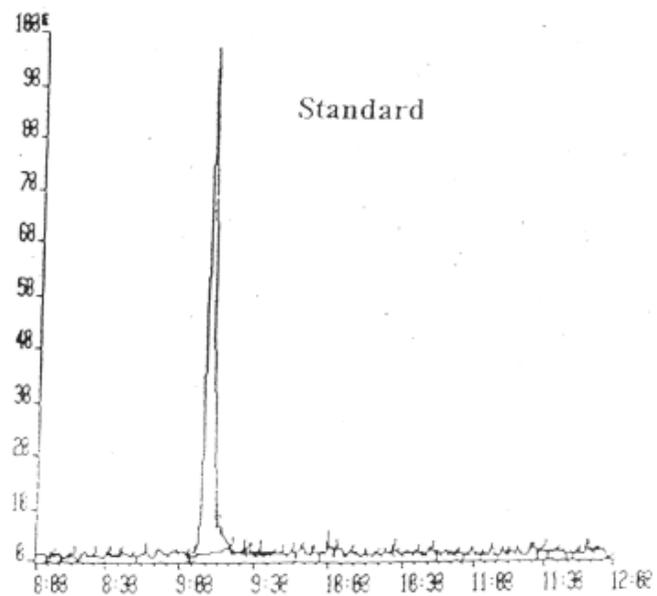


Figura 1. Profilo GC di una miscela standard di methomyl

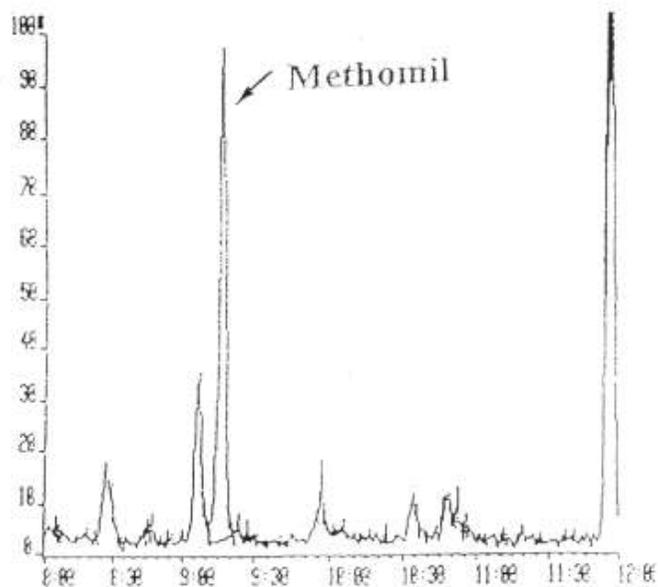


Figura 2. Profilo GC di una miscela standard di methomyl nel contenuto gastrico della cagna madre

CONCLUSIONI

Nel contesto presente, sulla base delle valutazioni anamnestiche, sintomatologiche, necroscopiche, immunoistochimiche e tossicologiche si può con certezza diagnostica affermare che i due cani esaminati sono morti per intossicazione acuta da methomyl, un carbammato molto usato in agricoltura.

Chiara ed evidente l'eziologia dell'avvelenamento riscontrato, le cui modalità di insorgenza sono da correlare al fatto che recentemente e a più riprese erano state poste in atto irrorazioni di methomyl nel frutteto confinante con il recinto in cui erano tenuti i cani.

In tale terreno occasionalmente sono presenti anche alcuni tacchinotti sfuggiti alla sorveglianza del proprietario. Tali tacchinotti, si sono intossicati per esposizione diretta o verosimilmente per ingestione del fitofarmaco, venendo ben presto a morte e risultando facile preda dei cani, voraci, che incidentalmente sono transitati nel frutteto.

I cani dopo avere divorato i tacchini si sono a loro volta intossicati e sono deceduti.

A conclusione del nostro lavoro vogliamo sottolineare come i due casi di intossicazione acuta da methomyl descritti nei loro aspetti macro e microscopici e per le modalità con le quali si sono verificati assumono un certo interesse pratico per la scarsa documentazione in questo senso rilevata in letteratura ma soprattutto perché vuole richiamare l'attenzione e far riflettere sui rischi cui possono andare incontro l'uomo e gli animali che vivono o transitano in vicinanza di terreni irrorati di recente con siffatti pesticidi.

RIASSUNTO. L'autore, dopo aver esaminato i dati riportati in letteratura sull'intossicazione acuta da carbammati eterociclici espone i quadri anatomopatologici, macro e microscopici, osservati in due cani venuti accidentalmente a morte per aver ingerito methomyl.

SUMMARY. The authors, after considering literature data on eterocyclic carbamate poisoning, describe macroscopic and microscopic lesions in two dogs, died for fortuitous methomyl ingestion.

Si ringrazia, per la preziosa collaborazione, il Dott. B. Bernardelli dell'Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni - Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università degli Studi di Parma.

BIBLIOGRAFIA

- Soffiotti M.G., Nebbia C. Carbammati, in Beretta E.
- Tossicologia Veterinaria Beretta E. Ed. Grasso, 1984, pp. 230-236.
- Delaunois A., Lessire F., Fanal H., Ansay M., Bloden S., Gustin P. Intoxications au temik chez les animaux domestiques et sauvages: un problème alarmant en Wallonie. Ann. Med. Vet., 1997, 141, 353-360.
- Quick M. P. Pesticide poisonig of livestock: A review of cases investigated. The Veterinary record, 1982, 111, 5-7.
- Rosenstein L. S. and Brice M. A. The use of toxicity studies to predict long term chronic effect resulting from the carbamate pesticide carbaryl. European Soc. Toxicol. 17° Meeting Montpellier 1975, XVII, 33-47

STATO DELL'ARTE SUI MELANOMI DEL CANE: CARATTERIZZAZIONI IMMUNOFENOTIPICHE E SVILUPPI DIAGNOSTICI

Passeri B.

(Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria)

INTRODUZIONE

La configurazione nosologica dei melanomi a livello della cute e delle mucose, sia in campo umano che nel settore animale, risente tuttora delle notevoli perplessità patogenetiche, istogenetiche, cliniche e diagnostiche, che si riflettono anche sulla non sempre chiara loro classificazione.

Tali incertezze sono prima di tutto imputabili al fatto che finora sono mancati sicuri dati morfologici selettivi, in grado di consentire una convincente discriminazione tra elementi melanotici neoformati e quelli proliferativi per stimolo neoplastico atipico.

Inoltre a livello gengivale, più frequentemente che in altri distretti, si riscontrano tante forme di melanomi apparentemente non atipiche dal punto di vista istologico che evolvono poi verso la malignità clinica, quanto forme chiaramente neoplastiche, sebbene i rientri clinici possano farle ritenere di altra natura.

In medicina umana sono stati fatti molti studi sul melanoma, mentre in medicina veterinaria poco si sa sui melanomi del cane. Con il presente lavoro abbiamo ritenuto utile compiere una sintesi della letteratura sull'argomento, in particolare sulle varie espressioni immunologiche e tassonomiche, in comparazione con l'analoga neoplasia umana e portare un contributo al riguardo con specifico riferimento ai melanomi della cute e delle mucose gengivali del cane anche in ordine al materiale esaminato in questi ultimi anni.

L'incidenza dei riscontri ha portato inoltre ad un'attenta discussione morfologica, nonché ad uno studio immunostochimico dei melanomi refertati, vagliandone l'immunofenotipizzazione, al fine di individuare l'espressione antigenica presente sulle cellule neoplastiche e su quelle infiltranti la lesione stessa.

IMMUNOLOGIA DEI TUMORI

Gli studi sui tumori hanno dimostrato che la maggior parte di essi contiene un evidente infiltrato di cellule infiammatorie, spesso richiamate nel sito di insorgenza del tumore. Di solito predominano linfociti e macrofagi, ma possono essere identificati altri tipi cellulari come cellule dendritiche, granulociti neutrofilici e mastociti o anche plasmacellule. I linfociti esprimono sulla loro superficie delle molecole o "marcatori" che possono essere utilizzate allo scopo di distinguere le diverse sottopopolazioni cellulari. La nomenclatura internazionale ha definito questi marcatori come CD, "cluster of differentiation", ovvero marcatore di differenziazione e si riferisce a gruppi di anticorpi monoclonali ciascuno dei quali lega uno specifico antigene di membrana (2). L'utilizzazione di anticorpi monoclonali per definire le sottopopolazioni linfocitarie ha dimostrato che nel tumore possono essere identificati alcuni sottotipi principali di linfociti ed il loro stato di attivazione. Tuttavia resta ancora piuttosto difficile delineare una stretta associazione tra la presenza di alcuni particolari sottotipi linfocitari e la prognosi dell'animale. Ciò può essere una conseguenza del fatto che solo una piccola parte delle cellule infiltranti sono effettivamente reclutate in maniera specifica verso il sito del tumore.

Gli studi fatti su queste sottopopolazioni cellulari hanno messo in luce il fatto che la maggior parte dei linfociti deputati alla immunosorveglianza contro i tumori, sono Natural Killer (NK), cioè cellule citotossiche tumore-specifiche (6).

Tuttavia è evidente che i tumori sfuggono in qualche modo al sistema immunitario. Si sono formulate svariate ipotesi sui meccanismi di difesa del tumore dal sistema immunitario: alcuni pensano che potrebbe non essere riconosciuto dal sistema immunitario quando le sue dimensioni sono ridotte, e che poi al momento in cui esso stimola la risposta immunitaria potrebbe essere troppo grande per essere delimitato, mediante meccanismi di "blocco" o di soppressione da parte del sistema immunitario.

Le cellule neoplastiche possono sfuggire al sistema immunitario anche mediante la perdita di alcune espressioni di molecole, importanti per il loro riconoscimento immunologico. In maniera alternativa i tumori possono non esprimere molecole necessarie per l'adesione dei linfociti o acquisire molecole che alterano le loro potenzialità metastatiche. Un esempio è l'espressione di forme diverse di CD44 nelle cellule neoplastiche metastatiche di ratto (3).

Un altro meccanismo protettivo sembra essere l'aumentata espressione della molecola di superficie ICAM-1, come si verifica nella progressione neoplastica del melanoma umano (2-4). ICAM-1 ha alcune omologie con le proteine leganti il complemento e può proteggere il tumore dalla lisi da questo mediata (2-4-5).

MELANOMA

In medicina umana sono state studiate ampiamente le interazioni tra il sistema immunitario dell'ospite ed il melanoma. La regressione spontanea della neoplasia in alcuni casi è stata provocata proprio da processi melanociti distruttivi, che hanno portato ad affermare che esistono degli specifici meccanismi anti-tumore.

Nell'analisi istopatologica di tumori primari e di qualche tumore metastatico (7) si sono osservati numerosi linfociti disposti intorno alla lesione e nidi di cellule infiltranti. L'infiltrazione della massa neoplastica da parte dei leucociti, esprime spesso il CD 45+, soprattutto nei melanomi non capsulati; nei melanomi nodulari o nelle metastasi la risposta non è altrettanto marcata (8-40). Tuttavia la maggior parte delle cellule infiltranti la neoplasia, nell'uomo risulta essere CD3+, TCR α β +, CD4+. Negli stadi neoplastici primitivi la maggior parte dei linfociti sembrano esprimere soprattutto il CD4 mentre i linfociti CD8+ compaiono soprattutto negli stadi avanzati.

Tuttavia altre cellule oltre ai linfociti infiltrano il melanoma, sia dell'uomo e nel cane. Queste sono soprattutto cellule presentanti l'antigene (APC, Antigen Presenting Cells), macrofagi e cellule di Langerhans (LC); linfociti B e plasmacellule sono abbastanza rare così come i linfociti Natural Killer (8).

Il comportamento delle LC in caso di melanoma varia a seconda degli stadi di progressione della neoplasia. È stato osservato che le LC aumentano significativamente intorno al melanoma "in situ" e negli stadi iniziali della neoplasia.

Man mano che si ha la progressione della neoplasia, verso uno stadio di invasione profonda, il numero dei linfociti diminuisce e di conseguenza si osserva anche la diminuzione delle LC, probabilmente causa necrosi tissutale e fenomeni regressivi congiunti (10). Si pensa pertanto che gli antigeni associati al melanoma siano presentati dalle LC che agiscono come APC locali. La diminuzione delle LC a sua volta provoca la diminuzione dei linfociti infiltranti la neoplasia e pertanto anche il loro effetto antineoplastico (9).

Durante la progressione del melanoma, quindi, le cellule vanno incontro a modificazioni molto significative per il sistema immunitario. Questi meccanismi coinvolgono anche un altro aspetto del sistema immunitario cioè l'adesione intercellulare. Questa varia ad ogni differente stadio di progressione del melanoma.

Le molecole di adesione ICAM-1, ma esse non sembrano essere le sole coinvolte in caso di sviluppo di melanoma maligno umano.

I melanociti che si trovano sulla membrana basale sono a stretto contatto con i cheratinociti, mentre tra di loro non sembrano stabilire contatti e questo contatto è mediato dalle Caderine E (11) e da altre integrine (α 1 β 1, α 3 β 1, α V β 1) (12), che sono assenti nel melanoma dell'uomo e del cane. I melanociti aderiscono ai cheratinociti attraverso la caderina E (21)

Le cellule del nevo invece sembrano aderire tra di loro e non con i cheratinociti. Questa adesione sembra sia mediata dalla molecola MEL-CAM, la cui espressione subisce un importante incremento quando si ha la trasformazione maligna del nevo (38, 39). Questo potrebbe suggerire che l'espressione di questa molecola è dovuta alla "fuga" delle cellule del melanoma dalla influenza dei cheratinociti.

L'espressione del CD44 è stata osservata in numerosi melanomi, tuttavia il suo ruolo nella progressione del melanoma è ancora da accertare.

Il principale meccanismo di adesione delle cellule del melanoma primitivo alle cellule endoteliali appare mediato dall'integrina VLA-4 e dal suo ligando VCAM-1, che però sembra essere poco espresso nelle cellule neoplastiche in metastasi.

Le cellule del melanoma possono aderire ai linfociti attraverso numerosi recettori, tra cui forse il principale anche in termini temporali, ICAM-1 (13). L'espressione di questa molecola è stata correlata alle dimensioni del melanoma ed alla sua capacità metastatica. La sua espressione subisce una "up-regulation" in presenza di interferon- γ e una "down-regulation" in presenza di IL-2 (interleuchina 2), e questo meccanismo può essere molto importante per il tumore ai fini di sottrarsi al sistema di immunosorveglianza. Inoltre le cellule del melanoma sembra che riescano ad interagire con i linfociti proprio attraverso l'espressione di ICAM-1 in quanto questa molecola è in grado di legarsi all'antigene LFA-1 (Leukocyte Function-associated Antigen-1) espresso sulla superficie dei linfociti (14). Anche la molecola LFA-3 sembra essere espressa dalle cellule del melanoma e il suo ligando sul linfocita è CD2+.

Le cellule del melanoma sembrano infine avere una stretta interazione anche con la matrice extracellulare, sempre attraverso complessi meccanismi di adesione mediati dalle integrine α 1 β 1, α 3 β 1, α V β 1, le quali sembrano legarsi alle laminine, alla fibronectina ed al collagene. Il loro aumento di espressione è legato a maggior malignità e potere metastatico del melanoma.

Possiamo quindi concludere che l'espressione dei recettori cellulari cambi notevolmente sia qualitativamente che quantitativamente nella progressione del melanoma e anche nell'eventuale sviluppo delle caratteristiche di malignità dal nevo, al nevo displastico, al melanoma maligno, anche se non sempre avviene questa evoluzione ed in molti casi, come già sopra accennato, si ha l'insorgenza del melanoma primario senza alcun tipo di lesione precedente (15).

MELANOMI CUTANEI

Il melanoma cutaneo è relativamente comune nel cane e raro nel gatto. In alcune razze come lo Scottish Terrier, il Boston Terrier, l'Airdale, lo Schnautzer e il Cocker Spaniel è stata riscontrata un'incidenza relativamente elevata di questa neoplasia, mentre pare che i gatti non presentino predisposizioni di razza.

Conroy (18) riporta che i tumori melanici nel cane sono il 6% di tutte le neoplasie osservate e circa i 2/3 sono benigni. Tuttavia il 5-15% delle lesioni melanotiche maligne è stato osservato a

carico della cute, mentre il rimanente 80% dei melanomi maligni si trova a livello gengivale e del letto ungueale (19).

Secondo Goldschmidt (20) le localizzazioni anatomiche più frequenti si possono osservare nelle seguenti sedi:

LOCALIZZAZIONE	PERCENTUALE
Testa	36.5
Arto anteriore	20.5
Arto posteriore	12.5
Collo	2.3
Dorso	5.6
Torace	7.3
Addome	7.0
Peritoneo	2.1
Coda	1.0
Scroto	1.6
Multipli	3.6

Alcuni autori tuttavia sostengono che il rapporto tra forme benigne e maligne si aggiri intorno al 50% (67-68).

L'età di insorgenza del melanoma varia dai 7 ai 14 anni con una media di circa 9.5 anni secondo Garma-Avina (21); in particolare è stata osservata una prevalenza delle forme benigne intorno ai 9-10 anni mentre le neoplasie maligne si svilupperebbero di più verso 11-15 anni, in accordo con studi effettuati all'Animal Medical Center, in un periodo di 10 anni dal 1981 al 1991 (22).

Alcuni autori ritengono che i maschi siano più colpiti delle femmine (23-24) anche se non sembra ci sia una particolare differenza di predisposizione tra i due sessi, secondo Goldschmidt (20):

Totale maschi	49.5%
Intatti	38.7%
Sterilizzati	10.8%
Totale femmine	50.5%
Intatte	22.5%
Sterilizzate	28.0%

CLASSIFICAZIONE

Le lesioni melanocitiche della cute dell'uomo sono classificate in 20 o più classi tassonomiche tra nevi e melanomi, ciascuno con aspetti clinici ed anatomopatologici nonché quadri prognostici molti specifici. Per molte di queste lesioni sono state individuate le rispettive omologie negli animali domestici, tuttavia non ci sono ancora abbastanza informazioni in grado di supportare una comparazione con la classificazione usata in oncologia umana. Inoltre gli studi tuttora in corso dimostrano che il comportamento biologico di questi tumori negli animali domestici si discosta da quello osservato nell'uomo (25).

Nell'uomo, i melanomi di dimensioni e crescita comparabili al melanoma canino implicano il 95% di rischio di morte entro 5 anni, inoltre i melanomi oculari, quasi sempre maligni e metastatizzanti per l'uomo sono quasi sempre benigni nel cane.

I melanomi cutanei vengono comunemente classificati come benigni e maligni ed i criteri più usati per differenziarli si basano sulla localizzazione anatomica e sull'aspetto istopatologico della neoplasia. Il melanoma maligno è simile al benigno, ma generalmente è meno pigmentato ed ha un maggiore pleomorfismo cellulare e nucleare, presenta ipercromasia nucleare e più di 2 figure mitotiche per campo microscopico oltre ad una crescita più invasiva. Spesso si osserva necrosi ed infiammazione oltre ad una spiccata tendenza a mostrare attività giunzionale. Di solito i melanomi a cellule fusiformi sono particolarmente maligni.

Nel cane l'indice mitotico è il parametro prognostico più utilizzato: Bostock (26) correla la presenza di più di 2 mitosi per campo microscopico (10X) ad un'alta mortalità entro i primi 3 anni

dall'insorgenza del tumore. Secondo Goldschmidt (20) l'indice mitotico non è sempre significativo per formulare una diagnosi di malignità. La nomenclatura dei tumori melanotici in medicina umana è complessa e può creare confusione specialmente quando si usano termini come nevo congenito, nevo acquisito e cellule del nevo, in quanto il loro iniziale significato deriva dal concetto di macchia congenita colorata, e sono stati usati per la prima volta proprio con questa accezione da Kraft e Frese nel '76 (27). Questa serie di lesioni non sembrano spesso essere ben distinte dal melanoma benigno (o melanocitoma). E' inoltre difficile individuare lesioni del cane e del gatto strettamente rassomiglianti ai nevi umani e presentano comunque un andamento clinico ed un aspetto istologico molto differenti. Inoltre si ritiene che il nevo sia un'alterazione di natura iperplastica che può originare da ogni componente cutanea, singola o mista. Per questo la parola nevo dovrebbe sempre essere seguita da un aggettivo come: melanotico, epidermico, vascolare, sebaceo, collagenoso ecc. che specifichi la sua origine (17). Nel cane è abbastanza frequente trovare strutture somiglianti ai nevi a livello della cute intorno al capezzolo, che però non possono essere definite propriamente lesioni.

Su questa base, Magana-Garcia et al. (28) hanno recentemente suggerito di definire tutte le proliferazioni non congenite e benigne dei melanociti dell'uomo come melanocitomi e di usare il termine di melanoma come sinonimo di melanoma maligno.

Conroy nel '67 (18) propose per la prima volta, una classificazione che tentava di equiparare le neoplasie canine a quelle umane usando le stesse definizioni:

I nevi pigmentati vengono intesi come formazioni benigne congenite che sono caratterizzati da crescita nel derma di cellule riccamente pigmentate localizzate principalmente alle giunzioni dermo-epidermiche.

Il nevo giunzionale è invece piatto o leggermente rilevato caratterizzato dalla presenza di cellule molto simili alle precedenti.

Il nevo misto è una lesione costituita da cellule pigmentate localizzate sia nel derma sia nell'epidermide. Si sviluppa di solito sulle palpebre e sulla zona perioculare e può essere peduncolato o nodulare con superficie liscia. Questi tumori restano solitamente benigni anche se talvolta si possono verificare trasformazioni maligne.

Il nevo dermico è una formazione rilevata consistente in un nido di cellule pigmentate localizzate a livello dermico con variabile quantità di pigmento.

Il melanocitoma dermico è il tipo più comune tra i tumori melanotici benigni e microscopicamente può essere distinto nei tipi fibroso e cellulare, il primo morfologicamente simile al comune nevo blu dell'uomo e si trova di solito in zone dove l'epidermide è particolarmente spessa e ricoperta di peli.

La casistica che Conroy raccolse nel '67 (18) riguardava 100 cani che presentavano lesioni melanocitiche. Le sue osservazioni furono le seguenti:

Nevi melanocitici	10%
Nevi pigmentati	20%
Melanocitomi dermici	30%
Melanomi maligni	40%

I 40 melanomi maligni sembravano derivare da melanociti normali dell'epidermide e dell'epitelio del cavo orale, ma anche da elementi giunzionali e dermici dei nevi pigmentati.

In medicina veterinaria la classificazione raccomandata dal WHO stilata da Weiss e Frese nel '74 (29) identifica i seguenti tipi di tumore nel cane:

BENIGNI	<i>Melanoma benigno ad attività giunzionale</i> <i>Melanoma benigno dermico => fibrosi del derma</i> <i>=> cellulari del derma</i>
MALIGNI	<i>Tipo epitelioide</i> <i>Tipo a cellule fusate</i> <i>Tipo misto</i> <i>Tipo a cellule dendritiche a vortice</i>

La classificazione dei tumori melanotici benigni è stata in parte modificata da alcuni autori (20), per poter meglio definire i diversi tipi di lesione e differenziarli da quelli definiti in medicina umana che, come già sopra discusso, non sempre presentano caratteristiche assimilabili.

E' stato perciò utilizzato un criterio basato sulla localizzazione delle cellule nella cute, per cui i melanocitomi vengono distinti in: giunzionali, misti e dermici.

MELANOMA MALIGNO

MELANOMA MALIGNO

MELANOMA MALIGNO	<i>Tipo epitelioido</i>
	<i>Tipo a cellule fusiformi</i>
	<i>Tipo a cellule epiteliodi e fusate</i>
	<i>Tipo a cellule dendritiche</i>

I melanomi maligni sono localizzati più frequentemente sulla cute delle estremità, nella mucosa buccale e nelle giunzioni muco-cutanee, infatti, mentre in quelli a sede ungueale la malignità arriva al 50%, per quelli cutanei varia dal 5 al 15%.

Possono esser anche più grandi di un uovo, largamente ulcerati in superficie e nei melanomi orali si ha spesso l'invasione dell'osso e la sua lisi.

Di solito la percentuale di distribuzione si presenta come segue:

Cavità orale	56%
Labbra	23%
Cute	11%
Dita	8%
Altre localizzazioni	2%

Quando il tumore è ulcerato bisogna valutare attentamente la crescita intraepidermica delle cellule neoplastiche che possono arrivare a coinvolgere l'intera epidermide, oppure formare nidi di cellule neoplastiche atipiche a livello di giunzioni dermo-epidermiche.

Gli Schnautzer nani e giganti e lo Scottish Terrier sono forse i cani maggiormente colpiti, in quanto hanno mostrato una peculiare predisposizione all'insorgenza del melanoma non solo cutaneo, ma anche del letto ungueale (20).

I melanomi maligni digitali provocano deformità dell'unghia in quanto si formano a livello della zona germinativa del letto ungueale e si sviluppano come masse pigmentate o anche non pigmentate.

Di solito i melanomi digitali hanno alto potere metastatico: in uno studio eseguito al "The Animal Medical Center" di New York, 9 su 17 cani con melanoma digitale hanno sviluppato metastasi polmonari prima dell'asportazione della massa e cinque su nove hanno sviluppato metastasi quasi subito dopo l'asportazione della neoplasia primitiva (22).

Alcuni di questi tumori sono amelanotici e in questi casi i noduli sono di colore più tendente al rossastro. Per poter confermare la diagnosi di melanoma maligno, in questi casi è utile fare ricorso a speciali colorazioni in grado di svelare tracce di melanina, come la metodica dell'impregnazione argentea secondo Fontana.

Il melanoma maligno cutaneo può occasionalmente svilupparsi dal melanoma dermico benigno. Tuttavia la maggior parte delle volte il melanoma maligno non presenta precursori benigni ma insorge con caratteristiche di malignità.

Un importante aspetto di questi tumori è l'attività giunzionale, e/o la crescita intraepiteliale, che di solito è dimostrabile se il melanoma non è già ulcerato. Tuttavia se il melanoma presenta una disposizione delle cellule a spirale oppure è composto da cellule di tipo dendritico la crescita intraepiteliale può sfuggire.

La crescita intraepiteliale è caratterizzata dalla presenza di cellule atipiche, singole o raccolte in nidi o infiltrazioni a banda a livello dello strato basale e superficiali dell'epidermide.

Dal punto di vista citologico, per valutare la malignità del tumore si devono osservare: la dimensione nucleare, la basofilia della cromatina, la presenza di mitosi e di cellule giganti multinucleate a vario grado di pleomorfismo cellulare. Questi criteri valgono per quasi tutte le forme di melanoma maligno, ad eccezione di quello di tipo dendritico e di quello con disposizione a spirale delle cellule.

La crescita è quasi sempre molto invasiva con coinvolgimento dei vasi linfatici e piccole vene, mentre la presenza di necrosi è comune ma non è costante.

La proliferazione nel derma o nel corion dei melanociti con caratteristiche di malignità è solitamente l'aspetto dominante del melanoma maligno, anche se in molti casi non è stata osservata la componente intraepidermica o intramucosa del tumore, ma soltanto una proliferazione dermica e sottomucosale delle cellule neoplastiche.

La maggior parte dei melanomi maligni del cane sono soprattutto dermici, anche se in molti casi è piuttosto difficile affermarlo, a causa dello stato di ulcerazione a cui l'epidermide va spesso incontro.

Normalmente si verifica la distruzione delle strutture annesse ed il collagene dermico e sottomucoso è rimpiazzato da strati di cellule neoplastiche che spesso vanno ad infiltrare anche il tessuto adiposo sottostante.

Il grado di pigmentazione varia notevolmente: in alcuni casi le cellule più pigmentate si raggruppano a formare chiazze visibili macroscopicamente, mentre, come già detto sopra, alcuni tumori si manifestano in forma amelanotica. Questo è dovuto alla incontrollata attività degli enzimi coinvolti nella biosintesi e/o degradazione catabolica della tirosina, provocata dalla presenza della neoplasia, e quindi alla conseguente alterazione nella normale sintesi della melanina.

Nei melanomi dell'uomo, si fa largo uso dell'anticorpo monoclonale anti-proteina S-100, ma nei melanomi maligni del cane non è stata riscontrata una immunoreazione attendibile.

Perciò, a tutt'oggi, la prognosi in caso di lesione melanocitica nel cane, si basa ancora soprattutto sull'aspetto macroscopico ed istologico della neoformazione nonché sulla sua sede di origine.

La maggior parte dei melanomi che si sviluppano in sede labiale o a livello di altre giunzioni muco-cutanee, nonché nel letto ungueale, sono considerati maligni. Aronsohn e Carpenter (19) hanno dimostrato che solo in 50% dei cani che presentano melanomi digitali sopravvive e di questi il 36% muore entro i primi due anni dopo escissione chirurgica.

Bostock nel 79 (26) ha osservato che quando il tumore è inequivocabilmente maligno, il 67-75% dei cani svilupperà metastasi o recidiva locale entro i primi 2 anni dopo l'exeresi.

Infatti, la percentuale di recidiva dei melanomi maligni in seguito ad asportazione è altissima così come la diffusione metastatica che avviene soprattutto a carico dei linfonodi prima di tutto, quindi di polmoni, di cervello, di cuore, di fegato, di rene e di milza.

MELANOMI ORALI

I tumori benigni e maligni della cavità orale rappresentano il 6-7% di tutte le neoplasie del cane (30). Le forme più maligne sono rappresentate dal melanoma maligno, dal carcinoma squamoso e dal fibrosarcoma, rappresentanti insieme il 50% dei tumori della cavità orale. Il melanoma benigno rappresenta da solo circa il 30-40% dei rimanenti tumori.

Manifestano una certa predisposizione le razze canine con mucosa orale intensamente pigmentata:

RAZZA	N°	%
Pointer Tedesco	41	2.8
Weimaraner	9	2.4
Golden Retriever	11	2.3
San Bernardo	8	2.2
Boxer	21	2
Labrador Retriever	20	1.7
Cocker Spaniel	30	1.6
Meticci	92	0.8
Barboncino	47	0.8

L'età media di insorgenza si aggira intorno agli 11 anni ed il rischio di sviluppare il melanoma orofaringeo aumenta con l'età con un picco tra i 10 e i 14 anni (31). Secondo Hoyt (32) le sedi

preferenziali per lo sviluppo del melanoma orale nel cane sono rappresentate da:

Gengiva (premolari inf. e molari sup.)	42-63%
Mucosa labiale	15-33%
Palato duro e molle	10-16%
Lingua	1.2-7%
Tonsille	2%

ASPETTO MACROSCOPICO

Possono avere aspetto nodulare o sessile, spesso ulcerato con aree necrotiche facilmente ulcerate, intensamente o parzialmente pigmentate, in alcuni casi amelanotiche.

I melanomi maligni sono caratterizzati da rapido accrescimento, precoce invasione locale ed elevato indice mitotico. Di solito provocano lisi dell'osso sottostante e questo provoca la precoce caduta di uno o più denti.

ASPETTO MICROSCOPICO

Originano dai melanociti presenti nell'epitelio della mucosa o sottomucosa (30).

Gli aspetti più importanti per l'identificazione istologica del melanoma dagli altri tipi tumorali sono la morfologia cellulare e la posizione nucleare.

I melanomi maligni orali sono di solito composti da nidi intraepiteliali di cellule poliedriche, simil-epiteliali, contenenti abbondante citoplasma granulare, ipercromatico o vescicolare con nuclei rotondi od ovali contenenti uno o due nucleoli prominenti. Le cellule sono arrangiate in lobuli irregolari separati da fibre collagene (29).

Solitamente le cellule neoplastiche arrivano ad invadere la lamina basale dell'epitelio, tuttavia si possono spesso osservare anche infiltrazioni nella compagine epiteliale, specialmente quando la biopsia viene fatta prima dell'ulcerazione superficiale (29).

DIAGNOSI

La valutazione del tumore è basata essenzialmente sulle dimensioni della massa, sull'eventuale coinvolgimento delle strutture ossee sottostanti, nonché sulla palpazione del collo per la valutazione di linfonodi.

Non è sempre facile distinguere un melanoma amelanotico da un carcinoma squamoso o da un sarcoma indifferenziato. Perciò la diagnosi definitiva richiede la biopsia della massa e l'utilizzo di colorazioni e di tecniche immunostochimiche, di cui già discusso sopra, che possano accertarne la natura.

PROGNOSI

Di solito la prognosi è infausta, in quanto nella maggior parte dei casi si sviluppano recidive anche dopo l'escissione chirurgica, con la formazione di metastasi principalmente ai linfonodi regionali ed ai polmoni (33).

I linfonodi mandibolari e faringei vengono colpiti da metastasi nel 70-80% dei casi e possono essere macroscopicamente normali od alterati nelle loro dimensioni e consistenza.

In uno studio effettuato da Hahn (34) su 67 cani, dopo escissione chirurgica della massa orale, egli osservò che il 27% sviluppò recidiva locale; il 50% sviluppò metastasi regionali o distanti dalla sede di insorgenza del tumore primario; il 57% morì, spontaneamente o in seguito ad eutanasia.

Benché si sia cercato di dare un valore prognostico a molti aspetti clinici ed istologici, tuttavia, a tutt'oggi, i parametri di maggiore importanza prognostica sono ancora le dimensioni della massa, la sua localizzazione ed il suo indice mitotico (<2-3 figure mitotiche per campo microscopico a forte ingrandimento).

Recentemente alcuni ricercatori hanno attribuito ai melanomi localizzati rostralmente alla mandibola o caudalmente all'osso mascellare un valore prognostico più favorevole purché la massa si

mostri di dimensioni <8 cm con indice mitotico <3 (34).

Generalmente i melanomi delle giunzioni mucocutanee sono considerati ad alto grado di malignità in quanto tendono a metastatizzare frequentemente (35).

CONTRIBUTO SPERIMENTALE

Le lesioni melanocitiche del cane tuttavia sembrano avere un comportamento biologico ed in alcuni casi, anche un aspetto morfologico, che si discosta abbastanza da quelle umane, anche se purtroppo gli studi fatti a proposito in medicina veterinaria sono ancora molto scarsi.

Molti degli studi eseguiti negli ultimi anni hanno avuto come scopo l'individuazione di anticorpi monoclonali capaci di caratterizzare in modo specifico le cellule del melanoma maligno del cane. Berrington et al (16) hanno testato su melanomi del cane, una serie di anticorpi monoclonali routinariamente utilizzati in medicina umana per caratterizzare le lesioni melanotiche. I risultati ottenuti hanno evidenziato che gli anticorpi monoclonali HMSA-1 e HMSA-5, entrambi in grado di legare degli epitopi sulle glicoproteine dei melanosomi nei melanociti normali e neoplastici, possono reagire con le cellule di melanoma canino rispettivamente nel 60% e nel 69% dei casi analizzati. Tuttavia, non sono riusciti a dimostrare una certa specificità di questi anticorpi nei confronti dei melanociti, in quanto i tumori non melanocitici che sono stati testati, hanno dato positività nel 29% dei casi.

Oliver III et al. (36) hanno allestito un anticorpo monoclonale diretto contro le cellule del melanoma canino, gettando le basi per l'identificazione di molecole in grado di reagire specificamente con questo tipo di neoplasia.

Molto recentemente Ritt et al. (36) hanno analizzato le mutazioni dei geni soppressori delle neoplasie in corso di melanoma maligno multicentrico del cane, ed hanno osservato la scomparsa della chinasi p21/Waf pan-ciclin-dipendente, indotta dal gene p53 che funziona come gene soppressore, la quale arresterebbe la progressione del ciclo cellulare. Questo ha portato alla conclusione che questo meccanismo abbia una notevole importanza nella progressione verso la multicentricità del melanoma primario.

Recentemente si è sentita anche la necessità di immunofenotipizzare le lesioni melanotiche, al fine di impostare anche terapie di nuovissima concezione. Dow et al. (110) hanno sperimentato la terapia genica nel melanoma del cane. Questo studio è stato però preceduto da una serie di esperimenti di immunofenotipizzazione mirati ad interpretare l'immunogenicità della lesione.

Lo scopo della presente ricerca è di fissare il fenotipo del melanoma del cane attraverso l'uso di diversi anticorpi monoclonali, al fine di individuare l'espressione dei diversi antigeni presenti sulle cellule neoplastiche e sulle cellule che infiltrano la lesione.

ANTICORPI UTILIZZATI NELLO STUDIO DEL MELANOMA

ANTICORPI UTILIZZATI	FUNZIONE
ICAM-1 (CD54)	Molecola di adesione espressa sui linfociti, sulle cellule endoteliali, particolarmente in caso di infiammazione. In medicina umana è stato dimostrato un suo incremento nelle lesioni metastizzanti del melanoma maligno.
NKI/C3	IgG che reagisce con un antigene glicoproteici principalmente espresso nel citoplasma delle cellule del melanoma.
HMB45	IgG in grado di riconoscere gli antigeni citoplasmatici di melanoma e dei nevi giunzionali dell'uomo. L'anticorpo non è tuttavia in grado di distinguere tra lesioni benigne e maligne.
MEL-1	Anticorpo monoclonale in grado di identificare CD22 un ganglioside che si trova sulla superficie delle cellule del melanoma e su altre cellule di origine neuroectodermica.
S-100 (α e β)	Proteina ad alta acidità presente nel sistema nervoso, nelle surrenali ed in diversi tipi di neoplasie tra cui i nevi e i melanomi maligni.
CADERINA E	Molecola di adesione intercellulare implicata in molteplici patologie. Il meccanismo patogenetico ipotizzato nel caso del melanoma maligno dell'uomo si basa sul fatto che si verifichi un'alterazione spaziale tra i melanociti ed i cheratinociti, perciò vi è un "down regulation" di queste molecole e le cellule del melanoma diventano "libere" e capaci di dare metastasi.
CD1	Gli antigeni CD1 sono espressi nella corticale dei timociti ma non sulle cellule T mature. Questi antigeni sono i migliori marcatori delle cellule dendritiche o APC.
CD44	Espresso su un gran numero di cellule in quanto coinvolto nell'adesione e nel "rolling" dei leucociti che vengono richiamati dal sangue periferico verso gli organi linfoidi e verso i siti di infiammazione e di aggregazione leucocitaria. Alcune varianti originate dallo "splicing" alternativo sembrano coinvolte nella progressione delle neoplasie.
CD45	E' considerato l'antigene comune della famiglia dei leucociti. Lo "splicing" alternativo genera 8 possibili isoforme. Il CD45RA in particolare viene espresso sulle cellule T "naive", mastocitomi, plasmocitomi.
CD49d (VLA-4 catena α)	Promuove l'adesione tra ligandi superficiali. Svolge un ruolo basilare nella migrazione dei linfociti dal letto circolatorio all'interno dei tessuti ("rolling") attraverso le molecole VCAM-1. E' anche coinvolta nell'attivazione dei linfociti T e nella differenziazione delle cellule staminali emopoietiche. La sua espressione è stata evidenziata sulle cellule dendritiche e sulle cellule del melanoma.
CD3-TCR	Complesso presente soltanto sulla superficie delle cellule T mature. nel cane è stata finora osservata l'espressione di due tipi di TCR: alfa-beta e gamma-delta ciascuno dei quali è associato al complesso CD3 che è comune ad entrambi i recettori.
CD79a	E' il complesso recettoriale delle cellule B ed è costituito da una IgG di superficie.
CD90	Nel cane viene principalmente espresso sui timociti, sulle cellule T, sui monociti, eosinofili e neutrofili, sulle cellule dendritiche del derma/APC e sui fibroblasti. Le cellule B negli stadi iniziali della loro differenziazione possono esprimere questo anticorpo.
CD11c/CD18 (integrine β_2)	Le integrine β_2 sono la più importante famiglia di molecole di adesione dei leucociti. Questo complesso si esprime anche sui macrofagi, sui neutrofili, basofili.

MATERIALI E METODI

Gli anticorpi monoclonali sono stati selezionati in base al rationale della ricerca in quanto specifici marcatori di antigeni associati al melanoma in oncologia dell'uomo. Sono stati inoltre investigati i differenti aspetti dell'espressione degli anticorpi monoclonali murini NK1/C3 (Biogenex Laboratories, California), HMB45 (Lipshaw Immunon Staining Systems), Mel-1 (Signet Laboratories, Dedham, MA), Caderina-E (concessione del Prof. Peter F. Moore, Università di Davis, California) e anti-S-100 (Zymed Laboratories, Inc. San Francisco). Gli anticorpi NK1/C3, HMB45 e MEL-1 sono di tipo monoclonale ottenuti da cellule in coltura di melanoma. L'anticorpo S-100 è stato prodotto in coniglio immunizzato con cellule del cervello di bovino. ICAM-1 è stato prodotto da colture

cellulari ed è stato gentilmente fornito dal Prof. C. W Smith (Texas Children's Hospital, Clinical Care Center, Houston).

Animali

La reazione immunostochimica è stata eseguita su 21 tumori melanotici di cane, ottenuti da exeresi chirurgica, 11 dei quali scelti negli archivi del "Veterinary Medical Teaching Hospital" dell'Università della California a Davis e 10 gentilmente concessi dal Prof. S. Dow (National Jewish Medical and Research Center, Colorado).

Le neoplasie analizzate includevano 5 melanomi cutanei di cui 4 maligni amelanotici, 1 benigno e 16 melanomi maligni gengivali.

Sono stato anche analizzate biopsie prive di patologie neoplastiche ed un caso di plasmocitoma, come campioni controllo.

Trattamento dei tessuti

I 21 campioni sono stati immersi in OCT Compound Embedding Medium (Miles Diagnostic Division Elkhart, IN) e quindi congelati per immersione in metilbutano (J.T.Baker B.V. Deventer, Holland) preraffreddato in azoto liquido.

Sono state allestite sezioni criostatiche di 5 micrometri di spessore, montate su vetrini addizionati di poli-D-lisina (VWR Scientific West Chester, PA 19380). Le sezioni sono state lasciate a temperatura ambiente per 1 ora, oppure in alcuni casi sono state immediatamente poste in congelatore a -20°C. Prima di procedere all'applicazione delle metodiche di immunostochimica, le sezioni sono state fissate in acetone per 4 minuti.

Immunostochimica

Le sezioni sono state poi incubate a temperatura ambiente per 10 minuti in una soluzione allo 0.3% di perossido di idrogeno in 0.1 p/v di sodio azide. Le sezioni sono state successivamente risciacquate in PBS (Tampono fosfato) all'1% e poi sono state incubate con una soluzione al 10-20% di siero di cavallo (Gibco, BRL Canada, Ltd., Burlington, ON), coperte con 100 microlitri la sezione, per 20 minuti. Tutti i seguenti passaggi sono stati eseguiti in incubazione orizzontale.

Il siero di cavallo è stato quindi rimosso ed è stato applicato l'anticorpo primario ad una diluizione di 1:10 per la Caderina-E e l'ICAM-1, 1:50 per S-100, mentre NK1/C3 e HMB45 vengono forniti pronti all'uso. Le sezioni sono state così incubate a temperatura ambiente per 1 ora. Successivamente le sezioni sono state lavate in PBS e quindi è stato applicato l'anticorpo secondario Biotinilato "anti-mouse" (Vector Laboratories, Burlingame, CA, goat anti-rabbit for polyclonals) o "anti-rabbit" (Vector) nel caso delle sezioni trattate con S-100. L'anticorpo secondario è stato diluito in ragione di 1:400 in PBS addizionato dell'1% di siero di cavallo. Le sezioni sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente, poi risciacquate con PBS e successivamente incubate con Streptavidina-perossidasi (Zymed South San Francisco, CA) diluita 1:400, per 20 minuti.

Dopo aver risciacquato le sezioni in PBS per circa tre minuti a temperatura ambiente, è stato applicato il substrato cromogeno costituito da: 3-amino-9-etilcarbazolo (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) per 5 minuti.

Le sezioni sono state successivamente controcolorate con ematossilina di Mayer e montati in mezzo acquoso (Dako faramount).

La stessa metodica è stata utilizzata per caratterizzare gli infiltrati leucocitari all'interno delle neoplasie analizzate.

Gli anticorpi utilizzati per l'immunofenotipizzazione (CD1a, CD1c, CD18, CD44, CD45, CD45RA, CD49d, CD3, TCRalfa-beta, TCRgamma-delta) ottenuti da supernatante di colture cellulari sono stati forniti dal Prof. P.F. Moore (Università della California, Davis); il CD79a è stato acquistato dalla Dako Corporation (Carpenteria CA). Gli anticorpi sono stati diluiti tutti in rapporto 1:10.

L'intensità della colorazione immunostochimica è stata analizzata attraverso la stima della percentuale delle cellule neoplastiche che hanno reagito con gli anticorpi specifici per il melanoma. Le diverse reazioni sono state raggruppate in 5 gruppi: gruppo negativo (-), gruppo positivo (+), gruppo ad alta positività (++), gruppo ad altissima positività (+++) e gruppo a positività massima (+++ +).

La presenza delle cellule infiltranti è stata valutata attraverso l'osservazione della morfologia cellulare nella colorazione di routine con ematossilina-eosina, comparata con l'aspetto immunostochimico. Anche in questo caso le diverse reazioni sono state suddivise in 5 gruppi come sopra.

RISULTATI

Aspetti morfologici

La morfologia cellulare varia nelle diverse neoplasie ed include cellule fusiformi, dendritiche ed epitelioidi. Nella scelta di questi tumori sono stati seguiti i criteri di malignità istologici.

Le neoplasie si presentavano spesso non capsulate, composte da una popolazione altamente pleomorfica di cellule stellate, fusiformi e rotonde, arrangiate in aggregati sparsi o in aree cordoniformi che invadevano il derma sottostante o il corion. Le cellule in generale presentavano una variabile quantità di citoplasma con rara presenza di melanina. Si osservava spesso attività giunzionale nelle aree non ulcerate della membrana basale dell'epitelio.

La presenza di figure mitotiche è stata valutata sempre come consistente, ad eccezione delle forme benigne, in cui non ne sono state osservate se non in alcuni campi microscopici (1 ogni campo 10X).

La vascolarizzazione all'interno delle neoplasie analizzate era sempre piuttosto scarsa. Ai margini delle neoplasie invece si notava spesso un aumento della vascolarizzazione e anche zone emorragiche, specialmente in concomitanza delle aree ulcerate.

Una discreta quantità di cellule leucocitarie infiltranti era presente in ciascuna neoplasia analizzata. Le cellule si presentavano solitamente rotonde, di piccole dimensioni con scarso citoplasma e nucleo con cromatina stipata. In alcuni casi le cellule si presentavano allungate, più simili a plasmacellule.

Le cellule infiltranti erano arrangiate a gruppi oppure si disponevano attorno alle cellule neoplastiche formando manicotti.

La quantità di melanina nei tumori analizzati varia da scarsa ad assente ad eccezione del melanoma benigno cutaneo, in cui il tasso melanina risulta essere molto alto. In questo caso è stato quasi impossibile distinguere le cellule colorate con l'uso degli anticorpi monoclonali a causa della quantità di melanina che oscura i contorni cellulari.

L'utilizzo della tecnica di decolorazione con permanganato di potassio allo 0.25% ha dato reazioni difficilmente interpretabili per interazione con le tecniche di immunostochimica.

Immunostochimica

I risultati ottenuti mostrano che le caratteristiche fenotipiche del melanoma del cane si discostano abbastanza da quelle dell'uomo. Inoltre la mancanza o la scarsità di espressione di NK1/C3, HMB45 e S-100 dimostrano che le due specie animali (cane ed uomo) non cross-reagiscono completamente nel caso del melanoma. Tuttavia abbiamo ottenuto risultati variabili per quanto riguarda invece l'espressione dell'anticorpo MEL-1 e pensiamo che questo sia dovuto ai diversi gradi di sviluppo del tumore. L'utilizzo della caderina E in questa ricerca ha dato risultati contrastanti. Tuttavia l'espressione di questa molecola è risultata troppo poco evidente per poter essere considerata attendibile.

La molecola di adesione ICAM-1 è stata riscontrata in alcuni tumori piuttosto avanzati, mentre nei tumori a stadi primitivi si è espressa soprattutto a livello endoteliale e talvolta è stata riscontrata sulle cellule dendritiche presenti nell'epidermide.

L'ICAM-1 ha reagito fortemente, nel 44% dei casi, mentre MEL-1 nel 6%. Gli altri anticorpi anti-melanoma hanno mostrato reattività pressoché nulla.

L'ICAM-1 sembra reagire particolarmente con le neoplasie a basso grado di pigmentazione. Tuttavia non tutte le cellule all'interno della lesione vengono immunocolorate in modo uniforme da questo anticorpo. Alcune neoplasie hanno presentato positività all'ICAM-1 soltanto sulle cellule endoteliali e su poche cellule infiltranti, considerate linfociti T. Queste neoplasie sono state pertanto considerate negative all'ICAM-1.

Le cellule infiltranti le lesioni hanno invece mostrato un altissimo grado di espressione degli anticorpi CD18 (24% gruppo +++), CD45 (45% gruppo+++), CD44 (41% gruppo+++), CD49d (54% gruppo+) e CD90 (42% gruppo++), mentre sono stati poco espressi gli anticorpi che individuano i linfociti T cioè il complesso CD3-TCR (31% gruppo+).

Alcune sezioni (10%, gruppo+++) hanno reagito positivamente al CD79a. Questo dato conferma l'osservazione frequente all'ematosilina-eosina di plasmacellule nell'infiltrato linfocitario delle neoplasie analizzate.

In quasi tutte le neoplasie studiate, molte cellule infiltranti presentano forme allungate tipicamente dendritiche. In quasi tutte le sezioni testate per il CD1c, vi è stata infatti una positività relativamente alta: nel gruppo dei casi ad alta positività la reazione al CD1c si è espressa nel 67% dei casi analizzati. Questo dato viene confermato anche dalla positività abbastanza marcata del CD18. Le cellule positive a questi anticorpi si trovano spesso frammiste a cellule neoplastiche, oppure arrangiate in gruppi abbastanza compatti, intorno alla massa, e mostrano aspetto stellato, con lunghi dendriti che sembrano abbracciare le cellule tumorali, singolarmente o a gruppi.

Le cellule positive al CD3-TCR sono un numero molto esiguo, in tutte le neoplasie analizzate. La loro presenza è stata osservata maggiormente intorno ai vasi sanguigni, oppure all'interno delle reazioni infiammatorie dei tessuti ulcerati.

Il CD45 invece ha reagito positivamente in un numero cospicuo di sezioni analizzate, mentre il CD45RA, essendo diretto verso un tipo di cellula meno comune, è stato meno espresso.

L'anticorpo CD44 ha mostrato una positività molto significativa in quasi tutte le sezioni delle neoplasie analizzate. Spesso la sua espressione si è verificata sui cheratinociti, ma più frequentemente sono state marcate le cellule neoplastiche, specialmente a livello delle aree di attività giunzionale. Il CD 44 ha inoltre marcato molto intensamente anche le aree ulcerate.

Il CD90 è stato espresso da poche cellule neoplastiche. La sua espressione è stata osservata soprattutto sulle cellule endoteliali e su numerose cellule infiltranti.

DISCUSSIONE

I risultati conseguiti sembrano confermare che il melanoma maligno del cane esprime l'ICAM-1 specialmente nei suoi stadi più avanzati. Abbiamo osservato che in questi stadi, l'espressione di questa molecola di adesione non si verifica più soltanto sugli endoteli vasali e su alcune cellule dendritiche dell'epidermide, ma anche su alcune cellule neoplastiche.

Grazie a questa molecola quindi il melanoma è in grado di richiamare la risposta immunitaria dell'organismo, ma anche di aderire alla matrice extracellulare. Questo suggerisce un suggestivo meccanismo patogenetico nella progressione maligna del melanoma. In medicina umana è stato infatti ipotizzato che le cellule del melanoma si servano dell'espressione della molecola di superficie dell'ICAM-1 per aderire alla matrice extracellulare e riesca così a infiltrare i tessuti circostanti.

Non possiamo dimostrare questa ipotesi, tuttavia le osservazioni fatte durante questo studio indicano che l'espressione di ICAM-1 è presente sulle cellule del melanoma maligno del cane e quindi possiamo considerare il suo utilizzo nell'immunoistochimica un ausilio diagnostico nella individuazione di una neoplasia che è difficilmente caratterizzabile.

Per ottenere ulteriori informazioni sulla natura del tumore abbiamo voluto studiare anche il comportamento fenotipico delle cellule infiltranti richiamate dall'organismo nella sede di lesione.

Questo studio ha permesso così di apprezzare la singolare immunogenicità del tumore.

La forte positività di tutte le neoplasie analizzate con CD44 sembra confermare questo dato. Infatti sappiamo che il CD44 è coinvolto nel "rolling" e "homing" dei linfociti, perciò la sua espressione sia sulle zone ulcerate, ma anche sulle cellule neoplastiche, è sicuramente molto indicativo del fatto che il tumore è in grado di richiamare l'immunoreazione nella sede di lesione.

La positività abbastanza marcata anche del CD49d sembra confermare ulteriormente che il melanoma è dotato di immunogenicità. Anche in questo caso, l'espressione di questo anticorpo indica che è in corso una migrazione di linfociti dal letto vascolare verso i tessuti lesi. Questa espressione potrebbe inoltre indicare la capacità del melanoma di aderire alla matrice extracellulare, rendendo quindi possibile l'espansione della massa.

Nella maggior parte delle lesioni osservate, sono state inoltre ottenuti alti gradi di positività con CD1c e CD18. Questo dato ci fornisce una indicazione, anche se non definitiva perché non confermata da dati ultrastrutturali, sulle cellule infiltranti. Infatti, l'espressione di queste molecole, unitamente all'osservazione morfologica delle cellule istochimicamente reattive, fanno ritenere che si tratti di cellule di tipo dendritico, probabilmente APC.

Sembra quindi che le neoplasie osservate abbiano una spiccata tendenza a richiamare soprattutto cellule dendritiche più che linfociti T Helper e Citotossici, come è emerso anche dalla scarsa presenza di infiltrati immuno-positivi per il complesso CD3-TCR e CD45RA.

Tuttavia in alcune neoplasie è stata osservata anche la presenza di cospicui infiltrati cellulari positivi al CD79a. Questo dato sembra confermare l'osservazione morfologica della presenza di plasmacellule infiltranti in alcune delle neoplasie studiate.

Concludendo, possiamo dire che i dati ottenuti suggeriscono che l'espressione di ICAM-1 potrebbe giocare un ruolo importante nella stimolazione della risposta immunitaria dell'organismo alla presenza della neoplasia. E' stata inoltre osservata una sua "down-regulation" nella fasi più avanzate del melanoma e questo potrebbe avere un significato prognostico interessante.

Da questi dati emerge anche che la risposta immunitaria dell'organismo è mediata prevalentemente da cellule CD44+ e probabilmente da cellule dendritiche e questo ci porta alla conclusione che il melanoma è una neoplasia fortemente immunogena, in quanto l'alta espressione di CD44 ci indica che è in corso un richiamo attivo di leucociti sul luogo della lesione.

Questi aspetti del tumore sono oggi di grande interesse, al fine di impostare una terapia anti-neoplastica. Sono infatti allo studio terapie immunogeniche che sembrano essere in grado di arrestare la proliferazione del tumore e la sua evoluzione verso la formazione di metastasi, nonché di necrotizzare le cellule neoplastiche. Queste terapie, ovviamente, non possono prescindere da accurate ricerche che indichino la reale immunogenicità del melanoma.

E' pertanto necessario continuare ad investigare sull'espressione delle molecole di adesione e sull'espressione di altre molecole nel melanoma, per poter correlare questi dati con la progressione clinica della neoplasia al fine di impostare adeguate terapie immunogeniche.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N.: Pathology of domestic animals. *Academic Press* 1992; 1: 719-721.
- (2) Roitt I., Brostoff J., Male D.: Immunology. *Mosby* 1998.
- (3) Herlyn M., Menrad A., Koprowski H.: Structure, function and clinical significance of human tumor antigens. *Jo. Nat. Cancer Inst.* 1990; 82: 1883-89.
- (4) Johnson J.P.: Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer and Metast. Rev.* 1991; 10: 11-22.
- (5) Koprowski H., Rovera G.: Cancer. *Curr Opin. Cancer.* 1990; 2: 681-732.
- (6) Perussia B.: Lymphokine-activated Killer Cells, Natural Killer cells and cytokines. *Curr. Opin Immunol.* 1991; 3: 49-55.
- (7) Schneeberger A., Koszik F., Stingl G.: Immunologic host defense in melanoma: delineation of effector mechanism involved and strategies for augmentation of their efficacy. *Jo. Invest. Dermatol.* 1995; 110:116-116s.
- (8) Poppema S., Brocker E.B., De Leij L., Terback D., Visscher T., Terhaar A., Machen E., Thé T.H., Sorg C.: In situ analysis of the mononuclear cell infiltrate in primary malignant melanoma of the skin. *Clin. Exp. Immunol.* 1983; 77: 82.
- (9) Stene M.A., Babajani M., Bhuta S., Cochran A.J.: Quantitative alterations in cutaneous Langerhans cells during the evolution of malignant melanoma of the skin. *Jo of Invest. Dermatol.* 1988; 91: 125-128.
- (10) Lessard R.J., Wolff K., Winkelmann R.K.: Induced "shedding" of epidermal Langerhans cells. *Nature.* 1966; 212: 628-629.
- (11) Tang A., Eller M.S., Hara M., Yaar M., Hirohashi S.A., Gilchrist B.S.: E-cadherin is the major mediator of human melanocytic adhesion to keratinocytes in vitro. *Jo. Cell. Sci.* 1994; 107: 983-992.
- (12) Zambruno G., Marchisio P.C., Melchiori A., Bondanza S., Canceda R., De Luca M.: Expression of integrin receptor and their role in adhesion, spreading and migration of normal human melanocytes. *Jo. Cell. Sci.* 1993; 105: 179-190.
- (13) Johnson J.P., Stade B.J., Hopke U., Riethmuller G.: The antigen P 3.58 is identical to the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *Immunobiology.* 1988; 178: 275-284.
- (14) Yoneda K., Mori S., Takemura M., Noma N., Yamamoto A.: Intercellular adhesion molecule-1 on cultured human melanoma cells. Influence of cytokines. *Jo. of Dermatol.* 1993; 20: 144-150.
- (15) Nesbit M., Herlyn M.: Adhesion receptors in human melanoma progression. *Invasion Metastasis.* 1994- 95; 14: 131-146.
- (16) Berrington A.J., Jimbow K., Haines D.M.: Immunohistochemical detection of melanoma-associated antigen on formalin fixed paraffin-embedded canine tumors. *Vet. Pathol.* 1994; 31:455-461.
- (17) Muller G.H., Kirk R.W., Scott D.W.: Dermatologia veterinaria dei piccoli animali. *UTET* 1994; 6-9.
- (18) Conroy J.D.: Melanocytic tumors of domestic animals. *Arch Dermatol.* 1967; 96: 372.
- (19) Aronsohn, Carpenter: Distal extremity melanocytic nevi and malignant melanomas in the dog. *Vet. Res.*1988; 123: 517.
- (20) Goldschmidt M.H., Shofer F.S.: Skin tumors of the dog & the cat. *Pergamon Press* 1992; 131-152.
- (21) Garma-Avina A., Valli V.E., Lumsden J.H.: Cutaneous melanoma in domestic animals. *Jo. of Cut. Pathol.* 1981; 8 (1): 2-24.
- (22) Marino D.J., Matthiesen D.T., Stefanacci J.D., Moroff S.D.: Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991). *JAVMA* 1995; Vol 207, No 6, September 15: 726.
- (23) Head K.W.: Skin diseases: Neoplastic diseases. *Vet. Rec.* 1953; 65: 926-929.
- (24) Rothwell T.L.W. et al.: Skin neoplasms of dog in Sydney. *Aust. Vet. J.* 1987; 64: 161.
- (25) Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J.: Veterinary dermatology. A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease. *Mosby Year Book.* 1992; 451-465.
- (26) Bostock D.E.: Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet. Pathol.* 1979; 16: 32-40.
- (27) Kraft I, Frese D.: Lentigo-ähnliche Proliferationen des Zitzenepithels beim Hund. *Zentralblatt Vetrinarmed JA.* 1976; 23: 234-247.
- (28) Magana-Garcia M., Ackerman A.B.: What are nevus cells? *Am. Jo. Dermatopathol.* 1990; 12: 93-102.
- (29) Weiss E., Frese K.: Tumors of the skin. *BWHO.* 1974; 50: 79-100.
- (30) Richardson R.C.: Tumors of the skin and subcutis. *Proc. Ann. Kal. Kan. Symp. Treat. Small Anim. Dis.* 1986; 10: 113.
- (31) Brodey: Canine and feline neoplasms. *AVSCM.* 1970; 14: 309-354.
- (32) Hoyt, Withrow: Oral malignancy in the dog. *JAAHA.* 1984; 20: 83-92.
- (33) Withrow S.J.: Tumors of the gastrointestinal system and oral cavity. *Clinical Vet. Oncology, J.B. Lippincot Co. Ed., Philadelphia* 1989; 227-261.
- (34) Hahn, Richardson: Canine oral melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. *JSAP.* 1994; 35: 251-256.
- (35) Gorlin R.J., Barron C.N., Chaudry A.P., Clark J.J.: The oral and pharyngeal pathology of domestic animals: a study of 487 cases. *Amer. J. Vet. Res.* 1959; 20: 1032-1061.
- (36) Ritt M.G., Wojcieszyn J., Modiano J.F.: Functional loss of p21/Waf-1 in a case of benign canine multicentric melanoma. *Vet. Pathol.* 1998; 35: 94-101.
- (37) Dow S.W., Elmslie R.B., Willson A.P., Roche L., Gorman C., Potter T.A.: In vivo tumor transfection with cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *J. Clin. Invest.* 1998; Vol 101, 11, June: 2406-2414.
- (38) Lehman J.M., Riethmuller G., Johnson J.P.: Muc 18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 9891-9895.
- (39) Shih I.M., Elder D.E., Speicher D., Johnson J.P., Herlyn M.: isolation and functional characterization of the A32 melanoma associated antigen. *Cancer Res.* 1994; 54: 2514-2520.
- (40) Strohal R., Marberger K., Pehamberger H., Stingl G.: Immunohistological analysis of anti-melanoma host responses. *Arch. Dermatol. Res.* 1994; 287: 28-35.

RINGRAZIAMENTI. Si ringrazia il Prof. P.F. Moore dell'Università della California Davis, per aver fornito gli anticorpi necessari alla realizzazione di questo lavoro. Si ringrazia il Dott. S.W. Dow e l'Università delle California Davis per aver fornito i campioni biotipici su cui è stato eseguito il lavoro. Ringrazio la Dott.ssa Kramer per avermi dato validi consigli nella realizzazione di questo progetto.

A CASE OF DIAPHRAGMATIC PERITONEAL PERICARDIAL HERNIA IN A DOG

Cecilia Quintavalla, Giuseppe Zannetti

Istituto di Clinica Medica Veterinaria - Università degli Studi di Parma

INTRODUCTION

Congenital pericardial diseases are rare in dogs and cats. Most of them, such as complete or incomplete (commonly on the left side) absence of the pericardial sac, have been reported as incidental findings on post-mortem examinations. Ultrasonographic investigations have significantly improved the "in vivo" diagnosis of pericardial defects such as diaphragmatic peritoneo-pericardial hernia and pericardial cysts.

Diaphragmatic peritoneo-pericardial hernia is the most common congenital pericardial defect in pets.

The development abnormality results in a persistent communication between the pericardial and peritoneal cavities on the ventral sagittal line. Several theories have been proposed on the embryonic development of this congenital defect. Baker and Williams (1966) imputed the defect to the failure of the lateral pleuroperitoneal folds and the ventromedial pars sternalis to unite during the division of coelum into abdominal and thoracic cavities. Bolton et al. (1969) and Finn and Martin (1969) suggested a faulty development of the dorsolateral septum transversum or rupture of a thin tissue membrane in this area permitting peritoneal and pericardial communication. Clinton (1967), otherwise, proposed a prenatal injury to the septum transversum or to the fusion site of the septum transversum and pleuroperitoneal folds.

Whichever the mechanism causing peritoneo-pericardial hernia, cranial displacement of abdominal viscera into the pericardial sac may occur, while the pleural space remains intact. The degree of herniation is variable and the clinical signs will vary consequently. Peritoneo-pericardial hernia may be associated with other congenital abnormalities, umbilical hernias being the most frequent finding. Other accompanying anomalies include pectus excavatum, sternbral abnormalities (Evans and Biery, 1980) and cardiac malformations (Eyster et al., 1977).

This paper reports and discusses a case of peritoneo-pericardial diaphragmatic hernia found out as incidental finding in a aged, asymptomatic dog.

CASE REPORT

A 10-year-old female German Shepard dog was presented at the Institute of Veterinary Internal Medicine of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Parma, with a history of seropositivity to *Dirofilaria immitis*. The dog was submitted to a complete cardiovascular examination in order to classify the severity of heartworm disease and to define the more appropriate therapeutic approach.

At the time of presentation the dog was asymptomatic.

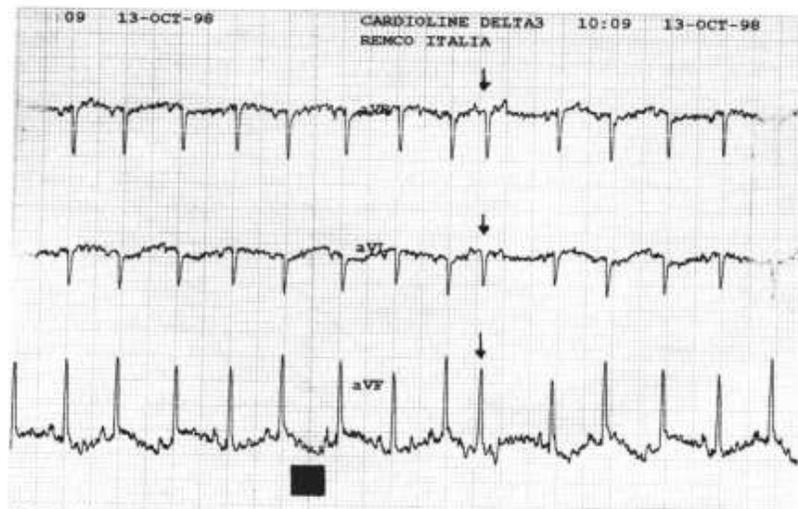
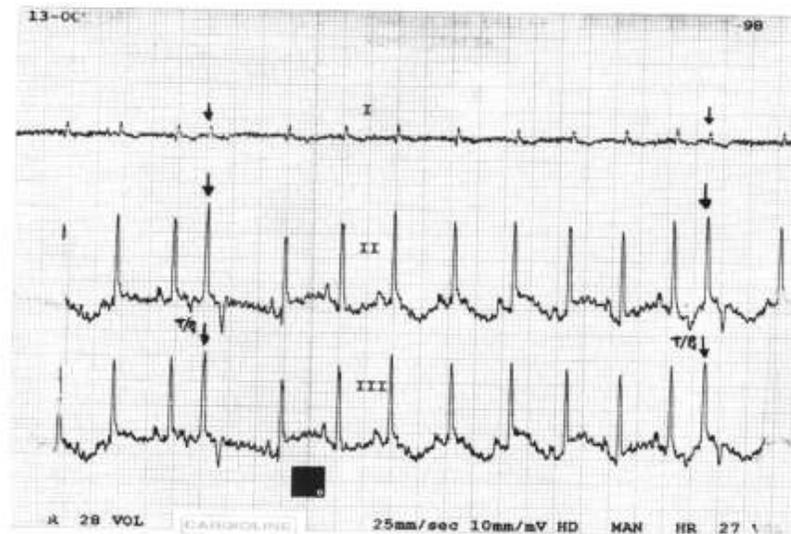
Physical examination

No alterations were found during the examination of mucous membranes. No signs of venous distension or pulsation were registered and the arterial pulse was normal. The evaluation of abdomen was negative for fluid accumulation or palpable mass. Cardiac auscultation on both emithoraces revealed muffled heart sounds and a diminished palpable precordial cardiac impulse was evident.

To find out the cause of muffled heart sounds the dog has been submitted to electrocardiographic, radiographic and echocardiographic examinations.

Electrocardiography

The electrocardiogram (Fig.1) registered waves of normal configuration and episodic disruption of normal sinus rhythm by atrial premature complexes.



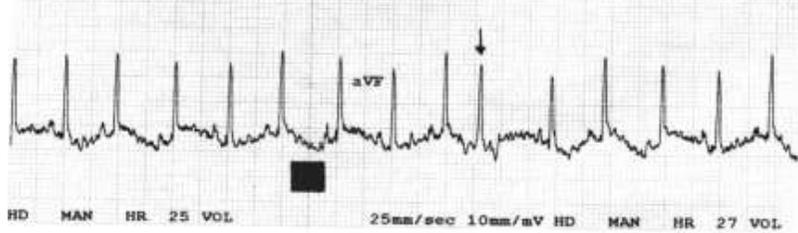


Fig.1: Rare supraventricular premature complexes (see arrows) disrupt the normal P wave rhythm. The premature P waves (called P1) are superimposed on the T wave of the preceding complexes. The pause following each premature complex is non-compensatory. The heart rate is normal (150 bpm) and sinus complexes are of normal configuration, as well as premature QRS complexes. Artifacts are present due to muscle tremor.

Radiography

Plain radiographs of the thorax (Figg.2,3) displayed a generalized cardiomegaly, with dorsal displacement of the trachea on the right lateral view. The caudal cardiac border was not distinct and it consistently overlapped with the ventral diaphragmatic border. Abnormal overlying radiographic gas and density are evident on the cardiac silhouette.

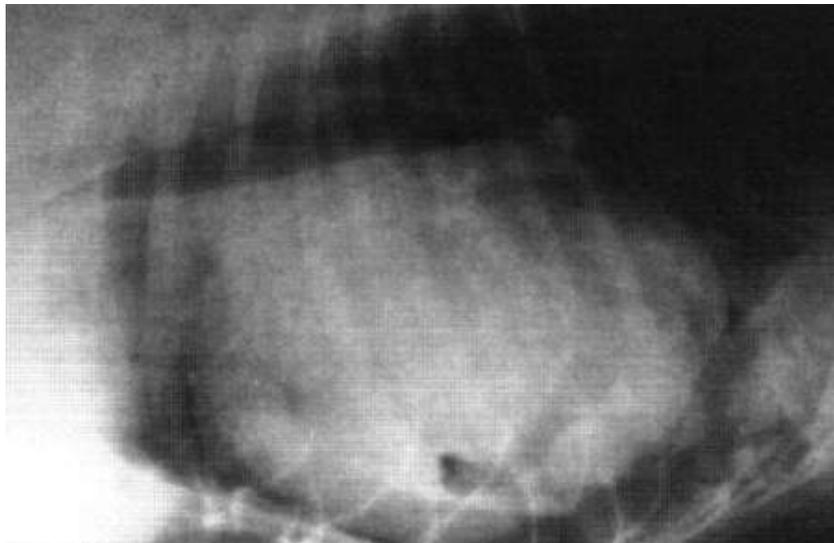


Fig.2: Right lateral thoracic radiograph shows a markedly enlarged cardiac silhouette. Gas-filled bowel loops can be seen overlying the cardiac shadow. The caudal cardiac border is not distinct and there is silhouetting between the cardiac shadow and the diaphragm.

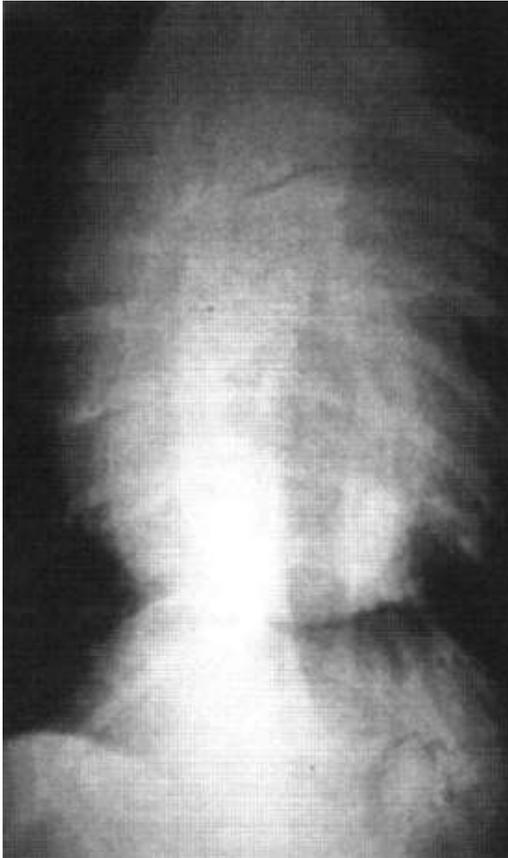


Fig.3: Sagittal radiograph demonstrates the enlarged, globular cardiac silhouette with abnormal overlying radiographic gas and density. No signs of pleural effusion, pulmonary venous congestion or interstitial/alveolar patterns are present.

Plain radiographs of the abdomen (Fig.4) showed a cranial and ventral displacement of the stomach and of the small and large intestines. The spleen was not evident.

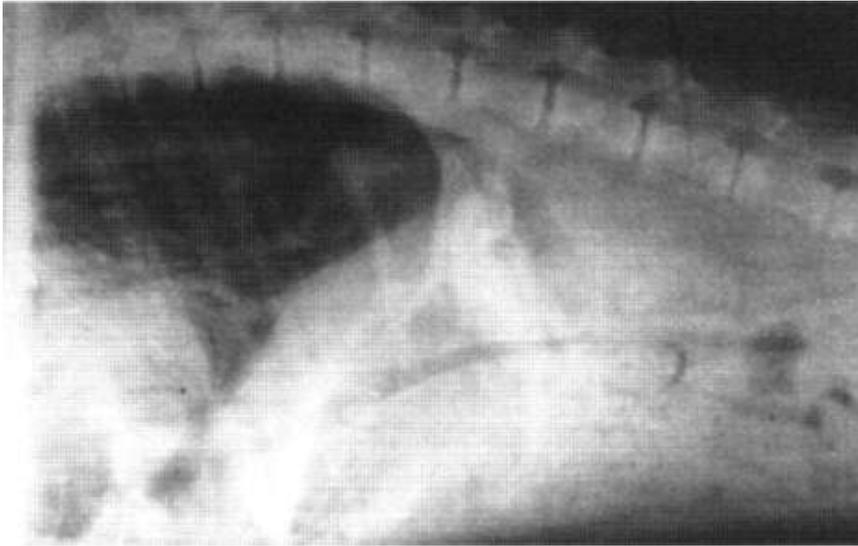


Fig.4: Lateral abdominal radiograph reveals a cranio-ventral displacement of the stomach and the colon appears extending forward to the heart. The spleen is not appreciable.

Radiographic signs were consistent with a diaphragmatic peritoneal pericardial hernia with possible herniation of the spleen, the stomach and part of the small intestine.

Ultrasonography

Ultrasonographic examination allowed direct visualization of the spleen, of the stomach and of bowels of the small intestine within the pericardial sac (Fig.5). A small amount of pericardial effusion was present, while no signs of cardiac tamponade or direct and indirect signs of heartworm disease were imaged. The diagnosis of diaphragmatic peritoneo-pericardial hernia was confirmed.



Fig.5: Right parasternal short-axis view. Echocardiographic 2D-mode examination allows direct visualization of herniated viscera surrounding the cardiac chambers within the pericardial sac. M=spleen; S=stomach; VD=right ventricle

The dog was surgically treated by replacement of herniated viscera in the abdomen and closure of the peritoneo-pericardial communication. Surgery findings confirmed the echocardiographic diagnosis and supported a long-standing condition as revealed by the presence of adhesive processes. No signs of hernia complications were present. No complications occurred during and after the surgical correction of the defect.

At the time of writing the dog has been lost to follow-up.

DISCUSSION

The diagnosis of diaphragmatic peritoneo-pericardial hernia in a aged asymptomatic dog supports reference data suggesting that the disease, even if congenital in origin, may remain undiagnosed and clinically silent for many years (Atkins, 1974; Baker and Williams, 1966; Finn and Martin, 1969; Weitz et al., 1978). It may be diagnosed as an incidental finding during a medical examination because of other cardiac or extracardiac diseases, or be discovered on post-mortem examination. The most part of patients suffering from diaphragmatic peritoneo-pericardial hernia are identified within the first years of life (48%), but a relatively high percentage is identified later, after 8 years of age (6%) (Evans and Biery, 1980; Reed, 1988). This is partly due to the fact that traumatic events, even late in patient's life, may cause abdominal contents to move into pericardial cavity giving rise to acute clinical signs. However, it should be stressed that the abnormality is never acquired because there is no natural direct communication between the pericardial and peritoneal cavities after birth.

Clinical signs of the disease are not specific and depend on the degree and nature of herniation. The most frequent clinical signs involve the

digestive tract (vomiting, diarrhea, anorexia, weight loss) and the respiratory system (dyspnea, cough, wheeze). Abdominal discomfort or swelling, shock and collapse occur less frequently (Reed, 1988).

The case reported was strangely asymptomatic in face of the herniation of major organs such as the stomach and the spleen. In asymptomatic dogs with major herniation important findings on physical examination may be the auscultation of muffled heart sounds and an abnormally thin abdomen on palpation.

Causes of muffled heart sounds include pericardial effusion, pleural effusion, thoracic masses, myocardial failure, diaphragmatic hernia.

The age of the dog and the seropositivity to heartworm test oriented the diagnosis to pericardial or pleural effusion even if the absence of signs of cardiac tamponade (jugular venous distention or pulsation, paradoxical pulse, ascites) or dyspnea was not consistent with these diseases. The presence of a thoracic mass was also unlikely because the muffled heart sounds were audible on both emithoraces.

Electrocardiography may show decreased QRS voltages due to dampening effect of herniated abdominal contents or axis deviation in case of cardiac displacement. These signs are incostant and above all not specific and consistent with all the diseases considered in the differential diagnosis. In the reported case none of the overmentioned ECG abnormalities were detectable, even if rare premature atrial contractions were present.

Thoracic radiographs usually allow suspicion of peritoneo-pericardial diaphragmatic hernia. Prior to the development of ultrasound imaging, confirmation of this defect often required contrast radiographic studies (angiography, pericardiography, peritoneography, gastrointestinal studies) or exploratory thoracotomy.

Nowadays, the "gold standard" technique for the confirmation of the diagnosis of peritoneo-pericardial diaphragmatic hernia is ultrasonography because of its noninvasiveness, safety and accuracy. 2-D echo imaging allows direct visualization of an extracardiac, intrapericardial mass that displaces the heart. Occasionally, the discontinuity of the diaphragm can be seen and the herniated tissue appears to be continous with structures on the abdominal side of the diaphragm, such as liver, spleen or falciform fat. Small hernias consisting of only fat or omentum may be very difficult to identify by any technique, including echocardiography (Kienle and Thomas, 1995).

In the reported case, echocardiography allowed correct visualization and identification of herniated organs without recurring at more invasive or indaginous techniques, as confirmed by surgery findings.

The surgical correction of the defect is the reccomended treatment even if careful consideration should be given to the surgical risks compared with perceived benefits (Teague et al., 1978; Reed, 1988; Wallace, 1992). The surgical treatment in an aged and asymptomatic dog may be a questionable choice. In the case reported the decision has been complicated by the lack of traumatic events during the dog's life which could have been responsible of the herniation. It was impossible to know with certainty if the herniation was long-standing or recent. Recent herniations have generally a better prognosis. However, because of the imaging of the stomach and small intestine in the pericardial sac the dog has been considered at high risk for developing gastrointestinal complications if untreated.

CONCLUSION

The low incidence of peritoneo-pericardial hernia and the old age of examined dogs should not be causes of omission of the disease in the differential diagnosis when consistent clinical signs are present.

Thoracic radiography is a useful diagnostic tool, but ultrasonography is the preferable diagnostic technique allowing confirmation of the diagnosis and accurate identification of herniated viscera in a rapid, safe and non invasive way.

Correct visualization and identification of herniated organs allows to define a more accurate prognosis and may guide the choice of therapeutic approach.

Surgical correction is the recommended treatment if other congenital defects do not coexist.

Prognosis following successful surgery is excellent.

Parole chiave: cane, malattie del pericardio, ernia diaframmatica peritoneo-pericardica

Key words: dog, pericardial disease, diaphragmatic peritoneo-pericardial hernia

RIASSUNTO. Gli Autori riportano un caso documentato di ernia diaframmatica peritoneo-pericardica in un cane asintomatico di 10 anni. Vengono discussi gli aspetti eziologici e clinico-diagnostici della malattia alla luce delle attuali conoscenze sull'argomento.

SUMMARY. Authors report a documented clinical case of diaphragmatic peritoneal pericardial hernia in a 10-year old, asymptomatic dog. Etiology, clinical signs and diagnosis of the disease are reviewed and discussed.

REFERENCES

- Atkins C.E.: Suspect congenital peritoneopericardial diaphragmatic hernia in an adult cat. J.A.V.M.A., 165, 175, 1974
- Baker G.J., Williams C.S.: Diaphragmatic pericardial hernia in the dog. Vet. Rec., 78, 578, 1966
- Bolton G.R., Ettinger S., Rousch J.C.: Congenital peritoneopericardial diaphragmatic hernia in a dog. J. Am. Vet. Med. Ass., 155, 723, 1969
- Clinton J.M.: A case of congenital pericardio-peritoneal communication in a dog. J. Am. Vet. Rad. Soc., 8, 57, 1967
- Evans S.R., Biery D.N.: Congenital peritoneopericardial diaphragmatic hernia in the dog and cat: a literature review and 17 additional case histories. Vet. Radiol., 21, 108, 1980
- Eyster G.E., Evans A.T., Blanchard G.L., Krahwinkel D.J., Chaffee A., DeYoung D., Karr D.R., O'Handley P.: Congenital pericardial diaphragmatic hernia and multiple cardiac defects in a litter of Collies. J.A.V.M.A., 170 (5), 516, 1977
- Finn J.P., Martin C.L.: Diaphragmatic pericardial hernia. J. Small Animal Pract., 10, 295, 1969
- Kienle R.D., Thomas W.P.: Echocardiography. In Nyland T.G., Mattoon J.S. (Ed.): Veterinary Diagnostic Ultrasound, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 198, 1995
- Reed J.R.: Pericardial diseases. In Fox P.R. (Ed.): Canine and feline cardiology, Churchill Livingstone, New York, 495, 1988
- Teague H.D., Cook m., Brunell W.K., Erickson J.: Surgical repair of a diaphragmatic hernia in a dog. Canine Practice, 5 (5), 63, 1978
- Wallace J., Mullen H.S., Lesser M.B.: A technique for surgical correction of peritoneal pericardial diaphragmatic hernia in dogs and cats. Journal of the American Animal Hospital Association, 28 (2), 503, 1992
- Weitz J., Tilley L.P., Moldoff D.: Pericardiopericardial diaphragmatic hernia in a dog. J.A.V.M.A., 173, 1336, 1978

IL DECRETO LEGISLATIVO N. 388/98
NUOVE DISPOSIZIONI SULLA PROTEZIONE DEGLI ANIMALI NEI TRASPORTI

Signorini G.¹, Biagi G.², Nannipieri S.²

1 Istituto di Ispezione Alimenti O.A., Università di Parma

2 Dipartimento di Clinica Veterinaria - Università di Pisa

Premessa

Il trasporto rappresenta sempre per gli animali una fonte di stress, più o meno intensa. È spesso causa di notevoli problemi, soprattutto per quanto riguarda gli animali da allevamento, per i quali gli eventuali danni, oltre ad interessare l'animale vivo, ed essere quindi in contrasto con le vigenti normative sul benessere nonché con l'attuale sensibilità dell'opinione pubblica, possono andare ad interferire con la qualità dei prodotti destinati all'alimentazione umana, con danni economici ed pericoli sanitari facilmente intuibili.

La legislazione pregressa

Talune indicazioni relative alla protezione degli animali nei trasporti erano già presenti nel Regolamento di Polizia Veterinaria: gli articoli n. 35 e n. 37 specificano, infatti, che la capienza del veicolo e la ventilazione dovevano essere adeguate alle necessità degli animali trasportati.

La legge (L.) n. 222/73, ed il Decreto Presidente della Repubblica (DPR) n. 624/82 recepivano nella legislazione nazionale i concetti espressi nella Convenzione Europea sulla protezione degli animali nei trasporti internazionali, adottata a Parigi il 13 dicembre 1968, concetti confermati e ripresi anche da successivi provvedimenti. In particolare, il Capitolo II della Convenzione riguarda i trasporti internazionali degli animali domestici della specie bovina, ovina, caprina e porcina, nonché gli ungulati domestici. Nella parte concernente le "Disposizioni generali", l'art. 3 prevede che gli animali, prima di venir caricati per un trasporto internazionale vengano *"ispezionati da un veterinario autorizzato del Paese esportatore che si accerterà della loro idoneità al viaggio"*. Si intendono idonei al trasporto, ai sensi dell'art. 4 *"gli animali che si presume debbano figliare durante il trasporto o che abbiano figliato da meno di 48 ore"*. L'art. 6 riguarda le condizioni di trasporto: al punto 1 stabilisce che *"gli animali devono disporre di spazio sufficiente, e devono, salvo speciali controindicazioni, potersi coricare"*; al punto 2 precisa invece che i mezzi di trasporto o gli imballaggi *"devono essere concepiti allo scopo di proteggere gli animali dalle intemperie e dai grandi sbalzi di temperatura. La ventilazione e la cubatura d'aria devono essere adatte alle condizioni di trasporto ed adeguate al tipo di animale trasportato"*. Inoltre, gli imballaggi devono essere tali da consentire l'agevole ispezione e la cura degli animali, essere disposti in modo da non ostacolare la libera circolazione dell'aria e, durante il trasporto, devono essere mantenuti in posizione verticale e non devono essere esposti ad urti o scosse troppo violente. Al punto 4, prevede che *"gli animali devono essere abbeverati e ricevere un'alimentazione appropriata ad intervalli convenienti. Tali intervalli non devono oltrepassare le 24 ore; il periodo di 24 ore può tuttavia essere prolungato se il mezzo di trasporto può raggiungere il luogo di sbarco degli animali in un tempo ragionevole"*.

La proposta di Direttiva del Consiglio n. 93/C 250/07, volta a modificare la Direttiva n. 91/628/CEE, introduceva alcune interessanti novità, quali l'obbligo di garantire periodi di riposo, abbeverata e alimentazione delle diverse specie a seconda della durata del viaggio, nonché di limitare il numero di capi trasportabili sulla base del rapporto peso/superficie.

Il DPR n. 624/82 regolamentava il trasporto per via stradale, aerea, ferroviaria e navigabile degli animali fra l'Italia e Paesi Terzi.

Nel Decreto ministeriale (DM) del 20 luglio 83 si stabiliva che il veterinario ufficiale accertasse lo stato di idoneità al viaggio degli animali e la rispondenza dei mezzi di trasporto e che riportasse tutto ciò in un certificato, scritto in sette lingue, che doveva scortare il mezzo di trasporto.

Il Decreto legislativo (D. Lgs) n. 532/92 riguardava sia gli animali da allevamento che gli animali esotici e da affezione. Il provvedimento poneva particolarmente l'accento sulla protezione: all'animale trasportato doveva essere garantito il soddisfacimento dei bisogni primari (fame e sete) ed assicurata un'adeguata protezione da situazioni climatiche estreme. Un'altra innovazione di questa norma era rappresentata dalla attribuzione della responsabilità giuridica alla figura del trasportatore o del responsabile dell'impresa del trasporto: i trasportatori erano comunque tenuti ad accudire gli animali, ad abbeverarli e a nutrirli fino alla consegna al destinatario. Nel decreto venivano specificate in dettaglio anche tutte le caratteristiche tecniche dei mezzi di trasporto che dovevano naturalmente garantire a ciascun animale la cubatura e la superficie necessarie alle funzioni essenziali ed avere sistemi di areazione o aperture adeguati.

Il Decreto Legislativo n. 388/98

Il D. Lgs n. 388, attuazione della Direttiva n. 95/29/CE in materia di protezione degli animali durante il trasporto, promulgato il 20 ottobre 1998 e pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 262 del 9 novembre 1998, apporta modifiche, anche sostanziali, al testo del D. Lgs n. 532/92.

Il D. Lgs n. 388/98 ribadisce nelle "Disposizioni generali" che questo provvedimento si applica al trasporto di solipedi domestici e di animali domestici della specie bovina, ovina, caprina e suina; di pollame, volatili e conigli domestici; di cani e gatti domestici; di altri mammiferi e volatili; di altri animali vertebrati ed animali a sangue freddo. Sostituisce invece l'art. 1, comma 2, del D. Lgs n. 532/92 disponendo che *"non si applica ai trasporti privi di qualsiasi carattere commerciale e ad ogni singolo animale accompagnato da una persona fisica che ne ha la responsabilità durante il trasporto"* e *"ai trasporti di animali domestici da compagnia che accompagnano il loro padrone nel corso di un viaggio privato"* così come *"ai trasporti di animali effettuati su una distanza massima di 50 Km"* (per i quali tuttavia viene ritenuto responsabile della protezione degli animali il Comune) o *"effettuati dagli allevatori con veicoli agricoli o mezzi di trasporto di loro proprietà nel caso in cui le circostanze geografiche impongano una transumanza stagionale senza scopo lucrativo per alcuni tipi di animali"*.

Le modifiche che vengono apportate all'art. 2, comma 2, lettera e) riguardano la durata della stabulazione nel luogo di partenza e nelle soste durante il viaggio, stabulazione che viene portata da dieci a ventiquattro ore per poter definire *"Luogo di partenza"* il punto di sosta.

L'art. 5 è interamente sostituito ed è integralmente dedicato alla figura, alle caratteristiche ed alle responsabilità del trasportatore, definito come *"qualsiasi persona fisica o giuridica che, per fini commerciali ea scopo di lucro trasporta animali per conto proprio o per conto terzi nonché chi mette a disposizione a tal fine un mezzo di trasporto a disposizione di terzi"*. Viene stabilito che ogni trasportatore deve essere iscritto *"in apposito registro presso l'azienda sanitaria locale"*; deve essere in possesso di un'autorizzazione al trasporto valida su tutto il territorio comunitario; non deve trasportare *"animali in condizioni tali da poterli esporre a lesioni o sofferenze inutili"*; deve utilizzare *"mezzi di trasporto tali da garantire il rispetto delle prescrizioni comunitarie"*. Deve inoltre *"possedere una formazione specifica"* od avere *"un'esperienza pratica equivalente"*, attestata dall'azienda sanitaria locale, che gli consenta di occuparsi della manipolazione e del trasporto nonché, qualora necessario, di prestare *"l'assistenza appropriata agli animali trasportati"*. Sempre in base all'art. 5, il trasportatore deve stabilire un ruolino di marcia, qualora il viaggio sia di durata superiore alle otto ore, nel quale siano precisati i punti di sosta e di eventuale trasferimento. Questo ruolino di marcia, unico per tutta la durata del viaggio, deve essere presentato al veterinario ufficiale competente per la redazione del certificato sanitario; il numero o i numeri dei certificati devono essere indicati nel ruolino, che deve essere timbrato e firmato dal veterinario ufficiale del luogo di partenza, che ha la responsabilità di notificare l'esistenza del ruolino mediante il sistema ANIMO. Il ruolino di marcia, in originale, deve essere unito al certificato sanitario per tutta la durata del viaggio.

Nella Figura n. 1 viene riportato un facsimile del ruolino di marcia.

<u>TRASPORTATORE</u> (Nome, indirizzo, ragione sociale)		<u>TIPO DI MEZZO DI TRASPORTO</u>	
<u>FIRMA DEL TRASPORTATORE</u> ()		<u>N. DI TARGA DI IMMATRICOLAZIONE O DI IDENTIFICAZIONE</u> ()	
<u>SPECIE ANIMALE:</u>		<u>ITINERARIO</u>	
<u>QUANTITA':</u>		<u>STIMA DELLA DURATA DEL PERCORSO</u>	
<u>LUOGO DI PARTENZA</u>			
<u>LUOGO DI ARRIVO</u> ()			
<u>N. CERTIFICATO/SANITARIO O DOCUMENTO DI ACCOMPAGNAMENTO</u> ()		<u>STAMPIGLIATURA</u>	
		<u>DEL VETERINARIO DEL LUOGO DI PARTENZA</u> ()	<u>DELL'AUTORITA' COMPETENTE DEL POSTO D'USCITA O DEL POSTO DI FRONTIERA AUTORIZZATO</u> ()
<u>DATA E ORA DI PARTENZA:</u>		<u>NOME DEL RESPONSABILE DEL TRASFERIMENTO DURANTE IL VIAGGIO</u>	
<u>PUNTI DI SOSTA O DI TRASFERIMENTO</u>		()	
<u>LUOGO E INDIRIZZO</u>	<u>DATA E ORA</u>	<u>DURATA DELLA SOSTA</u>	<u>MOTIVO</u>
a)			
b)			
c)			
d)			
e)			
f)			
(1) Deve essere compilato dal trasportatore prima del viaggio		Data e ora di arrivo	
(2) Deve essere compilato dal veterinario competente			
(3) Deve essere compilato dal trasportatore durante il viaggio			
(4) Deve essere compilato dall'autorità competente del posto di uscita			
		Firma del responsabile del trasporto durante il viaggio	

Il ruolino deve riportare l'ora e il luogo in cui gli animali sono stati alimentati ed abbeverati durante il trasporto e, nel caso di esportazione dal territorio comunitario o di durata del viaggio superiore alle otto ore, deve essere vistato "dal veterinario del posto di ispezione frontiera o del punto di uscita designato". L'art. 5 conferisce inoltre al trasportatore la responsabilità di fornire le "misure necessarie per soddisfare le necessità di abbeverare e di alimentare gli animali" anche nel caso di forzate modifiche del ruolino di marcia, dovute a cause indipendenti dalla sua volontà, e di "accertarsi che gli animali siano avviati senza indugio al loro luogo di destinazione". Al rientro, il ruolino deve essere inviato all'autorità competente del luogo di origine del trasporto; il trasportatore deve conservarne una copia per almeno due anni.

Gli articoli 6 e 7 rimangono inalterati, mentre l'art. 8, riguardante i controlli operati dalle autorità competenti, viene totalmente sostituito, specificando che le autorità hanno l'obbligo di controllare i mezzi di trasporto e gli animali durante il trasporto stradale; i mezzi di trasporto e gli animali al momento di arrivo ai luoghi di destinazione; i mezzi di trasporto e gli animali nei mercati, nei luoghi di partenza, nei punti di sosta e di trasferimento; le indicazioni riportate nei documenti di accompagnamento. Le autorità devono effettuare tali controlli *"su un campione rappresentativo di animali trasportati sul territorio nazionale nel corso di ciascun anno"*.

L'art. 9 viene integrato da un riferimento al sistema ANIMO.

L'art. 10 viene completamente sostituito, e dove il D. Lgs n. 532/92 conferiva al Ministero della sanità l'obbligo di fornire assistenza *"agli esperti della Comunità incaricati di accertare la conformità dell'applicazione"* delle norme nazionali a quelle comunitarie, il presente decreto stabilisce che *"le autorità competenti assicurano l'assistenza necessaria ed ogni collaborazione agli esperti veterinari incaricati dalla Commissione europea di effettuare controlli sul posto al fine di verificare l'osservanza delle disposizioni previste"*.

L'art. 11, che riguarda le importazioni da paesi terzi, viene modificato specificando gli obblighi del trasportatore che è tenuto ad impegnarsi per iscritto a rispettare le disposizioni della normativa ed a presentare il ruolino di marcia.

All'art. 14 le parole *"chi viola"* sono sostituite da *"il trasportatore che viola"* e viene aggiunto ex novo l'art. 14 -bis, che riguarda le possibilità di sospensione o ritiro dell'autorizzazione al trasporto in caso di infrazioni alle disposizioni della normativa.

Il D. Lgs n. 388/98 ribadisce e conferma il testo degli Allegati del D. Lgs n. 532/92, pur con alcune modifiche ed integrazioni, che riguardano soprattutto le densità di carico per le diverse specie nei diversi tipi di trasporto (Tabelle n. 1-5) e gli intervalli per l'abbeveraggio e l'alimentazione, nonché i periodi di viaggio e di riposo per le diverse specie.

Ai fini dell'interpretazione della Tabella n. 1, si tenga presente che la lunghezza standard utile dei vagoni è di 2,6-2,7 m, e che durante i lunghi viaggi i puledri e i cavalli giovani devono potersi coricare. Le cifre indicate, inoltre, possono variare del 10% al massimo per i cavalli adulti ed i pony, e del 20% al massimo per i cavalli giovani ed i puledri, in base non solo al peso ed alle dimensioni, ma anche allo stato fisico dei soggetti, alle condizioni metereologiche ed alla durata prevista del viaggio. Le disposizioni riguardo al trasporto dei solipedi (ferratura, presenza o meno di cavezza, ecc.) stabilite nel D. Lgs n. 532/92 restano inalterate.

Tabella n. 1 - Densità di carico per i solipedi domestici

TRASPORTO FERROVIARIO	
<i>CAVALLI ADULTI</i>	1,75 mq (0,7 x 2,5 m)
<i>CAVALLI GIOVANI (6-24 mesi)</i>	
Per viaggi di durata massima di 48 h.	1,2 mq (0,6 x 2 m)
Per viaggi di durata superiore a 48 h.	2,4 mq (1,2 x 2 m)
<i>PONY (altezza inferiore a 144 cm)</i>	1 mq (0,6 x 1,8 m)
<i>PULDRI (0-6 mesi)</i>	1,4 mq (1 x 1,4 m)
TRASPORTO STRADALE	
<i>CAVALLI ADULTI</i>	1,75 mq (0,7 x 2,5 m)
<i>CAVALLI GIOVANI (6-24 mesi)</i>	
Per viaggi di durata massima di 48 h.	1,2 mq (0,6 x 2 m)
Per viaggi di durata superiore a 48 h.	2,4 mq (1,2 x 2 m)
<i>PONY (altezza inferiore a 144 cm)</i>	1 mq (0,6 x 1,8 m)
<i>PULDRI (0-6 mesi)</i>	1,4 mq (1 x 1,4 m)
TRASPORTO AEREO	
0-100 kg	0,42 mq
100-200 kg	0,66 mq
200-300 kg	0,87 mq
300-400 kg	1,04 mq
400-500 kg	1,19 mq
500-600 kg	1,34 mq
600-700 kg	1,51 mq
700-800 kg	1,73 mq
TRASPORTO MARITTIMO	
200-300 kg	0,90-1,175 mq/animale
300-400 kg	1,175-1,45 mq/animale
400-500 kg	1,45-1,725 mq/animale
500-600 kg	1,725-2 mq/animale
600-700 kg	2-2,25 mq/animale

Per quanto riguarda i bovini, i valori riportati nella Tabella n. 2, possono variare non solo in base al peso ed alle dimensioni, ma anche allo stato fisico degli animali, alle condizioni meteorologiche ed alla durata probabile del tragitto; occorre inoltre prevedere un 10% in più di spazio per le femmine in gestazione.

Tabella n. 2 - Densità di carico per i bovini

TRASPORTO FERROVIARIO		
<i>VITELLI D'ALLEVAMENTO</i>	55 kg	0,30-0,40 mq/animale
<i>VITELLI MEDI</i>	110 kg	0,40-0,70 mq/animale
<i>VITELLI PESANTI</i>	200 kg	0,70-0,95 mq/animale
<i>BOVINI MEDI</i>	325 kg	0,95-1,30 mq/animale
<i>BOVINI DI GRANDI DIMENSIONI</i>	550 kg	1,30-1,60 mq/animale
<i>BOVINI DI GRANDESSIME DIMENSIONI</i>	> 700 kg	> 1,60 mq/animale
TRASPORTO STRADALE		
<i>VITELLI D'ALLEVAMENTO</i>	50 kg	0,30-0,40 mq/animale
<i>VITELLI MEDI</i>	110 kg	0,40-0,70 mq/animale
<i>VITELLI PESANTI</i>	200 kg	0,70-0,95 mq/animale
<i>BOVINI MEDI</i>	325 kg	0,95-1,30 mq/animale
<i>BOVINI DI GRANDI DIMENSIONI</i>	550 kg	1,30-1,60 mq/animale
<i>BOVINI DI GRANDESSIME DIMENSIONI</i>	> 700 kg	> 1,60 mq/animale
TRASPORTO AEREO		
<i>VITELLI</i>	50 kg	0,23 mq/animale
	70 kg	0,28 mq/animale
<i>BOVINI</i>	300 kg	0,84 mq/animale
	500 kg	1,27 mq/animale
TRASPORTO MARITTIMO		
200-300 kg	0,81-1,0575 mq/animale	
300-400 kg	1,0575-1,305 mq/animale	
400-500 kg	1,305-1,5525 mq/animale	
500-600 kg	1,5525-1,8 mq/animale	
600-700 kg	1,8-2,025 mq/animale	

Le disposizioni che riguardano gli ovini ed i caprini sono riportate nella Tabella n. 3. La superficie al suolo può variare in base alla razza, alle dimensioni, allo stato fisico ed alla lunghezza del vello degli animali, nonché in base alle condizioni metereologiche ed alla durata del viaggio. Negli agnelli di piccole dimensioni si può stabilire una superficie inferiore agli 0,2 mq previsti.

Tabella n. 3 - Densità di carico per gli ovicaprini

TRASPORTO FERROVIARIO		
<i>MONTONI TOSATI</i>	< 55 kg > 55 kg	0,20-0,30 mq/animale > 30 mq/animale
<i>MONTONINON TOSATI</i>	< 55 kg > 55 kg	0,30-0,40 mq/animale > 0,40 mq/animale
<i>PECORE IN GESTAZIONE AVANZATA</i>	< 55 kg > 55 kg	0,40-0,50 mq/animale > 0,50 mq/animale
<i>CAPRE</i>	< 35 kg 35-55 kg > 55 kg	0,20-0,30 mq/animale 0,30-0,40 mq/animale 0,40-0,75 mq/animale
<i>CAPRE IN GESTAZIONE AVANZATA</i>	< 55 kg > 55 kg	0,40-0,50 mq/animale > 0,50 mq/animale
TRASPORTO STRADALE		
<i>MONTONI TOSATI E AGNELLI</i> di peso superiore a 26 kg	< 55 kg > 55 kg	0,20-0,30 mq/animale > 30 mq/animale
<i>MONTONINON TOSATI</i>	< 55 kg > 55 kg	0,30-0,40 mq/animale > 0,40 mq/animale
<i>PECORE IN GESTAZIONE AVANZATA</i>	< 55 kg > 55 kg	0,40-0,50 mq/animale > 0,50 mq/animale
<i>CAPRE</i>	< 35 kg 35-55 kg > 55 kg	0,20-0,30 mq/animale 0,30-0,40 mq/animale 0,40-0,75 mq/animale
<i>CAPRE IN GESTAZIONE AVANZATA</i>	< 55 kg > 55 kg	0,40-0,50 mq/animale > 0,50 mq/animale
TRASPORTO AEREO		
25 kg		0,20 mq/animale
50 kg		0,30 mq/animale
75 kg		0,40 mq/animale
TRASPORTO MARITTIMO		
20-30 kg		0,24-0,265 mq/animale
30-40 kg		0,265-0,290 mq/animale
40-50 kg		0,290-0,315 mq/animale
50-60 kg		0,315-0,34 mq/animale
60-70 kg		0,34-0,39 mq/animale

Per i suini (Tabella n. 4), nel trasporto ferroviario e stradale tutti gli animali devono poter coricarsi e restare naturalmente in posizione eretta; la densità di carico in questi tipi di trasporto per suini del peso di 100 kg non dovrebbe essere superiore a 235 kg/mq. In base alla razza, alle dimensioni ed allo stato fisico degli animali può essere necessario aumentare tale superficie minima richiesta dalla normativa, fino ad un 20%, in relazione anche alle condizioni metereologiche ed alla durata probabile del viaggio. Per quanto riguarda in particolare il trasporto aereo, la densità di carico dovrebbe essere sufficientemente elevata per evitare ferite durante il decollo, le eventuali turbolenze e l'atterraggio; ogni animale dovrebbe comunque avere la possibilità di coricarsi.

Tabella n. 4 - Densità di carico per i suini

TRASPORTO AEREO	
15 kg	0,15 mcq/animale
25 kg	0,15 mcq/animale
50 kg	0,35 mcq/animale
100 kg	0,51 mcq/animale
TRASPORTO MARITTIMO	
FINO A 10 kg	0,20 mcq/animale
20 kg	0,28 mcq/animale
45 kg	0,37 mcq/animale
70 kg	0,60 mcq/animale
100 kg	0,85 mcq/animale
140 kg	0,95 mcq/animale
180 kg	1,10 mcq/animale
270 kg	1,50 mcq/animale

I valori previsti per la densità del trasporto di pollame in contenitori sono riportati nella Tabella n. 5 e possono variare in base non soltanto al peso ed alle dimensioni, ma anche allo stato fisico degli animali, alle condizioni metereologiche ed alla durata probabile del viaggio.

Tabella n. 5 - Densità per il trasporto di pollame in contenitori

<i>PULCINI DI 1 GIORNO</i>	21-25 cmq/pulcino
<i>VOLATILI PESO INFERIORE A 1,6 kg</i>	180-200 cmq/kg
<i>VOLATILI DI PESO FRA 1,6 E 3 kg</i>	160 cmq/kg
<i>VOLATILI DI PESO FRA 3 E 5 kg</i>	115 cmq/kg
<i>VOLATILI DI PESO SUPERIORE A 5 kg</i>	105 cmq/kg

Per il trasporto aereo si prevede l'utilizzo di contenitori adatti alle diverse specie e conformi alle disposizioni I.A.T.A. (Associazione Internazionale per il Trasporto Aereo) relative agli animali vivi, accettate anche dalla Comunità come standard minimi da rispettare e recepite già da molti paesi. Particolare attenzione va posta al problema del carico; l'aereo non deve essere mai completamente pieno e perciò lo spazio disponibile è sempre inferiore rispetto al volume totale. Gli animali non devono essere sotto l'effetto di sedativi; qualora vengano utilizzati, sempre sotto la diretta responsabilità e controllo del veterinario, l'animale deve essere accompagnato da tutte le informazioni sul farmaco.

Gli animali che durante il trasporto si feriscono o si ammalano devono poter ricevere al più presto tutte le cure del caso; quelli gravemente ammalati o morti devono essere allontanati dagli altri il prima possibile; per i casi di emergenza dovrebbe essere sempre disponibile, su ogni mezzo di trasporto, uno strumento per l'abbattimento degli animali di grossa taglia.

Per quanto riguarda le disposizioni inerenti al trasporto degli animali di piccola taglia come pollame, volatili e conigli domestici, cani e gatti domestici, mammiferi e volatili e altri animali vertebrati, non sono state apportate sostanziali modifiche, escludendo la specificazione delle densità di carico previste per il pollame trasportato in contenitori.

Nelle Figure n. 2, 3, 4 e 5 sono riportate le indicazioni generali a proposito dei diversi tipi di trasporto.

Figura n. 2 - Trasporto ferroviario

- ✓ I vagoni ferroviari utilizzati devono recare un contrassegno che indichi la presenza di animali vivi
- ✓ I solipedi devono essere legati sia lungo la stessa parete che gli uni di fronte agli altri. Gli animali giovani o non domati non devono essere legati
- ✓ Gli animali di grandi dimensioni devono essere disposti in modo tale che il guardiano possa liberamente circolare fra loro
- ✓ La separazione degli animali si può effettuare sia legandoli a pareti diverse del vagone, sia mediante opportuni tramezzi
- ✓ Devono essere prese tutte le precauzioni per evitare urti violenti dei vagoni

Figura n. 3 - Trasporto stradale

- ✓ I veicoli devono, allo stesso tempo, garantire la sicurezza degli animali ed impedire la fuga
- ✓ Nei veicoli che trasportano animali di grandi dimensioni devono essere previsti dispositivi di attacco
- ✓ Quando si renda necessaria la separazione degli animali, essa deve essere effettuata attraverso resistenti traverse
- ✓ I veicoli devono avere una rampa, conformemente alle condizioni stabilite dal Capitolo II, art 6.

Figura n. 4 - Trasporto aereo

- ✓ Gli animali devono essere collocati in imballaggi adeguati alla specie
- ✓ Durante il viaggio si devono evitare temperature troppo basse o troppo alte, nonché notevoli sbalzi di pressione
- ✓ Deve essere disponibile uno strumento approvato dall'autorità competente per l'abbattimento in caso di necessità

Figura n. 5 - Trasporto marittimo

- ✓ Gli animali non devono essere trasportati su ponti scoperti, tranne che in appositi imballaggi o in recinti fissi che assicurino adeguata protezione dalle intemperie
- ✓ Gli animali devono essere legati o sistemati in imballaggi o recinti
- ✓ Tutte le parti della nave occupate dagli animali devono essere provviste di dispositivi di scolo delle acque e mantenute in buone condizioni igieniche
- ✓ Deve essere disponibile uno strumento approvato dall'autorità competente per l'abbattimento in caso di necessità
- ✓ Le scorte di cibo ed acqua per gli animali devono essere sufficienti ed appropriate al tipo di animale trasportato
- ✓ Gli animali feriti o ammalati devono essere isolati e curati

Per quanto riguarda gli intervalli per l'abbeveraggio e l'alimentazione e i periodi di riposo, il Capitolo VII, inserito ex novo dal D. Lgs n. 388/98 specifica che le condizioni definite si applicano al trasporto di: "a) solipedi domestici ed animali domestici della specie bovina, ovina, caprina e suina; b) pollame, volatili e conigli domestici; c) cani e gatti domestici; d) altri mammiferi e volatili; e) altri animali vertebrati e a sangue freddo", fatta eccezione per il trasporto aereo.

La durata del viaggio degli animali delle specie precedentemente citate non deve essere superiore alle otto ore; tuttavia, la durata massima del viaggio può essere prolungata se per il veicolo di trasporto ricorrono le seguenti condizioni complementari: ci deve essere strame sufficiente sul pavimento del mezzo; il veicolo deve disporre di una quantità di foraggio adeguata in funzione alla specie animale trasportata; ci deve essere la possibilità di accedere direttamente agli animali; deve essere presente un'adeguata areazione, adattabile in base alla temperatura, sia esterna che interna; ci devono essere dei pannelli mobili per poter creare, qualora necessario, dei compartimenti separati; deve esistere un dispositivo che consenta di erogare acqua per l'abbeverata durante le soste, e, nel caso dei suini, ci deve essere acqua disponibile per l'abbeveraggio degli animali durante il viaggio. Qualora si utilizzi per il trasporto stradale un veicolo in possesso di tali requisiti, gli intervalli per l'abbeveraggio e l'alimentazione e la durata di viaggio e il periodo di riposo sono quelli riportati nella Tabella n. 6.

Tabella n. 6 - Abbeveraggio, alimentazione, durata del viaggio e soste per le diverse specie

SPECIE ANIMALE	DURATA VIAGGIO (H)	SOSTE (H)	ABBEVERAGGIO/ALIMENTAZIONE
SUINI	24 (max)	-	Gli animali devono poter accedere sempre all'acqua
SOLIPEDI (esclusi gli equidi registrati ai sensi della Dir. 90/426/CEE)	24 (max)	-	Gli animali devono poter essere abbeverati e, se necessario, alimentati ogni otto ore
VITELLI - AGNELLI SUINI - CAPRETTI PULEDRI Non svezzati che ricevono un'alimentazione lattea	9	1	Durante la sosta gli animali devono essere abbeverati
BOVINI - CANI - GATTI POLLAME - CONIGLI - ALTRI MAMMIFERI E VOLATILI - ALTRI ANIMALI VERTEBRATI E ANIMALI A SANGUE FREDDO	14	1	Durante la sosta gli animali devono essere abbeverati e, se necessario, alimentati

Per quanto riguarda il trasporto ferroviario e marittimo gli animali non dovrebbero viaggiare per un tragitto che superi le otto ore, salvo applicare le condizioni stabilite per i mezzi di trasporto su strada, eccettuate le condizioni relative ai periodi di riposo. Nel caso di un trasporto marittimo (sempre superiore alle otto ore) che collega regolarmente due diverse località della Comunità, a mezzo di veicoli caricati sulle navi senza scarico degli animali, deve essere previsto un periodo di riposo di dodici ore successivamente allo scarico, da effettuarsi nel porto di destinazione o nelle immediate vicinanze.

Il periodo di viaggio può essere prolungato di due ore, tenendo conto della particolare vicinanza del luogo di destinazione, nell'interesse degli animali trasportati.

Per gli animali destinati al macello gli stati membri sono autorizzati, fatte salve le disposizioni precedentemente ricordate, a prevedere un periodo di trasporto massimo di otto ore non rinnovabile, purchè si tratti di trasporti effettuati esclusivamente da punto di partenza ad un punto di destinazione, situati entrambi sul loro proprio territorio.

Conclusioni

Appare evidente, sia pure da questa sommaria illustrazione del provvedimento, che la questione della protezione degli animali durante i trasporti è estremamente complessa, in quanto devono essere tenute presenti non soltanto le necessità degli animali trasportati, ma anche quelle tecnico-organizzative nonché economiche.

Vista anche la non completa, per non dire superficiale, conoscenza degli etogrammi di molte specie appare augurabile, piuttosto di un puntiglioso e talvolta cavilloso dettato giuridico, una certa flessibilità delle normative, la cui applicazione dovrebbe essere affidata a veterinari adeguatamente preparati nel settore dell'etologia, nonché a personale tecnico professionalmente qualificato per questi particolari compiti.

Riassunto. Gli autori esaminano le leggi europee ed italiane sulla protezione degli animali durante i trasporti, con particolare attenzione al Decreto Legislativo n. 388/98, che modifica ed integra il precedente Decreto Legislativo n. 532/92, e che riguarda la protezione degli animali nei diversi tipi di trasporto, stradale, ferroviario, marittimo ed aereo.

Summary. The authors examine the European and the Italian laws about animal protection and welfare during international transport. The authors examine particularly the law 20/10/1998, n. 388, regarding the state of health of animal and the different rules for transport by air, by train, by road and by ship.

Legislazione Citata

Regolamento di Polizia Veterinaria - DPR n. 320/54

DPR n. 624/82, GURI n. 240, 01/09/1982

D.M. 20/7/1983, GURI n. 206, 28/07/1983

Direttiva n. 91/628/CEE, GUCE n. L340, 11/12/1991

D. Lgs n. 532/92, GURI n. 7, 11/01/1993

Direttiva n. 95/29/CE, GUCE n. L148, 30/06/1995

D.M. 18/2/1993, GURI n. 51, 03/03/1994

D. Lgs n. 388/98, GURI n. 262, 09/11/1998

IMPLICAZIONI LEGALI DELL'USO DI TECNOLOGIE INFORMATICHE E TELEMATICHE IN MEDICINA VETERINARIA.

Maurizio Dondi

Istituto di Clinica Medica Veterinaria

Premessa

Nel corso degli ultimi quindici anni l'impiego di strumenti informatici nella gestione delle strutture mediche e veterinarie é aumentato progressivamente. Al giorno d'oggi tale pratica è una realtà diffusa e consolidata nella maggior parte dei paesi industrializzati e deve essere considerata come un importante fattore di crescita economica e di qualità dei servizi medici.

Progressivamente sono andati aumentando sia il numero delle strutture ricorrenti a queste nuove tecnologie, sia la complessità delle singole applicazioni. Questa evoluzione tecnologica, dettata sicuramente dall'esigenza di una maggiore produttività e professionalità, è stata permessa dalla ricaduta scientifica fornita da ricerche primarie in altri campi del sapere, quali ad esempio l'elettronica e la logica matematica, e con il tempo è destinata a modificare profondamente il modo stesso di intendere e di praticare la medicina.

Come dato di fatto, l'utilizzo diffuso degli elaboratori elettronici negli ambulatori privati ed ospedalieri, negli uffici della pubblica amministrazione, ed il loro frequente collegamento per l'interscambio di dati tramite reti locali (intranet) o geografiche (internet), ha generato diversi tipi di necessità.

In primo luogo si é resa necessaria la costruzione di un'impalcatura teorica che permettesse al suo interno di

inquadrare e studiare i problemi legati all'acquisizione di dati medici e la loro successiva elaborazione in informazioni utili, memorizzabili e trasmissibili.

Successivamente, come logica conseguenza di tale fatto, si é affermata anche l'esigenza di regolamentarne gli aspetti legali, sia per svincolarle dalla sudditanza formale che avevano nei confronti delle pratiche amministrative tradizionali, sia per estendere l'utilizzo ai liberi professionisti ed ai clienti dei servizi sanitari.

In questa prospettiva il legislatore italiano si é dimostrato all'avanguardia in Europa. Infatti, negli ultimi anni sono state promulgate in successione diverse norme sull'argomento: la normativa sulla tutela del software (1992), sui reati informatici (1993), sui dati personali (1996) e sul riassetto della Pubblica Amministrazione (Legge Bassanini).

Una attenzione particolare va rivolta a quest'ultima, infatti essa stabilisce l'attribuzione di piena validità giuridica ad ogni atto e documento predisposti informaticamente, demandandone l'applicazione al Reg. 513/97, debitamente integrato da norme tecniche per la sua effettiva esecuzione. Quindi, con la successiva pubblicazione del DPR 513 sui "criteri e le modalità per la formazione, l'archiviazione e la trasmissione di documenti con strumenti informatici e telematici", i documenti informatici, la firma digitale e le autorità di garanzia per l'autenticità delle firme digitali, hanno fatto del documento digitale elettronico, non più solo un supporto complementare, ma un documento di primaria importanza avente pieno valore legale.

Prima di affrontare gli specifici aspetti legali della questione, per comprendere appieno il significato pratico e applicativo di queste innovazioni, è necessario fare alcune considerazioni sugli aspetti teorici e tecnici che hanno reso possibile questa rivoluzione, vale a dire gli aspetti applicativi della moderna tecnica crittografica, preceduti da una breve nota introduttiva sulla terminologia impiegata.

Aspetti teorici e tecnici

Terminologia crittografica

Nel nostro paese la crittografia soffre troppo spesso dell'uso di termini errati o imprecisi, spesso modellati maccheronicamente sui corrispondenti termini inglesi. Ma la crittografia è una disciplina che affonda le sue radici storiche in Italia (gli ambasciatori della Repubblica Veneziana e i Messi Pontifici erano i principali utilizzatori di tecniche crittografiche del Rinascimento) e dunque dispone di un nutrito e corretto insieme di termini che vale la pena di usare. E' dunque opportuno evitare termini quali "crittare" o peggio ancora "encrittare", modellati sull'inglese "to encrypt": il verbo corretto è "cifrare" o "mettere in cifra"; mentre l'azione del cifrare si chiama "cifatura", non "crittazione" o "crittografazione". Il sistema di crittografia si chiama semplicemente "cifrario", mentre il messaggio risultante dalla cifatura è un "testo cifrato", in contrapposizione al "testo in chiaro" che è l'originale. La "chiave" è invece la particolare parola, o frase, utilizzata per applicare ad un testo chiaro le regole del cifrario per produrre un testo cifrato.

Un antico principio della crittografia dice che il cifrario in se, può essere pubblico, e che tutta la segretezza di un testo cifrato deve risiedere non nel cifrario ma nella chiave usata per cifrare. L'operazione inversa alla cifatura si chiama "decifatura" e, attenzione, non è la stessa cosa della "decrittazione"! Fra "decifrare" e "decrittare" vi è infatti una differenza sostanziale: chi decifra è infatti colui il quale è legittimamente in possesso della chiave del cifrario, e la applica secondo le corrette regole per mettere in chiaro un testo cifrato a lui regolarmente destinato; chi decritta, invece, è un estraneo che non è affatto in possesso della chiave, ma tenta fraudolentemente di venire a conoscenza del contenuto di un testo cifrato a lui non destinato utilizzando sistemi indiretti.

La crittografia a chiave pubblica e

l'algoritmo RSA.

Se l'uso di tecniche crittografiche per proteggere i documenti è antico quanto la scrittura stessa, solo l'avvento del computer ha permesso di realizzare nella pratica dei sistemi di crittografia di nuova concezione basati su principi materialmente impossibili da applicarsi con sistemi manuali o meccanici. Si tratta di una nuova classe di cifrari che godono di molte importanti proprietà: sono molto sicuri ma al contempo facili da gestire; sono immuni dai principali problemi dei sistemi di crittografia classici, primo fra tutti quello della gestione e distribuzione delle chiavi; sono in grado di fornire "servizi" aggiuntivi quali la "firma elettronica" e la certificazione del mittente. Tutti si basano, infatti, sul concetto di "chiave asimmetrica", del tutto assente nella crittografia classica.

Questa nuova classe di cifrari a chiave pubblica è diventata realtà nel 1978, quando tre ricercatori del MIT (Rivest, Shamir e Adleman) scoprirono la possibilità reale di costruire cifrari a chiave asimmetrica utilizzando particolari proprietà formali dei numeri primi con qualche centinaio di cifre. In realtà l'algoritmo da essi inventato, che dalle loro iniziali si chiama oggi RSA, non è sicuro in termini matematicamente dimostrabili, dato che esiste la possibilità teorica che nuove scoperte matematiche possano minarne la base, ma tutti gli studiosi sono d'accordo nel ritenere che tale possibilità sia enormemente improbabile, e dunque l'algoritmo RSA viene oggi ritenuto di massima affidabilità.

Tutti i cifrari tradizionali, infatti, si comportano nella pratica come si comporta la normale serratura della nostra porta, che apriamo e chiudiamo con una stessa chiave. Nel caso specifico, la chiave crittografica usata per cifrare un messaggio è la stessa che poi viene applicata per decifrarlo e. Un cifrario con queste caratteristiche viene definito di questo tipo si chiama "simmetrico".

Nel 1976 due crittologi americani, Diffie ed Hellmann, pubblicarono un fondamentale lavoro teorico nel quale, ipotizzando di poter disporre di un cifrario "asimmetrico", dimostravano la fattibilità di sistemi crittografici di nuovo tipo, adatti alla crittografia di massa mediante il concetto delle "chiavi pubbliche". Nella pratica un tale sistema è dotato di due chiavi distinte, che sono una l'inverso dell'altra: se una viene usata per la cifratura la seconda deve essere usata per la decifratura, e viceversa. Il punto fondamentale del sistema è che le due chiavi devono essere indipendenti: ossia la conoscenza di una delle due chiavi non deve dare alcuna informazione utile alla ricostruzione dell'altra. Motivo per cui ogni utente del sistema crittografico pubblico crea in assoluta segretezza la propria coppia di chiavi, che chiameremo "diretta" e "inversa". Tutte le chiavi dirette vengono inserite in una lista pubblica, una specie di grande elenco del telefono di tutti gli utenti cui tutti hanno libero accesso; le chiavi inverse rimangono invece segrete.

In questo modo se l'utente A vuole mandare all'utente B un messaggio che solo B può leggere, non fa altro che cifrarlo con la chiave diretta di B, che può trovare nell'elenco pubblico. Il messaggio così cifrato può ora essere letto solo da B, perché solo lui è in possesso della propria chiave inversa che è l'unica in grado di decifrarlo.

Tale sistema è assolutamente sicuro, ma solo a patto che le chiavi inverse rimangano sempre segrete: da qui la necessità che ciascun utente generi le proprie chiavi e non comunichi a nessuno la propria chiave inversa.

Sempre con tale metodo è anche possibile inviare un messaggio a B tale che possa essere letto soltanto dal ricevente A e che dia la certezza assoluta di chi l'ha creato. Per far ciò, A cifra dapprima il messaggio usando la propria chiave segreta; poi cifra ulteriormente il messaggio risultante usando la chiave pubblica di B. A questo punto B, per leggere il messaggio, deve

compiere le seguenti operazioni: dapprima decifra il messaggio utilizzando la propria chiave privata, come nel caso precedente; ottiene così un messaggio che però è ancora in cifra, per cui B procede a decifrarlo ulteriormente usando però questa volta la chiave pubblica di A. . Solo adesso il messaggio è in chiaro e può essere letto; e B (o un giudice di tribunale . . .) ha la assoluta certezza che esso sia stato originato proprio da A. perché solo lui può aver usato la propria chiave segreta per applicargli la seconda cifratura.

Come caso particolare A può anche mandare messaggi pubblici, ossia diretti a tutti e non segreti, in modo però che risulti certamente che proprio lui ne è l'autore. Per far ciò basta che li cifri con la propria chiave segreta: chiunque può infatti decifrarli utilizzando la chiave pubblica di A, e questo basta a dimostrare che l'autore del messaggio è proprio A dato che solo lui poteva conoscere la propria chiave segreta. .

Da notare che Rivest, Shamir e Adleman hanno provveduto a brevettare il proprio algoritmo ed a costituire una società (la RSA Data Security) per tutelarne i diritti commerciali. La RSA, recentemente acquistata dalla Security Dynamics, ha venduto i diritti dell'algoritmo a molti operatori di rilievo quali Netscape, Microsoft ed altri; ed una variante del sistema RSA è utilizzato nel diffusissimo pacchetto di crittografia chiamato PGP (Pretty Good Privacy), disponibile liberamente nel pubblico dominio. Oggi dunque l'algoritmo RSA costituisce il fondamento dei sistemi crittografici su cui si stanno basando i meccanismi di sicurezza ed autenticazione di Internet e della futura società "senza carta".

La firma digitale elettronica

Come abbiamo visto in precedenza la firma digitale basata sulla crittografia a chiave pubblica si è ormai affermata come principale strumento in grado, allo stato attuale della tecnologia, di assicurare l'integrità e la

provenienza dei documenti informatici, e quindi di svolgere per questi la funzione che nei documenti tradizionali è assolta dalla firma autografa. In sostanza tale firma è una informazione che viene aggiunta ad un documento informatico al fine di garantirne integrità e provenienza. Sebbene il suo uso per la sottoscrizione dei documenti formati su supporti informatici sia quello più naturale, essa può essere utilizzata per autenticare una qualunque sequenza di simboli binari, indipendentemente dal loro significato. Un esempio sempre più comune di quest'uso generalizzato è l'aggiunta di firme digitali ai file contenuti nella memoria di massa di un sistema di elaborazione onde contrastare gli attacchi dei virus e degli hacker.

La principale differenza tra firma autografa e firma digitale risiede nel fatto che la prima è direttamente riconducibile all'identità di colui che la appone, poiché la calligrafia è un elemento identificativo della persona, mentre la seconda non possiede questa proprietà. Per coprire questa deficienza si ricorre all'autorità di certificazione, il cui compito è quello stabilire, garantire e pubblicare l'associazione tra firma digitale e soggetto sottoscrittore.

Per contro, mentre l'associazione tra testo di un documento e la firma autografa è ottenuta esclusivamente attraverso il supporto cartaceo, la firma digitale è intrinsecamente legata al testo a cui è apposta, tanto che i due oggetti possono essere fisicamente separati senza che per questo venga meno il legame esistente tra loro. Conseguenza di ciò è l'unicità della firma digitale, nel senso che a testi diversi corrispondono firme diverse e quindi, non ostante la sua perfetta replicabilità, è impossibile trasferirla da un documento ad un altro.

Il processo di firma digitale

Il processo di firma digitale richiede che l'utente effettui una serie di azioni preliminari necessarie alla

predisposizione delle chiavi utilizzate dal sistema di crittografia su cui il meccanismo di firma si basa; in particolare occorre:

1. la registrazione dell'utente presso un'autorità di certificazione,
2. la generazione di una coppia di chiavi, definite K_s , e K_p ,
3. la certificazione della chiave pubblica K_p ,
4. la registrazione della chiave pubblica K_p

Una volta espletate tali operazioni, per tutta la durata del periodo di validità della certificazione della chiave pubblica, l'utente è in grado di firmare elettronicamente un numero qualunque di documenti sfruttando la sua chiave segreta K_s . Tale periodo può essere interrotto prima del suo termine naturale dalla revoca della certificazione, che di norma viene effettuata su richiesta del proprietario qualora egli ritenga che la segretezza della sua chiave privata sia stata compromessa, ma che potrebbe avvenire anche per iniziativa dell'autorità di certificazione (AC), ad esempio perché l'utente non ha più titolo per l'uso della chiave. Infine, il processo di sottoscrizione vero e proprio viene eseguito con la seguente sequenza di operazioni:

1. generazione dell'impronta del documento da firmare,
2. generazione della firma mediante cifratura dell'impronta,
3. apposizione della firma al documento.

Registrazione dell'utente

La registrazione dell'utente presso una autorità di certificazione ha il duplice scopo di rendere questa certa della sua identità ed instaurare con esso un canale di comunicazione sicuro attraverso il quale verranno fatte viaggiare le chiavi pubbliche di cui viene richiesta la certificazione. All'atto della registrazione l'autorità di certificazione attribuisce all'utente un identificatore, di cui viene garantita l'univocità,

attraverso il quale sarà possibile a chiunque reperire in modo diretto e sicuro i certificati rilasciati al soggetto all'interno dei cataloghi pubblici in cui questi sono registrati.

Generazione della coppia di chiavi

L'utente, mediante un programma adatto al sistema crittografico adottato, genera una coppia di chiavi. Una di esse, quella da utilizzare per le operazioni di cifratura e quindi per la generazione della firma sarà mantenuta segreta ed assumerà il ruolo di K_s . Un'altra, destinata alla verifica, verrà resa pubblica attraverso la certificazione e corrisponderà perciò a K_p .

Certificazione della chiave pubblica

La certificazione della chiave pubblica ha lo scopo di rassicurare chiunque riceva un documento correttamente firmato, circa l'identità del soggetto che ha apposto la firma.

Registrazione della chiave pubblica

Una volta emesso, il certificato può essere reso disponibile in uno o più cataloghi ai quali può accedere chiunque abbia bisogno di accertare la validità di una sottoscrizione digitale. Questa operazione viene di norma effettuata, almeno per i cataloghi di sua competenza, dalla AC, contestualmente all'emissione.

Generazione dell'impronta

Al testo da firmare viene applicata una funzione (detta di hash) appositamente studiata che produce, secondo il meccanismo sinteticamente mostrato nella Figura 2, una stringa binaria di lunghezza costante e piccola, normalmente 128 o 160 bit. Questa la funzione di hash assicura l'unicità di tale stringa, nel senso che a due testi diversi non corrisponde la medesima impronta.

L'utilità dell'uso dell'impronta è duplice, in primo luogo consente di evitare che per la generazione della firma sia necessario applicare l'algoritmo di cifratura, che è intrinsecamente inefficiente, all'intero testo che può essere molto lungo. Inoltre consente l'autenticazione, da parte di una terza parte fidata, della sottoscrizione di un documento senza che questa venga a conoscenza del suo contenuto. Una tipica situazione in cui si sfruttano tali caratteristiche dell'impronta è la marcatura temporale che verrà discussa più avanti.

Generazione della firma

La generazione della firma consiste semplicemente nella cifratura, con la chiave segreta K_s , dell'impronta digitale generata in precedenza. In questo modo la firma risulta legata da un lato, attraverso la chiave segreta usata per la generazione, al soggetto sottoscrittore, e dall'altro, per il tramite dell'impronta, al testo sottoscritto.

In realtà l'operazione di cifratura viene effettuata, anziché sulla sola impronta, su una struttura di dati che la contiene insieme con altre informazioni utili, quali ad esempio l'indicazione della funzione hash usata per la sua generazione. Sebbene tali informazioni possano essere fornite separatamente rispetto alla firma, la loro inclusione nell'operazione di codifica ne garantisce l'autenticità.

Apposizione della firma

La firma digitale generata al passo precedente viene aggiunta in una posizione predefinita, normalmente alla fine, al testo del documento. Normalmente, insieme con la firma vera e propria, viene allegato al documento anche il valore dell'impronta digitale ed eventualmente il certificato da cui è possibile recuperare il valore della chiave pubblica.

è evidente che essendo il legame tra firma e

documento, stabilito attraverso l'impronta, di natura puramente logica, la firma stessa e le informazioni aggiuntive eventualmente ad essa associate possono essere registrate e gestite in modo del tutto separato rispetto al testo sottoscritto; in particolare possono trovarsi su supporti e sistemi di elaborazione del tutto indipendenti tra loro.

Verifica della firma digitale

L'operazione di verifica della firma digitale, mostrata schematicamente in Figura 3, viene effettuata ricalcolando, con la medesima funzione di hash usata nella fase di sottoscrizione, il valore dell'impronta e controllando che il valore così ottenuto coincida con quello generato per decodifica della firma digitale stessa.

Per facilitare l'operazione di verifica viene di solito allegato al documento firmato anche il certificato relativo alla chiave pubblica. Ciò non sarebbe strettamente necessario, dato che questo dovrebbe essere sempre recuperabile dal registro pubblico del certificatore, tuttavia, specie nel caso in cui la struttura di dati che costituisce la firma è povera di informazioni, tale ricerca potrebbe essere notevolmente onerosa, soprattutto se il registro in cui cercare non è univocamente determinato.

Al contrario, la disponibilità del certificato consente di disporre immediatamente delle seguenti informazioni, difficilmente contenute nella firma:

1. La chiave pubblica di verifica, mediante cui è possibile effettuare subito un controllo preliminare che consente, in caso di fallimento, di evitare ogni ulteriore azione.
2. L'identità dell'autorità di certificazione che ha emesso il certificato. Questa informazione è preziosa per determinare le modalità di accertamento della validità della firma.

3. Il codice di identificazione del certificato assegnato dal certificatore. Il suo possesso consente di accedere ai registri in modo diretto, evitando ricerche basate sull'identità del sottoscrittore, che sono inefficienti e maggiormente soggette ad errori.

La presenza di un certificato formalmente valido non può però esimere dalla verifica presso il certificatore, è infatti possibile che sia sopraggiunta una revoca della chiave di sottoscrizione, o, all'estremo, di quella di certificazione.

Marcatura temporale

Qualora sia necessario attribuire ad un documento certezza circa il momento in cui questo è stato redatto ed è divenuto valido, si ricorre alla sua marcatura temporale. Questa consiste nella generazione da parte di una terza parte fidata, normalmente una AC che funziona come servizio di marcatura temporale, di una ulteriore firma digitale, fatta di data e orario, aggiuntiva rispetto a quella del sottoscrittore.

Aspetti legislativi

Come accennato nelle note introduttive, l'articolo 15, comma secondo, della legge 15 marzo 1997, n. 59, (nota anche come legge "Bassanini"), stabilisce il fondamentale principio secondo cui "gli atti, i dati e i documenti formati dalla pubblica amministrazione e dai privati con strumenti informatici e telematici, i contratti stipulati nelle medesime forme, nonché la loro archiviazione trasmissione con strumenti informatici e telematici, sono validi e rilevanti ad ogni effetto di legge."
"

La novità di tale norma non risiede solo nella affermazione di criteri e principi omogenei per il settore pubblico e privato, innovando rispetto ad una tradizione fatta di ambiti completamente separati. Si tratta, in realtà, di uno strumento pienamente integrato nel

contesto dell'azione, condotta negli ultimi anni con maggiore decisione, per la semplificazione dei rapporti tra Stato e cittadino, la razionalizzazione della spesa degli uffici pubblici ed il contestuale miglioramento dei servizi offerti dalla pubblica amministrazione.

Da tempo, infatti, si ritiene che ogni processo di trasformazione dell'apparato burocratico italiano non possa prescindere dalla automazione dei servizi e dalla completa informatizzazione degli uffici pubblici.

In base all'articolo 3 del decreto legislativo 12 febbraio 1993, n. 39 decreto legislativo 12 febbraio 1993, n. 39 - ad esempio - ". . . gli atti amministrativi di tutte le pubbliche amministrazioni sono di norma predisposti tramite i sistemi informativi automatizzati" così come l'articolo 2 della legge 537/93 autorizza la conservazione e la esibizione di documenti "per finalità amministrative e probatorie " su supporti ottici conformi alle norme tecniche definite dall'Autorità per l'informatica nella pubblica amministrazione (AIPA).

Queste, ed altre importanti norme succedutesi sino ad oggi, con riferimento alla pubblica amministrazione ed ai privati, miravano al conseguimento di ambiziosi obiettivi di interesse generale, quali la riduzione dei procedimenti amministrativi mediante la razionalizzazione delle procedure, la riduzione degli ingenti costi sopportati dalla pubblica amministrazione pubblica per la registrazione e l'archiviazione dei documenti cartacei, la riorganizzazione dell'apparato pubblico in funzione del diritto d'accesso agli atti amministrativi esercitato dai cittadini, ai sensi della legge n. 241 del 1990.

All'origine del sostanziale fallimento di questi esperimenti deve porsi, evidentemente, non soltanto una naturale tendenza dell'apparato burocratico a considerare l'introduzione delle nuove tecnologie dell'informazione nella pubblica amministrazione come un ennesimo adempimento burocratico cui dar corso,

ma, soprattutto, la mancanza di una norma "di chiusura" generale come l'articolo 15 della legge n. 59197 che afferma il valore e l'efficacia "ad ogni effetto di legge" degli atti e dei documenti formati con strumenti informatici e trasmessi per via telematica.

Una volta affermata la generale validità del documento informatico, - come informazione originale e primaria generata dal calcolatore, - si è reso necessario disciplinare, con il regolamento previsto dallo stesso articolo 15 sopra citato, le modalità di attuazione di questo principio e, in particolare, le condizioni tecniche e giuridiche che consentono di attribuire con certezza il documento informatico al suo autore.

Nel mondo "tangibile" della carta scritta, è la sottoscrizione autografa (cioè la firma) apposta dal privato in calce al documento che esprime sino a prova contraria il consenso del firmatario sul contenuto dell'atto sottoscritto (Cass. civ sez. II n. 3027 del 15/5/82). Per i documenti pubblici, in verità, l'autografia della sottoscrizione non è mai configurabile come requisito di esistenza giuridica degli atti amministrativi, se gli elementi del documento mettono in chiaro e, senza equivoci, "la sicura attribuibilità dello stesso a chi deve esserne l'autore " (come ha affermato la sezione I della suprema Corte con la sentenza n. 7234 del 7 agosto 1996). Questo principio, recepito nell'articolo 3 del decreto legislativo 12 febbraio 1993 n. 39, sopra citato, ha consentito, ad esempio, l'invio dei verbali di notifica delle infrazioni stradali a domicilio o la formazione di certificati amministrativi con strumenti meccanografici o comunque automatizzati.

Non ha impedito, peraltro, che la pubblica amministrazione richiedesse, al cittadino che ad essa si rivolge, di apporre la propria firma in calce alle richieste di atti o documenti, in virtù del principio di riferibilità del documento al suo autore.

Da un punto di vista generale, sulla base delle

premesse effettuate, è possibile affermare che per utilizzare correttamente un sistema crittografico per la trasmissione di atti o documenti per via telematica è necessario che esso sia in grado di garantire (analogamente alle garanzie che offre, oggi, l'invio postale in plico chiuso) l'inviolabilità della corrispondenza (riservatezza), la conformità del duplicato trasmesso all'originale del documento (integrità dei dati), l'effettiva provenienza del documento da colui che appare come mittente (autenticazione) oltre a cosiddetto non ripudio (chi trasmette non deve poter negare di avere trasmesso, così come chi riceve non deve poter negare di aver ricevuto).

Ne consegue che, nel sistema classico per motivi tecnici, la chiave deve essere trasmessa su canali sicuri, per evitare che qualcuno possa sostituirsi al mittente o intercettare la corrispondenza. Ne consegue, altresì, che il sistema di cifratura classica può servire ad assicurare la riservatezza di un'informazione, ma non anche la autenticità (poiché non è sempre certo che chi possiede la chiave di cifratura sia anche colui dal quale apparentemente si origina il messaggio).

Invece, a differenza del sistema precedente, la cifratura di un documento informatico utilizzando la chiave privata equivale, alla firma autografa del documento, poiché fornisce, al destinatario delle informazioni, a determinate condizioni, la certezza sulla provenienza e sulla autenticità del documento e, come vedremo, la presunzione di consenso sul contenuto dell'atto o del documento.

Inoltre, come visto in precedenza, esiste, naturalmente, la possibilità di combinare tra loro i due schemi sopra esemplificati, per ottenere, come risultato, l'invio di documenti informatici per via telematica in modo da assicurare contemporaneamente la riservatezza del loro contenuto e la autenticità della sottoscrizione.

Per questi motivi, il regolamento attuativo dell'articolo

15 della 1. 59197, ha adottato questo sistema di cifratura moderna per attribuire validità ed efficacia al documento informatico. Gli esempi precedenti possono servire, dunque, a comprendere il significato dell'articolo 8 del regolamento, nella parte in cui è stabilito che "chiunque intenda utilizzare un sistema di chiavi asimmetriche di cifratura con gli effetti di cui all'articolo 2 deve munirsi di una idonea coppia di chiavi e rendere pubblica una di esse mediante la procedura di certificazione. . . " e che " . . . le chiavi pubbliche di cifratura sono custodite per un periodo non inferiore a dieci anni a cura del certificatore e, dal momento iniziale della loro validità, sono consultabili informa telematica. "

I limiti del sistema di firma digitale a chiavi asimmetriche risiedono nel sistema cosiddetto di "certificazione" delle chiavi. Chi ha messo le chiavi pubbliche nel registro? E' di tutta evidenza, infatti, che l'identificazione di chi effettua il deposito della chiave pubblica, che verrà utilizzata per decifrare la firma apposta con la corrispondente chiave privata, è di importanza decisiva ai fini del corretto funzionamento dell'intero sistema.

Si è detto, inoltre, che la conoscenza della chiave pubblica non deve fornire alcuna informazione utile per la ricostruzione della chiave privata corrispondente, e questo principio vale soltanto per chiavi di una certa lunghezza. Le chiavi troppo brevi, infatti, non resistono a lungo al processo di crittoanalisi, che è favorito dalla disponibilità a basso costo di potenze di calcolo sempre maggiori.

In estrema sintesi, dunque, il sistema funziona a condizione che la chiave pubblica sia "certificata" e che la coppia inscindibile di chiavi sia di lunghezza (calcolata in bit) adeguata a garantirne una sufficiente robustezza computazionale sulla base delle potenze di calcolo disponibili. E' per questi motivi, dunque, che il regolamento affida alla "procedura di certificazione" la validità dell'intero processo. Le chiavi asimmetriche di

cifratura hanno una durata limitata e possono essere sospese o revocate dal loro titolare (analogamente a quanto avviene, sotto altro profilo, per le carte di credito).

Il deposito della chiave pubblica deve essere effettuato presso un soggetto in grado di assicurare la corretta manutenzione del sistema di certificazione e, - in particolare, - in grado di garantire l'accesso telematico al registro delle chiavi pubbliche. Si tratta di una attività di grande importanza e delicatezza, che deve essere affidata a soggetti dotati di adeguati requisiti tecnici e di affidabilità.

L'articolo 8 del suddetto regolamento stabilisce, dunque, che le attività di certificazione devono essere effettuate da certificatori inclusi, sulla base di una dichiarazione anteriore all'inizio dell'attività, in apposito elenco pubblico, consultabile in via telematica, predisposto tenuto e aggiornato a cura dell'Autorità per l'informatica nella pubblica amministrazione analogamente a quanto avviene per lo svolgimento delle attività di monitoraggio per i contratti di grande rilievo previsti dal d. lgv. 39/93.

Quindi, i certificatori privati devono avere forma di società per azioni e capitale sociale non inferiore a quello necessario ai fini dell'autorizzazione all'attività bancaria. Devono inoltre:

- a) dimostrare il possesso da parte dei rappresentanti legali e dei soggetti preposti all'amministrazione, dei requisiti di onorabilità richiesti ai soggetti che svolgono funzioni di amministrazione, direzione e controllo presso banche;
- b) affidare le attività di certificazione a responsabili tecnici che, per competenza ed esperienza comprovate, siano in grado di rispettare le norme e le regole tecniche previste dal regolamento;
- c) dimostrare la qualità dei processi informatici e dei relativi prodotti, sulla base di standard riconosciuti a

livello internazionale.

La procedura di certificazione può essere svolta anche da un certificatore operante sulla base di licenza o autorizzazione rilasciata da altro Stato membro dell'Unione europea o dello Spazio economico europeo, sulla base di equivalenti requisiti.

Alla luce delle considerazioni svolte nelle pagine precedenti si può comprendere la ragione della disciplina degli obblighi degli utenti e del certificatore, prevista dall'articolo 9 del regolamento: Chiunque intenda utilizzare un sistema di chiavi asimmetriche per la firma digitale, è tenuto ad adottare tutte le misure organizzative e tecniche idonee ad evitare danno ad altri.

Il certificatore, in particolare, è tenuto a

- a) identificare con certezza la persona che fa richiesta della certificazione;
- b) rilasciare e rendere pubblico il certificato (le cui caratteristiche tecniche sono stabilite da un apposito decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri);
- c) specificare, su richiesta dell'istante, e con il consenso del terzo interessato, la sussistenza dei poteri di rappresentanza o di altri titoli relativi all'attività professionale o a cariche rivestite;
- d) attenersi alle regole tecniche stabilite con l'apposito decreto indicato alla lettera h);
- e) informare i richiedenti, in modo compiuto e chiaro, sulla procedura di certificazione e sui necessari requisiti tecnici per accedervi;
- f) attenersi alle norme sulla sicurezza dei sistemi informatici e a quelle sul trattamento dei dati personali;
- g) non rendersi depositario di chiavi private;
- h) procedere tempestivamente alla revoca od alla sospensione del certificato in caso di richiesta da parte del titolare o del terzo dal quale derivino i poteri di quest'ultimo, di perdita del possesso della chiave, di provvedimento dell'autorità, di acquisizione della

conoscenza di cause limitative della capacità del titolare , di sospetti abusi o falsificazioni;

i) dare immediata pubblicazione della revoca e della sospensione della coppia di chiavi asimmetriche;

j) dare immediata comunicazione all'Autorità per l'informatica nella pubblica amministrazione ed agli utenti, con un preavviso di almeno sei mesi, della cessazione dell'attività e della conseguente rilevazione della documentazione da parte di altro certificatore o del suo annullamento.

E' da notare che l'inosservanza da parte del certificatore, degli obblighi inerenti alle misure minime di sicurezza per la tutela dei dati personali (previsti dagli articoli 15, comma 2, e 36 della legge 31 dicembre 1996, n. 675) dà luogo a responsabilità penale.

E' venuto il momento, dunque, di analizzare brevemente gli effetti giuridici del sistema appena descritto. Il documento informatico, se conforme alle regole tecniche, e sottoscritto dal suo autore con l'uso della firma digitale, ha efficacia di scrittura privata (art 2702 del codice civ. le), e, qualora costituisca riproduzione di altro documento, soddisfa il requisito della forma scritta ed ha la stessa efficacia probatoria degli originali formati su carta (ari. 2712 cod. civ.).

Una volta risolto, con l'adozione del sistema di firma digitale, il problema della univoca identificazione dell'autore, il documento formato su supporti informatici ha il valore di atto originale, cui la legge attribuisce piena efficacia giuridica.

L'apposizione di firma digitale sostituisce (come stabilisce l'articolo 10 del regolamento), ad ogni fine previsto dalla normativa vigente, l'apposizione di sigilli, punzoni, timbri, contrassegni e marchi di qualsiasi genere. La copia informatica, dell'originale formato su carta, può sostituire ad ogni effetto di legge l'originale cartaceo da cui è tratto (art. 6) se è rilasciata da pubblici depositari autorizzati che attestino la

conformità all'originale con la apposizione della loro firma digitale, analogamente a quanto dispongono gli articoli 2714 e 2715 del codice civile per i documenti formati su carta. Al DPCM previsto dall'articolo 3 del regolamento è, demandato, peraltro, il compito di stabilire le modalità tecniche con cui il pubblico ufficiale può dichiarare la conformità delle copie al loro originale.

Infine, gli obblighi fiscali inerenti i documenti informatici prodotti (ivi comprese le copie informatiche di atti formati in origine su carta) dovranno essere assolti, infine, con modalità tecniche diverse da quelle, attualmente in uso, utilizzate per il computo dei fogli cartacei. La definizione di queste modalità è rimessa ad un decreto del competente Ministro delle Finanze (art. 4, comma secondo).

Conclusioni

A conclusione di questa rassegna sulle principali innovazioni indotte dall'utilizzo dei documenti informatici dall'articolo 15 della legge n. 59/97, può dirsi dunque, che il regolamento sul documento informatico consente di adattare le norme vigenti (in particolare la disciplina in materia di efficacia probatoria degli atti e dei documenti del codice civile) alle nuove realtà informatiche e telematiche.

La principale novità consiste, nella equiparazione del documento informatico, sottoscritto con l'uso della cosiddetta firma digitale, alla scrittura privata e, per la pubblica amministrazione, nella definizione degli atti e dei documenti informatici delle pubbliche amministrazioni come "informazione primaria ed originale, da cui è possibile effettuare, su diversi tipi di supporto, riproduzioni o copie per gli usi consentiti dalla legge".

Altre novità di rilievo sono costituite dalla sostituzione con la firma digitale del funzionario responsabile, in tutti i documenti informatici della pubblica amministrazione,

della sottoscrizione autografa, e della sostituzione ad ogni effetto di legge delle copie (o, meglio, trattandosi di file perfettamente identici agli originali, duplicati) agli originali da cui sono tratte se la loro conformità all'originale è certificata da un notaio o da altro pubblico ufficiale autorizzato.

A queste considerazioni di carattere generale, e quindi applicabili ai diversi ambiti della pubblica amministrazione, devono seguire necessariamente alcune considerazioni relative agli specifici aspetti della professione veterinaria. Considerazioni che non vogliono essere la definizione prematura e rigida di quelle che dovranno essere le vie seguite per realizzare i propositi del legislatore nello specifico settore medico-veterinario; ne, tantomeno, quelle che saranno le effettive applicazioni pratiche e le loro modalità tecniche di attuazione.

In questa sede sarebbe utile, piuttosto, iniziare una discussione che abbia sia caratteri analitici, vale a dire relativi alle reali necessità della peculiare attività veterinaria sia caratteri propositivi, cioè relativi alla formulazione di "ipotesi di lavoro", che permettano di avviare un dibattito a più voci e di più ampio respiro, che coinvolga tutti i diretti interessati del settore e che si concluda con una fine modulazione applicativa delle norme suddette.

Iniziando a valutare i documenti che vengono utilizzati nei rapporti fra il medico veterinario libero professionista e l'Azienda Sanitaria Locale è necessario soffermarsi in primis sulla ricetta medico-veterinaria, in virtù del fatto che condensa buona parte dell'attività diagnostica e amministrativa del settore.

Tale ricetta farmaceutica normalmente viene redatta, nelle sue varie forme e modelli, su supporto cartaceo che viene consegnato all'utente alla fine della visita clinica e riassume in se tutto l'iter diagnostico e terapeutico eseguito dal veterinario. Essa riporta i dati

anagrafici del proprietario degli animali ed anche il loro segnalamento; riporta, inoltre, la firma autografa e le informazioni anagrafiche del veterinario che l'ha redatta, il quale appone il proprio timbro con numero e Ordine Provinciale di appartenenza.

La trasposizione di un tale documento in forma elettronica, soprattutto quello in triplice copia, potrebbe snellire e velocizzare l'attività di controllo da parte dell'autorità preposta; infatti, le copie (che alla luce delle norme considerate diventano originali di fatto) sarebbero inviate telematicamente dal veterinario presso gli uffici dell'ASL, esaminate in tempo reale, archiviate e subito disponibili per eventuali controlli incrociati.

E' anche ipotizzabile, che nel medio periodo, la documentazione consegnata al proprietario degli animali possa essere memorizzata su supporti diversi da quelli cartacei: ad esempio supporti quali carte a banda magnetica, a microchip o, addirittura, su supporti magneto-ottici, i quali potrebbero anche contenere anche altri documenti legati allo stato sanitario dell'animale. Il vantaggio sarebbe duplice: diminuire le possibilità di frodi legate a falsificazioni dei documenti stessi e l'immediata disponibilità da parte del farmacista di un documento pari all'originale da poter essere utilizzato come dato primario utile alla mobilitazione dei farmaci.

Altri tipi di documenti che potrebbero essere redatti ed inviati in tempo reale presso gli uffici ASL sono: le dichiarazioni di trattamento vaccinale a scopo profilattico effettuate tramite il Mod. 12; le comunicazioni di trattamenti ormonali; le denunce di malattie infettive (o di sospetto) da effettuare sulla base del vigente Regolamento di Polizia Veterinaria; le richieste di autorizzazione per l'apertura di nuovi ambulatori o la modifica di quelli esistenti; ed infine, le richieste di autorizzazioni relative alle scorte di medicinali presso gli ambulatori e le aziende zootecniche. In queste circostanze un ulteriore

vantaggio, rispetto a quelli citati in precedenza, sarebbe quello di ottenere automaticamente un protocollo per ogni documento inviato direttamente sul proprio elaboratore elettronico, in modo da poter seguire in modo trasparente ogni livello dell'iter amministrato delle pratiche.

Oltre agli innegabili vantaggi che queste nuove tecnologie possono apportare in termini di produttività all'attività veterinaria è necessario mettere in evidenza anche le situazioni limite che non ne permettono, almeno nel breve periodo e previo un completo ammodernamento della rete informativa sanitaria, la completa applicazione. In particolare, vincoli ai supporti cartacei sembrano persistere in diverse circostanze, quali ad esempio: l'attività di introduzione di animali da paesi terzi non facenti parte della Comunità Europea, che fa affidamento su certificati cartacei in uso presso i paesi di origine o provenienza del bestiame; le operazioni di controllo relative alla movimentazione del bestiame e all'anagrafe aziendale, poiché una copia cartacea del Modello Rosa, di cui all'Art. 31 del Regolamento di Polizia Veterinaria, deve essere allegato alla merce (vale a dire al bestiame) durante il trasporto stesso, per permettere accertamenti da parte delle autorità competenti; infine, il trasporto di mangimi medicati, che deve essere corredato di ricetta medico-veterinaria opportunamente allegata alla fattura che accompagna la merce.

Concludendo, è comunque possibile affermare, che nonostante alcune iniziali difficoltà applicative, legate soprattutto alle suddette lacune normative ed alle carenze infrastrutturali e tecnologiche dei servizi veterinari, l'applicazione della normativa sui documenti elettronici attuerà una vera e propria "rivoluzione" nella Sanità Pubblica Veterinaria, aumentando le capacità operative e la produttività delle singole strutture, invertendo, fra l'altro, totalmente il rapporto che oggi lega gli originali (cartacei) con le copie (su supporti informatici, a mero scopo di archiviazione),

consentendo ed incoraggiando , tra l'altro, il totale recupero su supporti informatici dei voluminosi e costosi archivi cartacei che caratterizzano ancora oggi gli uffici pubblici.