

STUDIO COMPARATIVO SUI CALICI GUSTATIVI IN DIVERSE SPECIE DI TELEOSTEI

Accone F.[°], Sanna M.[°], Gazza F.^{°°}, Botti M.^{°°}, Corriero A.[°] e De Metrio G.[°]

[°]*Dipartimento di Biologia Animale dell'Università di Sassari*

^{°°}*Dipartimento di Salute Animale dell'Università di Parma*

[°]*Dipartimento di Sanità e Benessere Animale dell'Università di Bari*

Introduzione

Lo studio del numero e della topografia dei calici gustativi presenti nei pesci ha sempre rappresentato un interessante argomento di ricerca a causa della grande variabilità inter ed intraspecifica registrata. Infatti, a differenza dei Vertebrati terrestri nei quali sicuramente prevale la topografia linguale, nei Pesci, in virtù del mezzo liquido in cui vivono, la localizzazione dei citati recettori risulta molto più varia potendosi essi rinvenire, oltre che nelle branchie, nelle labbra e nei barbigli, anche sull'intera superficie del corpo.

Numerosi ricercatori si sono soffermati, in particolare, ad esaminare la presenza dei citati recettori nei distretti extralinguali, soprattutto nelle specie che possono essere allevate e quindi di maggiore valore economico (Hasler, 1975; Sinha, 1975; Hossler e Merchant, 1983; Jakubowsky, 1983; Ray e Ray, 1986). Al contrario sono piuttosto lacunose le indagini condotte su altre specie di minore interesse economico rivolte soprattutto allo studio dei calici ubicati nella plica della mucosa buccale che, per motivi topografici e funzionali, può essere assimilata alla lingua degli altri Vertebrati (Hara, 1991, 1993; Kotrschal, 1991; Palmieri e coll., 1992; Reutter, 1992).

La nostra ricerca si propone di precisare topografia e consistenza numerica dei chemorecettori presenti nella "lingua" di numerose specie ittiche mediterranee cercando di correlare eventuali differenze interspecifiche con le diverse abitudini alimentari.

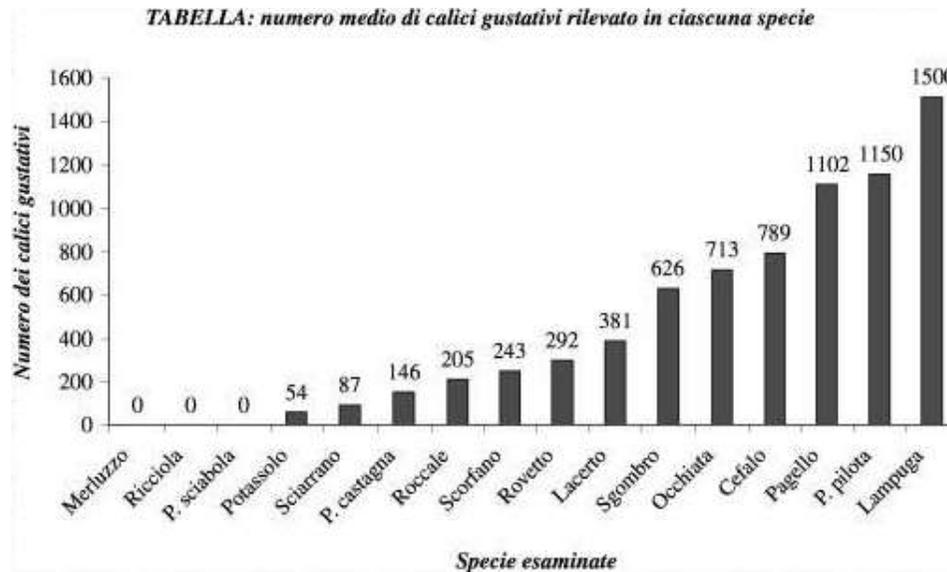
Materiali e metodi

Da 16 specie di Teleostei, abitualmente viventi nel mar Mediterraneo e con abitudini alimentari differenti (sono comprese specie carnivore con spiccate abitudini predatorie e specie che si nutrono di alghe e di piccoli organismi), è stata asportata la plica mucosa assimilabile alla lingua dei Vertebrati terrestri. Le specie considerate sono le seguenti: Sciarrano (*Serranus scriba*), Roccale (*Symphodus ocellatus*), Occhiata (*Oblada melanura*), Sgombro (*Scomber scombrus*), Pesce pilota (*Naucrates ductor*), Pesce castagna (*Brama brama*), Ricciola (*Seriola dumerili*), Pagello (*Pagellus erythrinus*), Pesce sciabola (*Lepidopus caudatus*), Nasello (*Merluccius merluccius*), Cefalo (*Mugil cephalus*), Rovetto (*Rovettus pretiosus*), Lacerto (*Trachurus trachurus*), Lampuga (*Coryphaena hippurus*), Scorfano quattrocchi (*Helicolenus dactylopterus*), Potassolo (*Micromesistius poutassou*).

Il materiale è stato in parte fissato in formalina neutra al 10% o in liquido di Bouin, incluso in paraffina e sezionato serialmente. Le sezioni, dello spessore di 7-10 μ m, sono state sottoposte alle comuni colorazioni istologiche (ematossilina-eosina, tricromica di Mallory-Azan) oppure alla tecnica di impregnazione argentea secondo Marsland-Gless-Erikson modificata da Winckler. I prelievi rimanenti sono stati invece fissati in formalina neutra al 20%, sezionati al criostato e le fette, dello spessore di 15-20 μ m, sottoposte ad impregnazione secondo la metodica di Bielchowsky modificata da Gros-O. Schultze.

Risultati

Nel distretto anatomico considerato sono stati contati complessivamente 18.981 calici gustativi distribuiti in maniera alquanto eterogenea nelle specie esaminate. Infatti, sono state individuate specie con una elevata dotazione recettoriale (da 713 fino a 1500), altre specie in cui il numero dei calici è più ridotto (da 54 a 626) ed altre ancora in cui i recettori mancano (Tabella).



Sulla base della media ricavata dal numero dei recettori presenti nei soggetti di ciascuna specie è possibile suddividere i pesci esaminati nei tre gruppi appresso elencati:

- pesci privi di calici gustativi (Pesce sciabola, Ricciola, Nasello)
- pesci con una dotazione di circa 600 calici (Sciarrano, Roccale, Sgombro, Potassolo, Pesce castagna, Rovetto, Lacerto, Scorfano quattrocchi)
- pesci con un corredo recettoriale mediamente compreso fra 713 e 1500 (Occhiata, Pesce pilota, Pagello, Cefalo, Lampuga).

Inoltre, si deve precisare che la loro distribuzione non sempre è uniforme nella plica mucosa "linguale" ed anche l'analisi di questo parametro consente di rilevare notevoli differenze interspecifiche. Infatti, esistono specie con calici uniformemente distribuiti su tutta la superficie linguale (Roccale, Sciarrano), specie con recettori presenti in prevalenza sull'apice (Rovetto, Pesce pilota, Occhiata) o sul corpo (Potassolo, Lampuga, Lacerto, Pesce castagna) e, infine, specie con calici situati esclusivamente nella radice (Scorfano, Cefalo, Pagello, Sgombro).

I calici sono sempre accolti nello spessore dell'epitelio di rivestimento, hanno diametro maggiore che varia da 25 a 76.5 μ m e diametro minore che oscilla da 15.5 a 41.5 μ m, mentre la struttura è quella tipica (Figg. 1, 2, 3). Infatti, sono costituiti da cellule sensitive la cui estremità apicale occupa il poro gustativo e ne sopravanza il margine, da cellule di sostegno e da un terzo citotipo formato da elementi più piccoli, situati alla base del recettore, la cui funzione sarebbe quella di rimpiazzare le cellule precedenti. Di solito i calici si trovano isolati, ma nelle specie in cui maggiore

è la dotazione non è infrequente la presenza di 2 o più recettori affiancati (Fig. 4).

L'impiego delle metodiche impregnative ha messo in evidenza una ricca innervazione costituita da esili fasci che decorrono nel connettivo della tonaca propria dirigendosi verso la membrana basale. In corrispondenza della base di ciascun calice, singole fibre abbandonano i tronchicini prima ricordati e possono intrecciarsi organizzando un delicato plesso subepiteliale dal quale poi si portano alla periferia del recettore (fibre intergemmali) o al suo interno (fibre gemmali). Queste ultime risalgono la porzione basale del calice fino al punto in cui esauriscono la loro corsa stabilendo contatti sinaptici, in particolare, con le cellule gustative (Fig. 5).

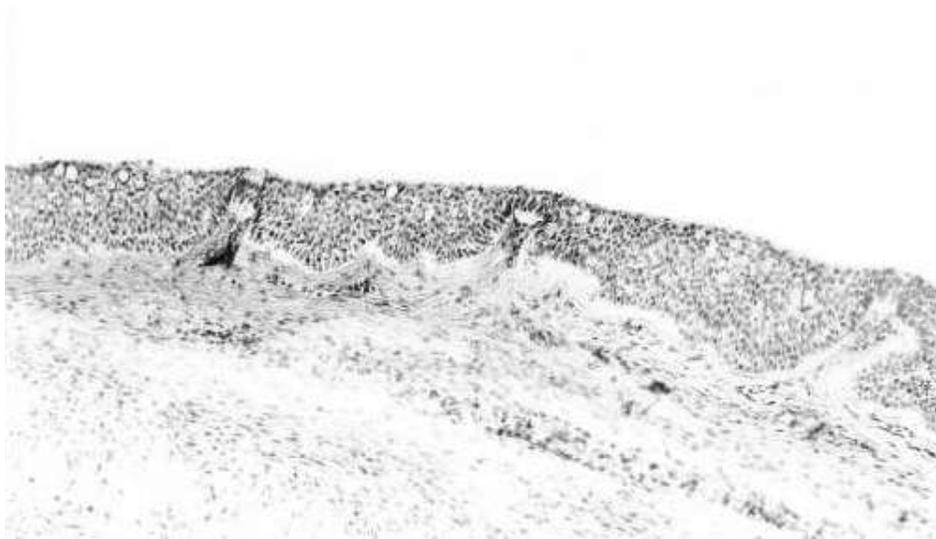


Fig. 1 - Sciarrano: mucosa "linguale". In evidenza tre calici gustativi isolati. Bouin, ematos.-eosina; 120x.

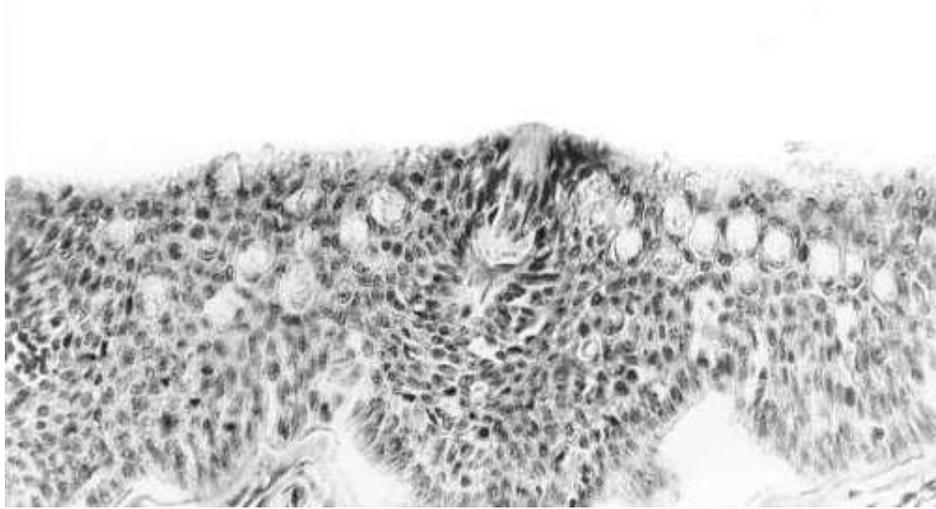


Fig. 2 - Rovetto: mucosa "linguale". Particolari strutturali di un calice gustativo.
Bouin, ematos.-eosina; 300x.



Fig. 3 - Occhiata: mucosa "linguale". Non è infrequente che calici gustativi siano localizzati sulla sommità di sollevamenti epiteliali. Bouin, ematos.-eosina; 300x.

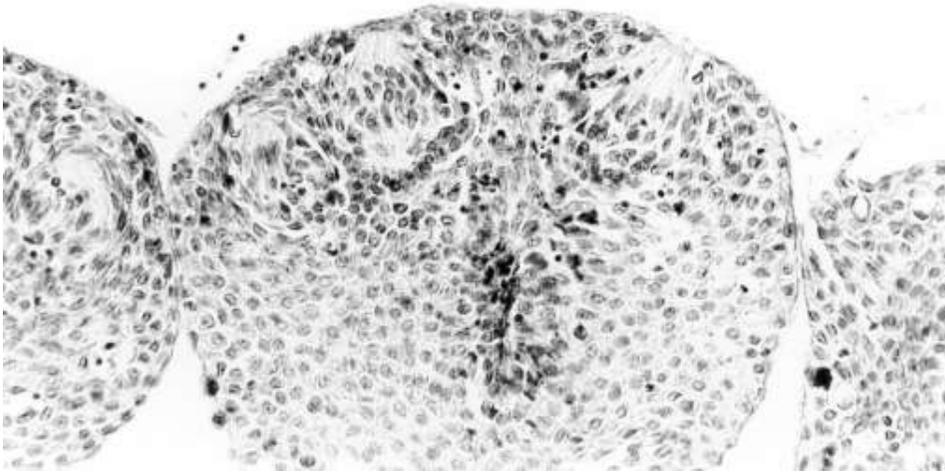


Fig. 4 - Lacerto: mucosa "linguale". Talvolta i calici sono riuniti in gruppi. Bouin, ematos.-eosina; 300x.



Fig. 5 - Lampuga: mucosa "linguale". Le frecce indicano la componente nervosa destinata ad un recettore. Impregnazione argenticca secondo il metodo Bielschowsky modificato da Gros - O. Schultze; 300x.

Discussione

I risultati conseguiti ed in particolare le differenze interspecifiche registrate sono, a nostro avviso, la migliore evidenza di una corretta correlazione esistente tra il citato presidio chemorecettoriale e le differenti abitudini alimentari delle specie studiate. Infatti, si può osservare che al 1° gruppo di pesci, caratterizzati da assenza di calici, appartengono specie alquanto voraci, che si nutrono di altri pesci, spesso di grandi dimensioni. Invece, i pesci del 2° gruppo, forniti di un numero ridotto di recettori, possono essere considerati modesti predatori che generalmente si nutrono di pesci di piccole dimensioni, crostacei e molluschi. Infine al 3° gruppo appartengono pesci con ricca dotazione recettoriale che si nutrono di piccoli invertebrati, alghe e residui alimentari. In quest'ultimo gruppo si trova anche la Lampuga che, pur essendo specie altamente predatrice, ha però un'alimentazione varia comprendente, oltre a diverse specie di pesci, anche invertebrati quali ctenofori e crostacei (Bannister, 1976) ed alghe del genere *Sargassum* (Tortonese, 1970).

Sulla base delle considerazioni appena esposte si potrebbe avanzare l'ipotesi che nei Pesci, in analogia a quanto si verifica nei Vertebrati terrestri, il numero dei calici gustativi è tanto più elevato quanto maggiore è il periodo di soggiorno dell'alimento nel cavo orale. Se così fosse, allora non sarebbe casuale che il minor numero di recettori si rileva in quelle specie in cui l'alimento transita velocemente nel cavo orale quasi a denunciare la scarsa importanza della percezione del suo sapore, mentre il maggior numero si osserva in quelle specie in cui l'alimento percorre molto lentamente la cavità orale, perché lo stesso deve essere accuratamente selezionato nei suoi diversi componenti prima di essere ingerito.

Infatti, è proprio nelle specie che possiedono siffatto comportamento alimentare che il cospicuo corredo recettoriale gioca un ruolo decisivo nel processo della così detta "ritenzione selettiva" (Sibbing, 1986) che avviene in cavità orale e secondo la quale, mediante un complesso sistema di flussi di acqua in entrata ed in uscita, vengono trattenute alcune particelle alimentari ed espulse altre.

D'altra parte è anche giusto ricordare che la correlazione tra il numero dei calici gustativi ed il regime alimentare è stata, in precedenza, rilevata anche in altre specie. A questo proposito meritano di essere ricordate le osservazioni condotte da Sinha (1975) sull'Indian freshwater (Cirrhinus mrigala), pesce che durante lo sviluppo si trasforma da carnivoro in erbivoro. Infatti, questo Ricercatore ha dimostrato che nelle prime fasi di vita il senso maggiormente coinvolto nella scoperta e nella scelta del cibo è la vista, mentre da adulto, quando il regime alimentare cambia in erbivoro, l'importanza della vista è praticamente insignificante ed acquista invece un grande valore funzionale il gusto. Pertanto, l'ipotesi formulata sulla correlazione corredo recettoriale-abitudini alimentari, non sembra essere smentita dalla condizione riscontrata nella Lampuga che, pur essendo considerata predatrice, presenta però anche abitudini alimentari onnivore.

Parole chiave: pesci, lingua, calici gustativi, chemorecezione.

Key words: fishes, tongue, taste buds, chemoreception.

Mots clé: poissons, langue, bourgeons gustatifs, chimioréception.

RIASSUNTO - La ricerca si propone di esaminare i calici gustativi presenti nella 'lingua' di numerose specie di Teleostei per determinarne il numero, la distribuzione e il probabile impegno funzionale.

Le osservazioni hanno rilevato la presenza dei summenzionati chemorecettori in 13 delle 16 specie esaminate, ma il reperto, nelle specie in cui il dato è positivo, è estremamente variabile dal punto di vista intra ed interspecifico.

In base alle indagini eseguite è ragionevole affermare che, generalmente, il distretto 'linguale' dei Teleostei non costituisce la sede elettiva dei calici gustativi. Inoltre, è possibile ipotizzare, in accordo con altri Autori, che in questi Vertebrati i chemorecettori in esame siano impegnati, oltre che nella funzione gustativa, anche nella captazione di altre informazioni sensitive.

SUMMARY - A research about the "tongue" taste buds of numerous teleost's species was carried out to investigate their number, distribution, structure and probable functional engagement.

The present observations have pointed out that their presence is detectable in 13 out of 16 species studied, but this finding varies greatly in according to the species. Moreover, also their number varies greatly, while the structure is typical.

On the basis of our investigations it can reasonably asserted that the teleost's tongue is not generally the elective site of taste. Besides it can be probably hypothesized that in these Vertebrates the tongue taste buds, according to other Authors, are employed to carry out other sense information in addition to the gustative function.

Bibliografia

- BANNISTER J. V. (1976). The length-weight relationship, condition factor and gut contents of the dolphin-fish *Coriphaena hippurus* (L.) in the Mediterranean. *J. Fish. Biol.* 9, 335-338.
- HARA T. J. (1991). Chemoreception in fish physiology. W.S. Hoar and D.J. Randall, New York and London: Academic press.
- HARA T. J. (1993). Chemoreception in fish physiology. D.H. Evans, CRC Press.
- HASLER A. D. (1975). The sense organs: olfactory and gustatory sense of fishes. In: *The physiology of fishes*: Brown M. E., New York, Academic Press.
- HOSSLER F. E., MERCHANT L. H. (1983). Morphology of taste buds on the gill arches of the Mullet *Mugil cephalus*, and the Killifish *Fundulus heteroclitus*. *Am. J. Anat.* 166, 299-312.
- JAKUBOWSKI M. (1983). New details on the ultrastructure (TEM, SEM) of taste buds in fishes. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 97, 849-862.
- KOTRSHAL K. (1991). Solitary chemosensory cell-taste, common chemical sense or what?. *Reviews Fish Biol. Fisher.* 1, 3-22.
- PALMIERI G., ASOLE A., DE METRIO G., SANTAMARIA N., MEGALOFONOU P. (1992). Distribuzione e struttura di calici gustativi nella lingua di Conger conger (Linnaeus 1781) (Osteichthyes-Congridae). *Atti S.I.S.Vet.* 46, 613-617.

- RAY A., RAY A. K. (1986). Functional scanning electron microscopical observation on the oral roof in an air-breathing Teleost, *Clarias batrachus* (Linn.). *Gegenbaurs Morph. Jahrb.* 132, 429-441.
- REUTTER K. (1992). Structure of the peripheral gustatory organ, represented by the siluroid fish *Plotosus lineatus* (Thunberg). In: *Fish Chemoreception*, Hara T., Ed. London, Chapman & Hall.
- SIBBING F. A. (1986). The role of taste in feeding mechanism of the Carp (Cyprinidae). *Ann. New York Acad. Sci.* 612-615.
- SINHA G. M. (1975). On the origin, development and probable function of taste bud in the lip and bucco-pharyngeal epithelia of an indian freshwater, major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) in relation to food and feeding habits. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 89, 294-304.
- TORTONESE E. (1970). *Fauna d'Italia. XI, Osteichthyes, Pesci Ossei.* Bologna Calderini Edit.

VALUTAZIONE ISTOLOGICA DELLE PROPRIETA' OSTEOCONDUTTIVE DI UN DOPPIO RIVESTIMENTO BIOATTIVO

Gabbi C., Cacchioli A., Ragionieri L.

Dipartimento di Salute Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli studi di Parma

Introduzione

Alcuni problemi nel settore ortopedico e maxillo-facciale nascono dalla incapacità del tessuto osseo ad autoripararsi in situazioni determinate da patologie dovute a traumi.

Per risolvere questi problemi possono venire utilizzati prelievi autologhi di osso, sebbene siano limitati i distretti scheletrici idonei a permettere l'applicazione di tale metodica. Inoltre possono insorgere problemi quali infezioni e, comunque, tutte le problematiche legate a tali interventi, non ultimo, il ripetersi dell'atto operatorio.

Una sfida degli ultimi anni è quella di trasformare un sistema da semplicemente biodegradabile a bioattivo che interagisca nel processo fisiologico di guarigione. (1, 3, 6, 7 e 8)

Per superare tali difficoltà e realizzare l'obiettivo predetto vengono studiati materiali di sintesi quali l'Idrossilapatite (HA) e Vetri biologicamente attivi come il Biovetro (BV), utilizzati sotto forma di rivestimenti protesici ottenuti con la tecnica della deposizione su supporto metallico tramite plasma-spray, entrambi con capacità di legarsi direttamente ai tessuti ossei circostanti senza formazione di tessuto connettivo fibroso, ma con tempi di degradazione ed effetto osteoconduttivo diversificati (2, 4 e 5).

Al fine di sfruttare le caratteristiche peculiari di entrambi i materiali, si è pensato di effettuare un rivestimento costituito da due strati, uno superficiale costituito da BV e uno più profondo da HA, in modo da ottenere, nei tempi immediatamente successivi all'impianto protesico, gli effetti osteoconduttivi dovuti all'azione della degradazione del BV e, nei tempi più lunghi, il perdurare del legame diretto fra HA e tessuto osseo neoformato, garantendo in tal modo la continuità fra tessuto osseo e impianto senza soluzioni di continuo favorevoli alla neoformazione di tessuto connettivo fibroso, causa a lungo termine della mobilizzazione della protesi.

Materiali e Metodi

Il piano sperimentale ha previsto l'utilizzo di 8 conigli di razza White New Zealand, di sesso maschile, del peso di $3,5 \pm 0,2$ Kg, in età riproduttiva. Sono stati previsti 4 tempi sperimentali: 15 giorni, 1, 2 e 4 mesi.

Il materiale impiantato era costituito da provini in titanio: \varnothing 5 mm, lunghezza 20 mm, e da provini in titanio rivestiti, in due tempi, da HA (100 μ m di spessore) e BV (50 μ m di spessore).

I provini, tramite intervento chirurgico in anestesia generale (0,1 ml/Kg Prequillan (FATRO), 0,25 ml/Kg KETAVET 100 (GELLINI)), sono stati posizionati nell'epifisi distale del femore, mediante un foro praticato a livello del solco della troclea, previo scapsulamento della rotula, fino a raggiungere il canale midollare. L'intervento è stato effettuato in modo da ottenere una identica collocazione dell'impianto.

Per valutare i tempi della crescita ossea perimplantare si sono utilizzati marcatori quali: Calceina Verde [20 mg/Kg (SIGMA)] e Xylenol Orange [90 mg/Kg (FLUKA)]. Tali sostanze sono state somministrate, per via sottocutanea, rispettivamente: un mese e una settimana prima della data del sacrificio.

Le porzioni ossee contenenti il provino sono state trattate con le normali tecniche istologiche per l'osservazione dei campioni non decalcificati. Le sezioni, dello spessore di 40, 60, 80 e 100 μ m, ottenute attraverso l'uso di un microtomo a lama circolare diamantata (Leitz 1600), sono state osservate al microscopio ottico a luce polarizzata, con e senza l'interposizione della lamina compensatrice (gesso Zeiss) e al microscopio ottico a fluorescenza.

Caratteristiche del gruppo sperimentale:

15 giorni		1 mese		2 mesi		4 mesi	
<i>Animale n° 1</i>		<i>Animale n° 2</i>		<i>Animale n° 3</i>		<i>Animale n° 4</i>	
Dx	Sx	dx	Sx	dx	Sx	dx	Sx
Ti	Foro	Ti	Foro	Ti	Foro	Ti	Foro
<i>Animale n° 5</i>		<i>Animale n° 6</i>		<i>Animale n° 7</i>		<i>Animale n° 8</i>	
Dx	Sx	dx	Sx	dx	Sx	dx	Sx
HapBv	HapBv	HapBv	HapBv	HapBv	HapBv	HapBv	HapBv

Osservazioni e Conclusioni

L'osservazione dei preparati ottenuti dai segmenti ossei appartenenti agli animali sacrificati a 15 gg. permette di valutare le caratteristiche del provino impiantato sia per quanto riguarda le caratteristiche del rivestimento che la situazione tissutale perimplantare.

Le immagini ottenute con l'osservazione a luce U.V. evidenziano la presenza dei due strati di materiale (fig.1) di rivestimento del provino.

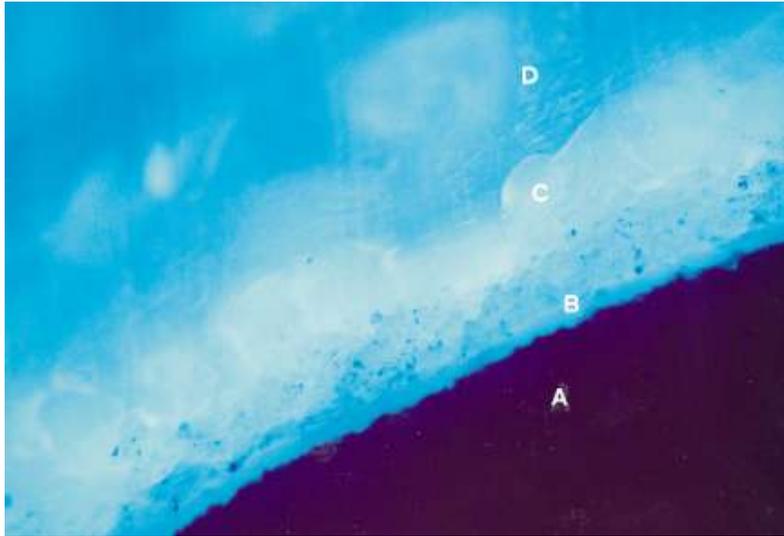


Fig. 1 - Osservazione al Microscopio ottico a luce U.V. (Ingrandimento 10X).
L'immagine evidenzia la presenza dei due strati di rivestimento del provino. A= Metallo;
B Idrossilapatite; C= Biovetro; D= Cavità midollare.

Lo studio dei tessuti perimplantari alle varie altezze evidenzia l'assenza di strutture ossee fra la corticale e l'impianto che viene, pertanto, a trovarsi libero nei movimenti se sottoposto a forze, essendo senza punti di appoggio. È importante sottolineare questa topografia, in quanto la risposta osteogenetica perimplantare risulta diversa a seconda della localizzazione più o meno prossima a tessuto osseo.

I preparati dei provini appartenenti ai gruppi sperimentali a 1-2-4 mesi evidenziano, a livello del rivestimento, una progressiva diminuzione dello strato superficiale di BV sino alla sua completa scomparsa con la permanenza, a 4 mesi, solo del rivestimento di HA.

Per quanto riguarda la componente tissutale si osserva, parallelamente alla degradazione dello strato superficiale di BV, una osteogenesi perimplantare sino alla formazione, nei provini a 4 mesi, di uno spesso strato di tessuto osseo inglobante il provino.

In particolare, l'osservazione dei preparati dei gruppi sperimentali a 1 e 2 mesi evidenzia la presenza di tessuto osseo intorno al provino e la graduale scomparsa dello strato di biovetro, indice dell'azione osteoconduttiva del materiale degradato.

Il tessuto osseo formatosi in assenza di carico meccanico si presenta organizzato in lamelle, disposte circolarmente intorno al provino, come nei sistemi circolarziali. Sono evidenziabili vasi e gli osteociti risultano ravvicinati. Le linee di marcatura, osservabili a luce U.V., sottolineano la neodeposizione del tessuto osseo.

Le osservazioni effettuate sui preparati a 4 mesi dall'impianto (Fig. 2) mostrano, sempre, la presenza di un manicotto di tessuto osseo attorno al provino.

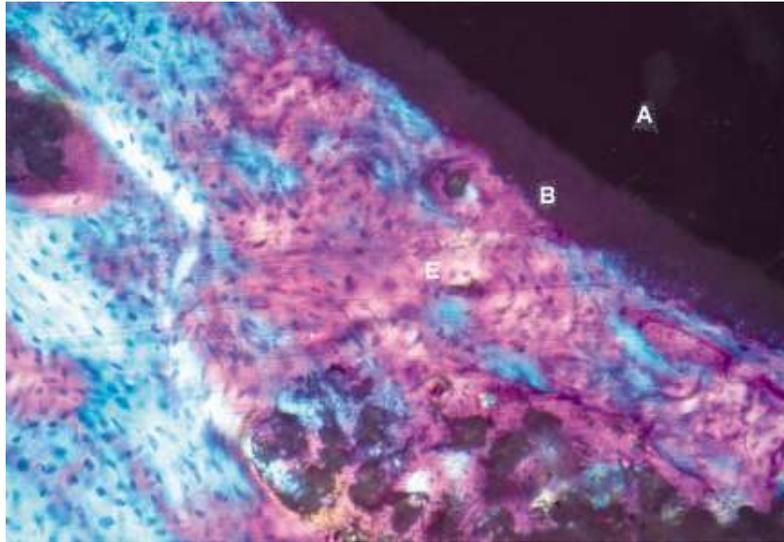


Fig. 2 - Osservazione al Microscopio ottico a luce polarizzata (Ingrandimento 10X). L'immagine evidenzia la scomparsa dello strato superficiale di rivestimento vetroso (Biovetro) e il conseguente contatto del tessuto osseo neoformato con lo strato di HA. Nel tessuto osseo compaiono le strutture osteoniche, che ne rimodellano la primitiva organizzazione in lamelle, disposte circolarmente attorno al provino. A= Metallo; B Idrossilapatite; E= Tessuto Osseo.

A questo tempo sperimentale si evidenzia la scomparsa dello strato superficiale di rivestimento vetroso (Biovetro) e il conseguente contatto del tessuto osseo neoformato con lo strato di HA.

La degradazione del materiale vetroso e la conseguente fine della cessione delle sostanze osteoconduttive non ha favorito una ulteriore deposizione del tessuto osseo perimplantare che si è ancorato al rivestimento di HA.

Il tessuto osseo appare organizzato anche in strutture osteoniche che compaiono all'interno della disposizione a lamelle, evidenziata nei quadri fino ai 2 mesi.

Nel tessuto osseo è dunque in atto un rimaneggiamento evidenziato dalla comparsa delle strutture osteoniche e dalle relative linee di marcatura.

Le analisi istologiche e le successive osservazioni evidenziano l'azione del doppio strato di rivestimento: il Biovetro, materiale degradabile, nel primo periodo, in cui occorre stimolare l'osteogenesi, induce la neodeposizione ossea; quindi l'HA, materiale non degradabile, fornisce un supporto che permette il mantenimento del contatto diretto tra osso neoformato e protesi.

Parole Chiave: Tessuto osseo, Idrossilapatite, Biovetro.

Key words: Bone tissue, Hidrossilapatite, Biovetro

RIASSUNTO - Gli autori riportano i risultati di una sperimentazione riguardante l'impianto, in femore di coniglio, di provini di titanio rivestiti, con la tecnica del plasma-spray, con un doppio strato di materiale: costituito da HA, a contatto col provino metallico, rivestita a sua volta da uno strato di Biovetro.

Le verifiche dei preparati per l'osservazione microscopica ottenuti da gruppi sperimentali a 1-2-4 mesi dall'impianto, permettono di evidenziare la progressiva degradazione sino alla sua scomparsa nel gruppo sperimentale a 4 mesi, del rivestimento più superficiale costituito da Biovetro e la contemporanea formazione già nei gruppi sperimentali a 2 mesi di uno spesso strato di tessuto osseo. Il permanere dello strato profondo di rivestimento in HA permette al tessuto osseo neoformato di legarsi direttamente all'impianto senza formazione di tessuto connettivo interposto.

SUMMARY - The authors report the results of experimentation concerning the implantation of titanium specimens in the femur of a rabbit which are coated with a double layer: Biovetro and Hidroxilapatite using the plasma spray technique.

Microscope observation obtained from experimental groups at 1, 2 and 4 months allow the progressive degradation to be highlighted. This degradation is evident up to the disappearance in the experimental group at 4 months of the top Biovetro coating and the simultaneous formation in the experimental group at 2 months of a thick layer of bone tissue. The permanence of the lower layer of HA coating allows the newly formed bone tissue to connect itself directly to the implant without the formation of connective tissue.

Si ringrazia la Biocoatings (Fornovo Taro (PR)) per la collaborazione fornita.

Bibliografia

1. Clark A.E., Hench L.L., Paschal H.A. (1976). The influence of surface chemistry on implant interface histology: A theoretical basis for implant materials selection. *J. Biomed. Mater. Res.*, 10, 161-174.
2. Gabbi C., Cacchioli A., Locardi B., Guadagnino E. (1993). Studio delle proprietà osteoconduttive di una idrossilapatite di sintesi da utilizzarsi come rivestimento per protesi. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria – Università di Parma*, 175-191.
3. Gabbi C., Cacchioli A., Locardi B., Guadagnino E. (1995). Bioactive glass coating: Physicochemical aspect and biological findings. *Biomaterials*, 16, 7, 515-520.
4. Gabbi C., Locardi B., Cacchioli A., Ragionieri L. (1996). Vetri bioattivi per applicazioni in chirurgia odontostomatologica. *Rivista Italiana di Chirurgia Orale*, 1, 5, 16-23.
5. Gabbi C., Locardi B., Russo G., Cacchioli A., Ragionieri L. (1996). Studio sperimentale su animali di una vite dentale rivestita di biovetro. *Rivista Italiana di Chirurgia Orale*, 1, 6, 26-33.
6. Hench L.L. (1991). Bioceramics: from concept to clinic. *Journal American Ceramics Society*, 74, 7, 1487-1510.
7. Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C., Greenlee T.K. (1972). Bonding mechanism at interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1, 117-141.
8. Matsuda T., Yamalichi K., Ito G. (1987). The influence of bioglass on the growth of fibroblast. *J. Biomed. Mater. Res.*, 21, 499-507.

EFFETTI DELLA IONIZZAZIONE DELL'ARIA SULLE PERFORMANCES DEL POLLO DA CARNE.

EFFECTS OF NEGATIVE AIR IONIZATION ON THE PERFORMANCES OF BROILERS.

Quarantelli A., Renzi M., Gandolfi L.⁽¹⁾

(1) Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma. Direttore: Prof. Alberto Bonomi.

Le ricerche sono state effettuate con il contributo finanziario del C.N.R.

Introduzione

La qualità dell'aria presente all'interno dei ricoveri figura, notoriamente, fra i fattori della produzione che possono condizionare più di altri le performances degli animali (Hayter e Besch, 1974). Nell'aria sono infatti disperse polveri, che originano dal mangime, dalla pelle, dalle piume, dalla lettiera e dalle feci (Dawson 1990) ma anche agenti causali di malattia quali batteri patogeni, spore di funghi appartenenti soprattutto ai generi *Aspergillus*, *Penicillus* e *Scopulariopsis* (Lovett et al., 1971, Dennis e Gee, 1973, Jand e Dhillon, 1973) e virus (Hopkins e Drury, 1971) che insieme concorrono alla creazione di condizioni ambientali non sempre rispondenti alle esigenze del benessere animale. Il sinergismo che si viene a creare fra la polvere e gli agenti patogeni favorisce la comparsa di sindromi morbose che trovano la loro massima espressione nelle ben note malattie respiratorie (Hilliger et al., 1984, Pedersen S. 1989). La riduzione del tenore di polvere dispersa nell'aria degli allevamenti è, pertanto, un obiettivo perseguito da tempo e affrontato con diversi metodi (Gastaldo e Samoggia 1992). Fra questi la ionizzazione negativa dell'aria sembra quello che lascia intravedere prospettive lusinghiere per la soluzione del problema. Realizzata artificialmente con apparecchi ad effetto punta sembra in grado di svolgere una sanificazione dell'aria mediante l'abbattimento della polvere e la inattivazione delle forme microbiche in essa presenti (Müller, 1969; Asaj, 1984; Estola et al. 1979; Bailey e Daniel, 1994). In sede di verifica di tali acquisizioni ci si è proposti di valutare se le performances di animali allevati, per tutto il ciclo di allevamento, in ambiente ionizzato possano essere condizionate favorevolmente dal trattamento.

Materiale e metodi

La sperimentazione è stata condotta in due pollai attigui perfettamente identici per forma, dimensioni e sistema di controllo delle condizioni microclimatiche, presenti in un allevamento avicolo sperimentale con sede in Baganzola (PR). Uno dei due pollai è stato ionizzato, a partire dal 1° giorno di allevamento, con apposito apparecchio "Ionizer 6000" composto di n. 8 emittenti ad effetto a punta, fissate ad una altezza di 210 cm da terra e distribuite uniformemente all'interno del medesimo.

L'apparecchiatura ci è stata cortesemente fornita dal Sig. Casellato Giustiniano - Fusignano Ravenna al quale va il nostro più sincero ringraziamento.

Nei pollai così differenziati sono state condotte due prove aventi la finalità di valutare l'effetto dell'aeroionizzazione sulle performance di animali accasati nelle seguenti condizioni di allevamento:

a. - senza "vuoto sanitario" (prima prova).

I ricoveri erano stati interessati dalla presenza di animali di età diverse per un periodo di 12 mesi.

b. - preceduto da "vuoto sanitario" (seconda prova).

I ricoveri erano stati sottoposti ad un periodo di "tutto vuoto" della durata di 60 giorni.

Per l'espletamento di ciascuna indagine sono stati utilizzati 1.100 pulcini maschi di ceppo Ross 308 allevati "a terra" per un periodo di 60 giorni, divisi in due gruppi: "controllo" ed "esperimento" di 550 soggetti ciascuno. I soggetti dei due gruppi hanno ricevuto lo stesso tipo di razione costituita da mangimi completi di 1° periodo (dal 1° al 20°), di 2° (dal 21° al 40° d) e di 3° (dal 41° al 60° d) la cui composizione è riportata nella tabella n. 1.

Nella tabella n. 2 sono raccolti i risultati dell'analisi chimica condotta sui mangimi di 1°, di 2° e di 3° periodo.

Tabella n. 1 – Composizione dei mangimi completi.

Periodi		1°	2°	3°
Farina di mais	Kg	58,00	61,00	63,30
Farina di estr. di soia (48% prot.)	“	26,00	24,35	23,50
Farina di estr. di girasole (42% prot.)	“	3,50	3,00	2,00
Glutine di mais giallo	“	1,80	2,50	3,50
Farina di aringhe	“	4,50	2,00	-----
Strutto	“	3,00	4,00	4,50
Fosfato bicalcico	“	1,50	1,50	1,50
Calcio carbonato	“	0,60	0,60	0,60
DL-metionina	“	0,22	0,17	0,16
Lisina	“	0,10	0,10	0,14
Cloruro di sodio	“	0,20	0,20	0,22
Colina cloruro	“	0,08	0,08	0,08
Complesso vit. e oligomin. (*)	“	0,50	0,50	0,50

(*) – Composizione del complesso vitaminico e oligominerale (per 1 kg): Vit. A: U.I. 2.000.000; Vit. D3: U.I. 600.000; Vit. B1: mg 400; Vit. B2: mg 2.000; Vit. B6: mg 1200; Vit. B12: mg 3; Vit. PP: mg 10.000; Ac. d - pantotenico mg 3.000; Vit. H: mg 30; Vit. E: mg 10.000; Vit. K: mg 600; Mn: mg 25.000; Fe mg 8.000; Cu mg 1.000; Zn: mg 20.000; I: mg 200; Co: mg 50; Se: mg 20; Monensin-sodio: mg 20.000. Supporto vegetale q.b. a g 1000.

Tabella n. 2 – Composizione chimica dei mangimi completi.

Periodi		1°	2°	3°
Umidità	%	12,28	12,50	12,38
Ceneri gregge	%	5,31	4,97	4,67
Proteina greggia	%	23,00	21,00	19,50
Grasso greggio	%	5,89	6,72	7,12
Fibra grezza	%	3,38	3,25	3,15
Estrattivi inazotati	%	50,14	51,56	53,18
Lisina	%	1,26	1,15	1,00
Metionina + cistina	%	0,97	0,85	0,80
Energia metabolizzabile	Kcal/kg	3090	3150	3200

Nel corso delle 2 prove sono stati effettuati i seguenti rilievi:

- a. - controllo giornaliero dello stato di salute degli animali;
- b. - verifica periodica della velocità di crescita e del consumo di alimenti;
- c. - controllo della resa di macellazione e valutazione delle carcasse alla spoltatura;
- d. - verifica del colore della cute dei tarsi;
- e. - determinazione del tasso di polveri disperse nell'aria dei ricoveri;

Campioni di aria sono stati prelevati contemporaneamente all'interno del pollaio di "controllo" e in quello di "esperimento". I prelievi sono stati effettuati al 20° e al 50° d del ciclo di allevamento, sia in occasione della prima prova sia della seconda, alla stessa ora del pomeriggio e previa inattivazione, per quattro ore, dei sistemi di ventilazione in dotazione a ciascun pollaio. Le polveri disperse nell'aria sono state raccolte su appositi filtri attraverso i quali sono stati fatti passare quantitativi noti di aria come previsto dal metodo UNICHIM n. 271 Ed. 1977. Le sonde di prelievamento dell'aria sono state posizionate ad una altezza di 65 e 170 cm dalla superficie della lettiera.

f. - determinazione della micoflora dispersa nell'aria dei ricoveri.

L'indagine è stata effettuata adottando le metodologie descritte da Pinello e Coll. 1977, fatta eccezione per il terreno di coltura delle muffe. E' stato infatti utilizzato il terreno Rose-bengal chloramphenical Agar nel quale il cloramfenicol ha avuto la funzione di inibire la crescita di batteri e/o forme sporigene diverse dai miceti.

Risultati e discussione

A - Lo stato di salute.

Lo stato di salute degli effettivi dei due gruppi, valutato nell'ambito di ciascuna prova, si è sempre mantenuto buono senza mostrare deviazione dalla norma anche se il gruppo trattato, sia nella prima sia nella seconda prova, ha sempre evidenziato un piumaggio più lucido, bargigli più intensamente colorati e la completa assenza di sintomi riferibili a patologie respiratorie. Nonostante ciò, l'indice di mortalità non ha evidenziato differenze di rilievo dal confronto fra gli animali di esperimento e quelli di controllo (tabella n. 3). Al termine della prima prova è stato registrato un tasso di mortalità totale pari al 7,09% e al 6,18% rispettivamente per i soggetti di controllo e per quelli trattati, mentre al termine della seconda la percentuale dei decessi è risultata pari, nell'ordine, al 6,36% e al 6,18%.

Tabella n. 3 – Parametri produttivi.

PROVE		1° PROVA		2° PROVA	
GRUPPI		A	B	A	B
Primo periodo					
Soggetti	n.	550	550	550	550
P.V. medio a 20 d	g	621,22a±49,2	689,01b±50,4	627,00±47,9	630,84±52,5
Indice di conv. 1-20 d	kg	1,452	1,445	1,415	1,400
Mortalità 1-20 d	%	1,09	1,27	2,18	2,54
Secondo periodo					
Soggetti	n.	544	543	538	536
P.V. medio a 40 d	g	1998,57a±151,2	2168,71b±149,5	2218,01±152,4	2249,19±154,9
Indice di conv. 21-40 d	kg	1,975	1,941	1,895	1,880
Mortalità 21-40 d	%	2,76	2,21	2,23	2,05
Terzo periodo					
Soggetti	n.	529	531	526	525
P.V. medio a 60 d	g	3390,27a±231,6	3544,52b±236,1	3419,08a±248,3	3514,13b±243,7
Indice di conv. 41-60 d	kg	2,539	2,528	2,471	2,448
Indice di conv. 1-60 d	kg	2,053	2,037	1,989	1,965
Mortalità 41-60 d	%	3,40	2,82	2,08	1,71
Mortalità 1-60 d	%	7,09	6,18	6,36	6,18

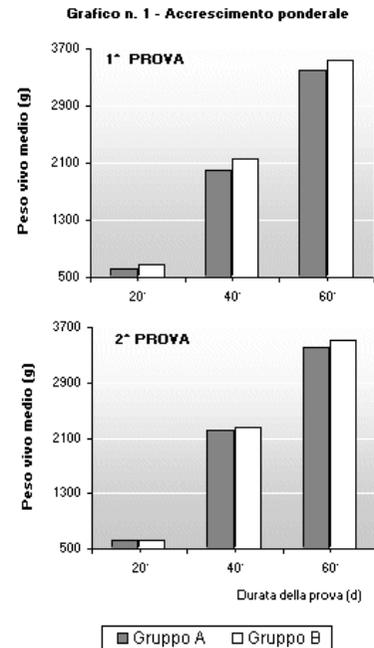
A = gruppo "controllo"; B = gruppo "esperimento"

a, b diversi per P<0,05

B - L'incremento ponderale ed il consumo di alimenti.

Tutti gli animali sono stati pesati individualmente al 20°, al 40° e al 60° d.

Nella tabella n. 3 (v. anche grafico) sono riportati i risultati emersi dall'elaborazione matematico-statistica, condotta sui dati primitivi registrati nel corso delle due prove. Dall'esame della tabella si evince che gli animali allevati in ambiente ionizzato, a partire dal primo giorno di vita, hanno risposto positivamente al trattamento ma in modo diverso nell'ambito di ciascuna prova:



a) - al 20° giorno di età.

Prima prova: i soggetti del gruppo esperimento si sono significativamente differenziati rispetto a quelli di controllo ($P < 0,05$) per una velocità di crescita più elevata (+10,91%).

Seconda prova: l'effetto della ionizzazione negativa dell'aria è risultato ininfluente ($P > 0,05$) sull'accrescimento ponderale dei soggetti trattati rispetto a quelli di controllo.

b) - al 40° giorno di età.

Prima prova: l'esposizione degli animali alla ionizzazione negativa dell'aria, pur riducendo la sua efficacia, ha fatto sì che anche nella seconda parte del ciclo gli animali di esperimento potessero differenziarsi da quelli di controllo ($P < 0,05$) per un più elevato tasso di crescita (+8,51%).

Seconda prova: analogamente a quanto è stato registrato nella prima parte della ricerca gli animali interessati dalla ionizzazione negativa non hanno avuto vantaggi significativi rispetto a quelli non trattati ($P > 0,05$).

c) - al 60° giorno di età.

Prima prova: alla fine del ciclo di allevamento il ruolo delle ionizzazione sulle performances produttive sembra meno efficiente tuttavia il gruppo trattato si avvantaggia significativamente ($P < 0,05$) sul gruppo controllo in ragione del 4,55%.

Seconda prova: i soggetti interessati dal trattamento di ionizzazione, alla fine della sperimentazione, sono stati favorevolmente condizionati ($P < 0,05$) dalle condizioni microclimatiche create dal medesimo e, in funzione di ciò, hanno migliorato le loro performances superando i controlli in ragione del 2,78%.

Nella tabella n. 3 sono annotati anche gli indici di conversione dell'alimento. In base ad essi è possibile rilevare che nel corso delle due sperimentazioni i polli allevati in ambienti interessati dalla ionizzazione negativa dell'aria, non hanno denunciato indici di conversione sostanzialmente diversi da quelli degli animali di controllo. Detti valori sono infatti rimasti nell'ambito di quelli previsti per il ceppo di appartenenza

degli animali.

C - Il controllo delle rese di macellazione e la valutazione delle carcasse alla spolpatura.

Al termine della prova 10 soggetti, scelti a caso nell'ambito di ciascun gruppo e lasciati a digiuno per 12 ore, sono stati sacrificati mediante dissanguamento e quindi privati delle penne e dell'intestino. Sulle carcasse c.d. "a pollo sfilato", previo raffreddamento alla temperatura di 4° C, si è proceduto al controllo della resa in carcassa, carne di petto, cosce e fuselli, ali, grasso addominale, cute e tessuto sottocutaneo, ossa di scheletratura, testa e collo, zampe, ventriglio, fegato e cuore.

I dati raccolti a seguito delle indagini effettuate ed elaborati mediante analisi matematico-statistica sono annotati nella tabella n. 4. Dall'esame della medesima tabella si evince che, fatta eccezione per il peso vivo medio di macellazione, per il quale le differenze rispecchiano i pesi vivi medi dei gruppi di appartenenza, nessuna differenza di rilievo ($P > 0,05$) è emersa, sia per la prima sia per la seconda prova, dal confronto fra le rese di macellazione degli animali di controllo e quelli di esperimento.

Tabella n. 4 – Rilievi di macellazione a freddo e colore della cute dei tarsi (valori medi \pm DS).

PROVE	GRUPPI	1° PROVA		2° PROVA	
		A	B	A	B
P.V. di macellazione	g	3383,25 ^a \pm 229,5	3524,30 ^b \pm 240,1	3415,08 ^a \pm 257,8	3509,42 ^b \pm 248,5
Resa in pollo sfilato (p.s.)	% p.v.	85,29 \pm 2,16	86,07 \pm 1,95	85,71 \pm 2,07	85,99 \pm 1,78
Carne di petto	% p.s.	18,72 \pm 1,15	19,14 \pm 1,18	18,82 \pm 0,96	19,11 \pm 1,07
Cosce e fuselli	" "	27,30 \pm 0,61	27,42 \pm 0,67	27,71 \pm 0,51	28,00 \pm 0,53
Ali	" "	10,42 \pm 0,59	10,34 \pm 0,64	10,58 \pm 0,61	10,20 \pm 0,63
Grasso addominale	" "	2,40 \pm 0,48	2,54 \pm 0,52	2,77 \pm 0,43	2,59 \pm 0,44
Cute e tessuto sottocutaneo	" "	8,50 \pm 0,76	7,43 \pm 0,81	8,25 \pm 0,69	7,88 \pm 0,73
Ossa di scheletratura	" "	14,23 \pm 1,18	14,93 \pm 1,23	14,40 \pm 1,31	14,41 \pm 1,27
Testa e collo	" "	7,04 \pm 0,47	7,18 \pm 0,45	6,94 \pm 0,40	7,09 \pm 0,38
Zampe	" "	4,75 \pm 0,21	4,70 \pm 0,19	4,09 \pm 0,24	4,49 \pm 0,16
Ventriglio	" "	2,27 \pm 0,14	2,24 \pm 0,11	2,19 \pm 0,18	2,22 \pm 0,15
Fegato e cuore	" "	4,37 \pm 0,27	4,08 \pm 0,31	4,25 \pm 0,35	4,01 \pm 0,29
Colore della cute dei tarsi					
	L*	75,28 \pm 10,25	76,20 \pm 11,37	74,34 \pm 12,85	74,74 \pm 10,57
	a*	+1,49 \pm 2,08	+2,55 \pm 2,45	+3,31 \pm 2,33	+1,22 \pm 2,27
	b*	+63,01 \pm 16,80	+63,21 \pm 23,05	+62,92 \pm 18,57	+63,59 \pm 20,43

A = gruppo "controllo"; B = gruppo "esperimento"

a, b diversi per $P < 0,05$

D - Valutazione del colore della cute dei tarsi.

Il colore della cute dei tarsi è stata effettuata mediante colorimetro Minolta Chroma Meters CR 300 prima che i medesimi fossero staccati dall'articolazione tarsometatarsica degli animali sacrificati per la determinazione delle rese di macellazione. Dai dati raccolti nella tabella n. 4 la colorazione gialla non è stata in nessun caso condizionata, positivamente o negativamente, dalla ionizzazione negativa dell'aria.

E - Determinazione del tenore di polveri disperse nell'aria dei ricoveri.

Le risultanze ottenute a seguito delle misurazioni effettuate, raccolte nella tabella n. 5 ci consentono di rilevare che la quantità delle polveri disperse nell'aria è apparsa diversamente distribuita fra i due ricoveri utilizzati, per effetto del trattamento di ionizzazione e a seguito delle differenze che si sono venute a creare fra i due cicli di allevamento effettuati.

Tabella n. 5 – Concentrazione delle polveri all'interno dei ricoveri valutata a due diverse altezze dalla lettiera.

	PROVE		1° PROVA	2° PROVA		
	GRUPPI		A	B	A	B
	a cm 65	mg/m ³	1,05	0,47	0,93	0,32
a 20 d						
	a cm 170	mg/m ³	0,61	2,40	0,48	2,15
	a cm 65	mg/m ³	1,65	0,66	1,32	0,55
a 50 d						
	a cm 170	mg/m ³	0,87	2,94	0,73	2,78

A = gruppo "controllo"; **B** = gruppo "esperimento"

Prima prova: al 20° d il livello di inquinamento registrato nel pollaio sottoposto a ionizzazione, all'altezza di 65 cm dalla lettiera, è risultato di inferiore (- 44,76%) rispetto a quello di controllo, mentre all'altezza di 170 cm la concentrazione del pulviscolo disperso nel pollaio ionizzato ha superato di gran lunga quella del ricovero di paragone (+393,44%).

Al 50° d la distribuzione delle particelle di polvere nel pollaio ionizzato e in quello di controllo ha assunto un andamento che, in linea di massima, rispecchia quella individuata per i medesimi ricoveri al 20° d.

Seconda prova: a seguito di un periodo di "tutto vuoto" di 60 d, il livello di inquinamento dell'aria, individuato nelle summenzionate strutture, è risultato leggermente inferiore rispetto a quello registrato nel corso della prima indagine. La distribuzione del pulviscolo, all'interno del pollaio ionizzato e in quello di riferimento, ha avuto tuttavia un comportamento del tutto simile a quello verificato nel corso della prima esperienza sia con riferimento ai rilievi effettuati al 20° d (- 40% a 65 cm e + 447,91% a 170 cm) sia a quelli effettuati al 50° d (- 41,66% a 65 cm e + 380,82% a 170 cm).

Le modificazioni indotte con la ionizzazione negativa dell'aria, nella distribuzione delle polveri presenti all'interno del pollaio trattato, sono da attribuire all'effetto calamita e/o polarizzante che la ionizzazione stessa esercita sulle particelle aerodisperse con un meccanismo simile a quello indicato nella figura n. 1 e che ha trovato conferma nelle immagini ottenute al 18 d (foto a e b), al 40° d (foto c) e al 60° d (foto d).

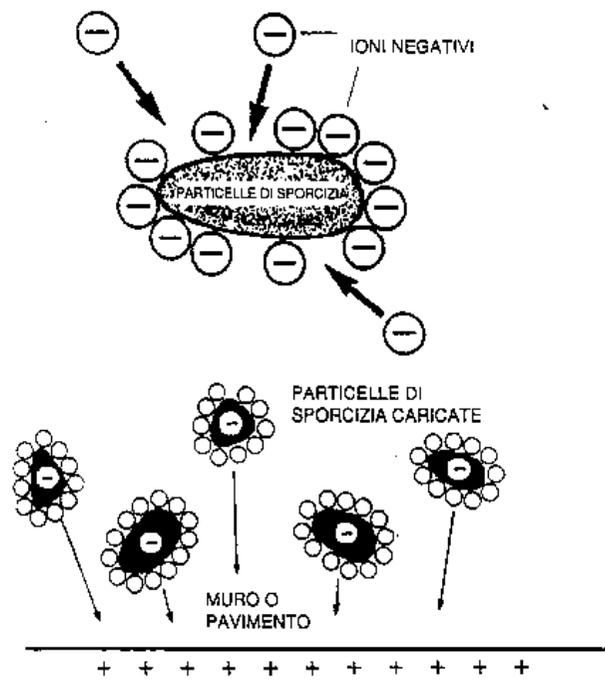


Fig. 1. Precipitazione di particelle di polvere provocata dai neg-ioni.



Foto a (18° d).



Foto b (18° d).





Foto c (40° d).

Foto d (60° d).

F - Determinazione della micoflora dispersa nell'aria dei ricoveri.

Nella tabella n. 6 sono raccolti i risultati emersi a seguito di una valutazione condotta solo al 50° d della prima e della seconda ricerca. Dal suo esame si evince che la ionizzazione negativa dell'aria, oltre che ridurre in prossimità degli animali (65 cm dalla lettiera) la quantità di pulviscolo, ha fatto sì che i polli trattati potessero usufruire di aria interessata anche da un quantitativo di miceti inferiore rispetto a quelli di controllo. Le differenze, in termini di U.F.C./mg di polvere, sono infatti risultate pari a - 75% per la prima prova e a - 66% per la seconda.

Tabella n. 6 – Presenza di muffe all'interno dei ricoveri a due diverse altezze dalla lettiera.

PROVE			1° PROVA		2° PROVA	
GRUPPI			A	B	A	B
a 50 d	a cm 65	UFC/mg	980	250	1350	850
	a cm 170	UFC/mg	1670	3700	1850	4400

A = gruppo "controllo"; B = gruppo "esperimento"

La ionizzazione negativa, mediante la sua azione polarizzante, ha attirato verso l'alto anche la micoflora dispersa nell'aria con un andamento pressoché sovrapponibile nel corso delle due prove. In funzione di tale effetto, all'altezza di 170 cm dalla lettiera, la concentrazione dei miceti presenti nel pulviscolo del pollaio trattato ha superato di gran lunga (+ 55%) quella contenuta nel particellato reperito nel pollaio di controllo (1670 e 1850 U.F.C./mg risp. per il primo e il secondo ciclo).

Conclusioni

Le risultanze emerse dalle nostre indagini autorizzano la formulazione delle seguenti considerazioni e conclusioni:

- 1) - la ionizzazione negativa dell'aria ha consentito agli animali trattati di differenziarsi da quelli di controllo, sia nell'ambito della prima prova sia della seconda, per una più elevata qualità del piumaggio e una più intensa colorazione rossa dei bargigli pur senza tuttavia creare modificazioni significative sul tasso di mortalità fra i gruppi controllo ed esperimento e fra le due sperimentazioni effettuate.
- 2) - gli animali allevati in ambiente ionizzato hanno risposto positivamente al trattamento ma con modalità diverse nel corso delle due prove. Durante la prima i soggetti del gruppo "esperimento" si sono significativamente differenziati ($P < 0,05$) rispetto a quelli di "controllo" per la velocità di crescita. Tale differenza è risultata pari al 10,91% al 20° giorno, all'8,51% al 40° e al 4,55% alla fine del ciclo (60° d). Nel corso della seconda l'effetto della ionizzazione negativa dell'aria sulla velocità di crescita è apparso irrilevante nella prima fase del ciclo (+0,61% al 20° d e +1,40% al 40° d) mentre alla fine (60° d) i soggetti trattati, rispetto a quelli di controllo, si sono avvantaggiati in misura pari al 2,78% ($P < 0,05$).
- 3) - accanto ad una più elevata velocità di crescita non è stato tuttavia rilevato alcun miglioramento per l'utilizzazione dell'alimento e nessuna influenza positiva o negativa sulle rese di macellazione e sul grado di

pigmentazione della cute dei tarsi.

4) - la distribuzione quantitativa delle polveri aerodisperse è stata modificata dal trattamento. Nel pollaio sottoposto a ionizzazione, sia nel corso della prima prova sia della seconda, è stata riscontrata una minor concentrazione di polvere in prossimità degli animali (a 65 cm dalla lettiera) e quantitativi più elevati all'altezza di 170 cm dalla lettiera, vale a dire nelle immediate vicinanze delle sorgenti degli ioni negativi. A seguito del periodo di "tutto vuoto" la quantità di pulviscolo aerodisperso che è stato reperito nel corso della seconda prova è risultato leggermente inferiore rispetto a quello raccolto nel corso della prima.

5) - i soggetti sottoposti al trattamento di ionizzazione, oltre ad essere interessati da tenori di polvere inferiori rispetto a quelli di controllo sono venuti a contatto anche con un minor quantitativo di muffe. Nel pollaio trattato è stato infatti registrato una minore presenza di miceti (-75% per la prima prova e -66% per la seconda).

A conclusione possiamo affermare che la ionizzazione negativa dell'aria dei ricoveri per polli da carne ha consentito di migliorare significativamente ($P < 0,05$) la velocità di crescita degli animali sottoposti al trattamento. L'effetto della ionizzazione dell'aria si è rivelato positivo sull'accrescimento dei polli sia quando i ricoveri erano interessati da alti livelli di inquinamento microbico (1° prova) sia quando gli stessi ricoveri erano stati opportunamente sanificati a seguito di un periodo di "vuoto sanitario" (2° prova). Tale risultato riteniamo sia da attribuire all'azione degli ioni negativi emessi nell'ambiente, i quali, favorendo la segregazione nonché l'allontanamento della polvere e della microflora dagli animali, hanno fatto sì che quelli allevati fin dai primi giorni di vita in ambiente inquinato (prima prova) abbiano tratto un sensibile giovamento a partire dall'inizio del ciclo di allevamento mentre quelli accasati in ambiente "sanificato" (seconda prova) hanno tratto vantaggio dal trattamento solo nell'ultima fase della crescita (dal 40° al 60° giorno) allorché la microflora ambientale ha raggiunto livelli tali da recare nocimento allo stato di salute degli animali.

In accordo con quanto affermato da altri ricercatori (Gastaldo A. e Samoggia G. 1992) l'igiene ambientale è indubbiamente uno dei fattori in grado di svolgere un ruolo di primo piano sull'insorgenza, negli animali, di sindromi che possono interessare sia l'apparato respiratorio sia quello digerente. Da quanto scaturito anche dalle nostre ricerche abbiamo motivo di credere che il sinergismo che si viene a creare fra tali sindromi può risultare determinante nella estrinsecazione delle attitudini produttive del pollo da carne.

La ionizzazione negativa dell'aria crediamo pertanto che possa rientrare a pieno titolo in questa tematica e, per tale motivo, riteniamo che siano necessarie ulteriori conferme sperimentali.

Parole chiave: ricoveri per polli da carne, ionizzazione negativa dell'aria, qualità dell'aria, polvere e microflora aerodisperse, performances e benessere dei polli da carne.

Key words: broiler house, air negativ ionization, air quality, dust and mycoflora airborne, performances and welfare of broilers.

RIASSUNTO - Sono state istituite due prove allo scopo di valutare se la ionizzazione negativa dell'aria, realizzata con appositi apparecchi ad effetto a punta, fosse in grado di migliorare le performances di broilers allevati in differenti condizioni ambientali, vale a dire, in stalli caratterizzati da elevato inquinamento da polveri, muffe ed altri microrganismi patogeni (1° prova) e da basso inquinamento (2° prova). Ciascuna sperimentazione ha interessato 1100 pulcini maschi di ceppo Ross allevati su lettiera per un periodo di 60 giorni, divisi in due gruppi di 550 soggetti ciascuno, albergati in stalli attigui perfettamente identici per forma, dimensioni e sistema di termoregolazione ma diversificati per la presenza dell'impianto di ionizzazione. Mediante l'abbattimento della polvere e l'inattivazione della microflora patogena sospesa nell'aria la ionizzazione, in entrambe le prove, ha condizionato favorevolmente lo stato di salute dei soggetti ed ha stimolato nei medesimi una più elevata velocità di crescita. Gli animali di esperimento sono infatti avvantaggiati rispetto a quelli di controllo in ragione del 4,55% per la prima prova e del 2,78% per la seconda. Nessuna variazione di rilievo è stata invece registrata per l'indice di conversione, per le rese di macellazione e la pigmentazione della cute dei tarsi.

SUMMARY - Two trials were carried out to evaluate if negative air ionisation (done with specific apparatus) was able to improve the performances of broilers raised in different conditions, that is, in stalls with a high pollution level due to dust, mould and other pathogenic micro-organisms (first test) and in stalls with a low level (second test). Each experiment involved 1100 Ross strain male chicks raised on the litter for a 60 day period, divided in 2 groups of 550 each, kept in adjacent stalls exactly alike for shape, dimensions and heating systems, but different for the presence or absence of ionisation apparatus. The ionisation, in both tests, favourably conditioned the health of the chicks and stimulated a higher growth rate by lowering the dust and inactivating the pathogenic microflora suspended in the air. The experimental groups were at an advantage compared to the control groups: 4.55% for the first test and 2.78% for the second. Instead, there was no variation, between the groups and for both test, for the feed efficiency or for the dressing percentage.

SOMMAIRE - Deux épreuves ont été effectuées pour évaluer si la ionisation négative d'air (faite avec l'appareil spécifique) pouvait améliorer les performances des volailles de chair dans différentes conditions, c-à-d., dans les stalles avec un niveau élevé de pollution dû à la poussière, à les moisures et à d'autres micro-organismes pathogènes (premier essai) et dans les stalles avec un niveau bas (deuxième essai). Chaque expérience a impliqué les poussins 1100 mâles de lignée Ross élevés sur la litière pendant une période de 60 jours, divisée dans 2 groupes de 550, maintenus dans les stalles adjacentes exactement semblables pour la forme, les dimensions et les systèmes de chauffage, mais différents pour la présence ou l'absence de l'appareil de ionisation. La ionisation, dans les deux essais, a favorablement conditionné la santé des poussins et a stimulé une cadence de croissance plus élevée en abaissant la poussière et en inactivant la flore microbienne pathogène suspendue dans l'air. Les groupes expérimentaux étaient à un avantage comparé aux groupes de témoin: 4,55% pour le premier essai et 2,78% pour le seconde. Au lieu de cela, il n'y avait aucune variation pour l'efficacité d'alimentation, pour le rendement d'abattage et pour la pigmentation de la tégument des tarses.

Nota: Il piano, l'esecuzione delle indagini e le conclusioni spettano in parti uguali agli AA. (Il Direttore: Prof. Alberto Bonomi).

Bibliografia

- Asaj A., (1984) - Staubentstehung und Staubgehalt in Stallungen, DVG, Dust in animal house, Symposium der "International Society of Animal Hygiene", Hannover: 16-19.
- Bailey W.M. and King D.J. (1994) - Effect of Negative Air Ionization on Airborne Transmission of Newcastle Disease Virus. Avian Diseases, 38, 725-732.
- Dawson J.R. (1990.) - Minimizing dust in livestock buildings: possible alternatives to mechanical separation. J. Agric. Engin. Res., 47, 235-248.
- Dennis G. and Gee J. (1973) - The microbial flora of broiler house litter and dust. J. Gen. Microbiol., 78, 101-107.
- Estola T., Makela P. and Hovi T. (1979) - The effect of air ionization on the air-borne transmission of experimental Newcastle disease virus infections in chickens. J. Hyg., 83, 59-67.
- Gastaldo A. e Samoggia G. (1992) - Gas nocivi e polveri non giovano al pollo. Rivista di Avicoltura, 62, n. 9, 29-35.
- Hayter R.B. and Besch E.L. (1974) - Airborne-particle deposition in the respiratory tract of chickens. Poultry Sci., 53, 1507-1511.
- Hilliger H.G., Aengst C. und Jellen E. (1984) - Gravimetrische staubmessung in schweine und Hühnerställen, in "Dust in animal houses". DVG, Simposium der "International Society of Animal Hygiene" Hannover, 38-43.
- Hopkins S.R. and Drury L. N. (1971) - Efficacy of air filters in preventing transmission of Newcastle disease. Avian Diseases, 15, 596-603.
- Jand S.K. and Dhillon S.S. (1973) - Fungi associated with respiratory diseases of poultry. Indian Vet. J., 50, 746-751.

- Lovett J. L., Messer and Read R.B. Jr. (1971) - The microflora of southern Ohio poultry litter. Poultry Sci., 50, 746-751.
- Müller W. (1969) - Untersuchungen über die mögliche Beeinflussung des Keimgehaltes der Stallluft durch Ionisation. Wien. tierärztl. Mschr., 56, 150-152.
- Pedersen S. (1989) - "Dust and gases in livestock buildings". Agricultural Engineering - vol. 2 Agricultural Buildings, Dodd V.A. e Grace P.M., 1489-1494.
- Pinello C.B., Richard J.L. and Tiffany L.H. (1977) - Microflora of a turkey confinement brooder house. Poultry Sci., 56, 1920-1926.

EFFETTO DEL TIPO GENETICO SULLE PRESTAZIONI PRODUTTIVE DI VITELLI IN SVEZZAMENTO¹

Sabbioni A.^{2,3}, Superchi P.², Sussi C.², Frison A.², Bonomi A.²

¹Ricerche effettuate con finanziamento M.U.R.S.T. (Università di Parma, fondi locali per la ricerca; titolare Prof. A.Sabbioni).

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

³Per corrispondenza (Corresponding Author): sabbioni@unipr.it

Introduzione

E' noto che nel nostro Paese l'allevamento bovino da latte è basato principalmente sull'impiego della razza Frisona Italiana, nella quale il massiccio ricorso a riproduttori di provenienza nord americana (USA e Canada) ha determinato, da un lato, un notevole incremento della produzione latte e, dall'altro, un considerevole peggioramento delle caratteristiche delle carcasse, soprattutto dal punto di vista della conformazione. Ciò trova conferma anche dall'esame della situazione riscontrabile in altri Paesi europei, nei quali si è assistito alla graduale introduzione di soggetti appartenenti ai ceppi nord americani della Frisona (Homer et al., 1997).

Considerando che circa 1/3 della carne prodotta deriva da animali di razze da latte, è facile dedurre che il fenomeno non è marginale, ma interessa in pratica tutti i soggetti della filiera carni, dagli allevatori ai consumatori. Questi ultimi richiedono una carne tenera e saporita, ma con un basso tenore lipidico. Anche se non vi sono dati certi che confermino con chiarezza le relazioni intercorrenti fra contenuto in grasso della carcassa e qualità della carne, tuttavia sembra evidente che la tendenza verso carcasse di qualità inferiore dal punto di vista della conformazione, associata con le variazioni razziali sopra accennate, si traduca in un peggioramento della stessa.

Armbruster et al. (1983) suggeriscono che la marezatura (grasso intramuscolare) della carne contribuisca poco alla qualità della stessa. Dikeman (1987) quantifica tale contributo in un 10-15% della variazione dell'appetibilità. Dikeman et al. (1979) e Buchter (1986) ritengono però che, a bassi livelli di grasso intramuscolare, la tenerezza e la succulenza della carne siano meno soddisfacenti che ad alti livelli e che esista un limite al di sotto del quale l'adiposità non possa essere ridotta, se non a discapito della qualità della carne.

E' evidente che la razza è un fattore che influenza la quota di grasso di marezatura in rapporto al grasso di copertura (Johnson, 1987; Cundiff et al., 1994) e quindi le qualità organolettiche della carne.

E' però altrettanto evidente che la razza agisce anche a monte di queste problematiche, interferendo con le performance degli animali in tutti i periodi della loro vita (peso alla nascita, allo svezzamento, a fine ciclo).

Data l'elevata proporzione di animali di razze da latte coinvolti nella produzione della carne, il sistema più efficace per migliorare la qualità e la quantità di carne prodotta sembra risiedere nella sistematica applicazione dell'incrocio fra tori di razze da carne e bovine di razze da latte eccedenti la quota di rimonta (Bittante e Gallo, 1990).

Una ulteriore giustificazione all'applicazione di tale pratica sta nella integrazione del reddito dell'allevatore, dovuta al maggior prezzo di mercato dei soggetti incrociati rispetto a quelli di razze da latte (Sabbioni et al., 1994). A questo proposito, al fine di massimizzare il valore dei vitelli da macello, è di fondamentale importanza la scelta della razza paterna, per la quale è necessario tenere conto della possibilità di insorgenza di problemi al parto.

L'orientamento attuale è quello di rivolgersi:

- a) a razze caratterizzate da ipertrofia muscolare (Piemontese, Bianco Blu Belga), a patto di impiegare riproduttori valutati geneticamente per il carattere "peso dei figli alla nascita";
- b) a razze caratterizzate da buone prospettive produttive nella fase di ingrasso (Limousine, Charollaise);
- c) a razze interessate da una buona resistenza e rusticità (linea carne della Pezzata Rossa Italiana).

Nel primo caso si intende sfruttare l'effetto del gene maggiore responsabile della ipertrofia muscolare (mh/mh), il quale, negli eterozigoti (mh/+) presenta un certo grado di codominanza e determina un fenotipo intermedio, benché maggiormente somigliante al fenotipo normale (+/+) (Hanset e Michaux, 1985).

Nel secondo e nel terzo caso l'obiettivo è l'ottenimento di buone performance di allevamento e di carcasse pesanti o medio-pesanti, partendo da animali con costi iniziali meno alti dei primi.

Nell'ottica di un approfondimento delle conoscenze relative alla attuazione di schemi di incrocio sempre più rispondenti alle aspettative degli allevatori, vengono riportati nel presente lavoro i risultati di una sperimentazione, condotta presso un allevamento commerciale, relativa alle performance di vitelli incrociati, durante una fase molto delicata, ma spesso scarsamente considerata, quale quella dello svezzamento.

La letteratura consultata è infatti ricca di notizie circa gli effetti positivi della tecnica dell'incrocio a due vie sulle performance di allevamento dei vitelloni, mentre alcuni avanzano dei dubbi circa l'efficacia della tecnica nelle fasi iniziali della vita dei soggetti, per il fatto che le stesse sono fortemente dipendenti dalle condizioni ambientali durante la gravidanza e, nel caso di allattamento naturale, dalla produzione latte della madre. Scopo della presente ricerca è stato quindi quello di indagare sui principali parametri di allevamento durante la fase di svezzamento di vitelli meticcii, al fine di mettere in evidenza le combinazioni genetiche che meglio si adattano a sistemi di allevamento caratteristici dell'Italia settentrionale.

Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta presso un allevamento della provincia di Padova, utilizzando 54 vitelli maschi dell'età di circa 30 d, allevati, nel corso di due prove distinte (1^a prova dal 23/12 al 17/03; 2^a prova dal 18/03 al 07/06), caratterizzate da condizioni climatiche diverse (1^a prova: inverno; 2^a prova: primavera), in box contigui su lettiera permanente, all'interno di un capannone con ventilazione forzata ma senza regolazione della temperatura.

Gli animali appartenevano a tre incroci, ottenuti utilizzando, su bovine di razza Frisona Italiana, tori di razza Bianco Blu Belga (incroci BF), Limousine (incroci LF) e Pezzata Rossa Italiana (incroci PRF). La prima prova ha interessato 10 vitelli BF, 9 LF e 5 PRF, la seconda 11 BF, 10 LF e 9 PRF.

Ciascuna prova ha avuto una durata massima di 12 settimane: tuttavia, per ciascun vitello, la fine dello svezzamento è stata decisa dal tecnico, sulla base della conformazione dell'animale e della capacità di ingerire alimenti extra-lattei in quantità adeguata (2,0 kg/d di s.s.).

Gli alimenti erano rappresentati da latte ricostituito, fornito alla concentrazione del 10% seguendo il piano alimentare raffigurato nel grafico n.1, oltre a fieno di prato stabile, mangime complementare del commercio e granella di mais offerti *ad libitum*. Quest'ultima è stata messa a disposizione a partire dalla 7ª settimana in entrambe le prove. Le variazioni del piano alimentare relativamente al latte ricostituito erano effettuate settimanalmente.

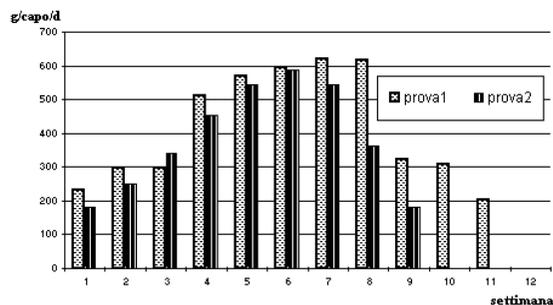


Grafico n.1 - Piano alimentare relativo al latte ricostituito

Giornalmente è stato calcolato il consumo di alimento per box, mentre settimanalmente sono stati effettuati campionamenti dei diversi alimenti che, raccolti ciascuno in un unico pool, sono serviti per l'analisi della composizione chimica (ASPA, 1980). La tabella n.1 riporta i risultati delle analisi condotte sugli alimenti.

Tabella n.1 - Composizione chimica degli alimenti.

		Fieno di prato stabile	Mangime complementare (*)	Farina di mais	Latte ricostituito (**)
1ª prova					
Umidità	%	15.97	12.00	11.61	5.00
Ceneri	%	7.19	7.04	1.33	6.00
Protidi grezzi	%	6.16	16.72	8.21	23.00
Lipidi grezzi	%	1.39	2.64	3.76	17.00
Fibra grezza	%	25.56	5.28	2.04	1.00
Estrattivi inaz.	%	43.73	56.32	73.05	48.00
UFC	/100 kg	55.09	94.73	110.58	132.66
2ª prova					
Umidità	%	15.96	12.58	8.74	5.00
Ceneri	%	7.88	7.52	1.32	10.00
Protidi grezzi	%	7.09	17.03	9.01	21.00
Lipidi grezzi	%	1.34	3.12	3.53	18.00
Fibra grezza	%	22.55	5.10	1.90	0.50
Estrattivi inaz.	%	45.18	54.65	75.50	45.50
UFC	/100 kg	59.93	94.41	114.29	129.85

(*) Componenti: 1ª prova: farina di mais; farina d'orzo; farina di estrazione di soia; crusca di grano tenero; melasso di bietola; integratore minerale, vitaminico e oligominerale. 2ª prova: farina di mais; farina di orzo; farina di estrazione di soia; crusca di grano tenero; melasso di canna; integratore minerale, vitaminico e oligominerale.

(**) Componenti: 1ª prova: siero di latte in polvere spray; grassi animali e vegetali raffinati e stabilizzati; farina di orzo; concentrato proteico di soia; caseina polvere; proteine di patate; idrolisati proteici; estratto di polpa di caruba; destrosio; integratore minerale, vitaminico e oligominerale, BHT. 2ª prova: siero di latte in polvere; concentrato di siero di latte; concentrato di soia idrolizzato; grassi animali e vegetali raffinati e stabilizzati; lecitina di soia; amido di mais; farina di frumento pregelatinizzato; BHT.

Gli animali sono stati pesati all'inizio e alla fine della fase di allevamento. In tali momenti si è provveduto inoltre alla effettuazione di alcune misurazioni somatiche (altezza al garrese, altezza del torace, circonferenza toracica, lunghezza del tronco, circonferenza dello stinco), secondo le indicazioni di Meregalli (1980), ricorrendo all'impiego del bastone di Lydlin e del nastro centimetrato. Sulla base di tali misurazioni sono stati quindi valutati i seguenti indici zoometrici (Magliano, 1950; Falaschini e coll., 1993):

- indice di anamorfoosi: $(\text{circonferenza del torace})^2 / \text{altezza al garrese}$;

- indice corporale: $\text{lunghezza del tronco} \cdot 100 / \text{circonferenza del torace}$;

- indice di profondità toracica: altezza del torace * 100 / altezza al garrese;

- indice di conformazione laterale del tronco: altezza del torace * 100 / lunghezza del tronco;

- indice dattilo-toracico: circonferenza dello stinco * 100 / circonferenza del torace.

E' stata inoltre determinata l'efficienza biologica dell'accrescimento (EBA), così come proposta da Pilla (1991) e Pilla et al. (1987, 1989); essa viene ottenuta come rapporto tra incremento di peso vivo e peso metabolico mantenuto in un preciso arco di tempo $[EBA=IPG(g)/PV(100kg)^{0.75}]$; questo parametro permette la valutazione delle reali potenzialità produttive dei soggetti, poiché con esso il fabbisogno di mantenimento, correlato al peso metabolico, viene di fatto "livellato" (Bonanno et al. 1997).

I dati individuali sono stati analizzati statisticamente attraverso l'analisi della varianza e della covarianza, utilizzando il package SAS (1989) ed applicando i seguenti modelli lineari:

a) per i dati relativi al peso vivo iniziale, agli IPG, alla durata del ciclo, all'ICA e all'EBA:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (TP)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

b) per i dati relativi al peso vivo finale, alle misurazioni somatiche e agli indici zoometrici:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (TP)_{ij} + b_1 x_{1ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

c) per i dati relativi ai consumi alimentari:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (TP)_{ij} + b_2 x_{2ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

dove:

Y_{ijk} = singola osservazione;

μ = media generale;

T_i = effetto fisso del tipo di incrocio (i = BF, LF, PRF);

P_j = effetto fisso della prova (j = 1,2);

$(TP)_{ij}$ = effetto dell'interazione;

b_1 = coefficiente di regressione con il peso, la misura o l'indice zoometrico iniziale (x_{1ijk});

b_2 = coefficiente di regressione con la settimana di allevamento (x_{2ijk});

ε_{ijk} = errore casuale residuo.

Risultati

Nella tabella n.2 sono riportati i valori relativi ai principali parametri di allevamento. Dall'esame della tabella è possibile mettere in evidenza che i soggetti BF hanno presentato un peso vivo finale significativamente superiore ($P<0,05$) agli LF (+2,21%), mentre i PRF hanno messo in luce un valore intermedio e non significativamente diverso ($P>0,05$) dagli altri. Considerando poi che i primi hanno fatto registrare una durata del ciclo inferiore di 1,38 d, rispetto ai secondi, ne deriva una differenza altamente significativa ($P<0,01$) fra BF e LF, a favore dei primi, in termini di IPG (+9,56%). Anche per quest'ultimo parametro i soggetti derivati dall'incrocio con tori di razza Pezzata Rossa Italiana hanno manifestato un valore inferiore rispetto ai derivati Bianco Blu Belga (-4,36%) e superiore nei confronti dei derivati Limousine (+4,78%) ($P<0,05$). I soggetti BF hanno presentato anche valori di EBA significativamente superiori agli LF (+84,07 g/100kg^{0.75}) ($P<0,01$) e ai PRF (+50,74 g/100kg^{0.75}) ($P<0,05$). I valori registrati per vitelli derivati da incroci con la Pezzata Rossa sono superiori a quelli derivati Limousine, per quanto la differenza tra medie non sia risultata significativa ($P>0,05$).

Tabella n.2 - Prestazioni produttive durante la fase di svezzamento (medie stimate).

		Tipo di incrocio			Prova		Significatività degli effetti			Coefficiente di regressione	DSE
		BF	LF	PRF	1	2	incrocio	prova	interaz.		
Soggetti	n.	21	19	14	24	30	-	-	-	-	-
Durata del ciclo	d	73	74	73	75	71	n.s.	<0.01	<0.01	-	5
Peso vivo iniziale	kg	58.40	61.26	61.46	60.23	60.50	n.s.	n.s.	<0.05	-	6.03
Peso vivo finale	kg (*)	120.80b	118.19a	119.81ab	119.99	119.21	<0.05	n.s.	n.s.	0.35***	3.11
IPG	g/d	848c	774a	811b	797	825	<0.01	<0.05	n.s.	-	49
EBA	g/(100kg) ^{0.75}	924b	840a	873a	862	896	<0.01	<0.05	n.s.	-	56
Consumo di s.s. :	(**)										
-da fieno	g/d	262	263	263	302	224	n.s.	<0.01	n.s.	22***	36
-da mangime	g/d	965	930	922	888	990	n.s.	<0.10	n.s.	128***	257
-da mais	g/d	101	104	100	139	65	n.s.	<0.01	n.s.	29***	115
-da latte ricostituito	g/d	334	334	334	382	287	n.s.	<0.05	n.s.	-22***	195
- totale	g/d	1662	1631	1620	1710	1565	n.s.	<0.10	n.s.	158***	391
ICA	g s.s./g IPG	1.967a	2.121b	2.002ab	2.159	1.901	<0.01	<0.01	<0.05	-	0.126

(*) valori covariati per il p.v. iniziale.

(**) valori covariati per settimana di allevamento.

(***) P<0.01

a, b, c diversi per P<0.05;

n.s. = non significativo.

La stagione di prova si è rivelata fonte di variabilità per la durata del ciclo (+4,25 d in inverno vs primavera; P<0,01), per gli incrementi ponderali giornalieri dei vitelli (-28 g/d in inverno vs primavera; P<0,05) e per l'efficienza biologica dell'accrescimento (-34,13 g/100kg^{0.75} in inverno vs primavera; P<0,05). È interessante notare la presenza di una interazione significativa (P<0,01) fra tipo di incrocio e durata del ciclo; infatti, mentre i soggetti BF e PRF non hanno manifestato differenze di rilievo nel corso delle due prove (risp. 72,5 e 73,45 d per i primi; 74 e 71 d per i secondi), i vitelli LF hanno mostrato in primavera una durata del ciclo sensibilmente inferiore (69 d vs 79,71) (tabella n.3).

Tabella n.3 - Interazione fra tipo di incrocio e prova sui principali parametri di allevamento (medie stimate).

Prova	Tipo di incrocio	1			2		
		BF	LF	PRF	BF	LF	PRF
Soggetti	n.	10	9	5	11	10	9
Durata del ciclo	d	73a	80b	74ab	74	69	71
Peso vivo iniziale	kg	59.80	58.11	62.80	57.00a	64.40b	60.11ab
Peso vivo finale	kg (*)	121.03	118.68	120.27	120.58	117.70	119.36
IPG	g/d	846b	755a	789a	850b	792a	834ab
EBA	g/(100kg) ^{0.75}	913b	832a	840a	935b	847a	906b
Consumo di s.s. :	(**)						
- da fieno	g/d	301	302	302	223	225	225
- da mangime	g/d	977	876	811	953	984	1033
- da mais	g/d	151	141	126	51	68	74
- da latte ric.	g/d	382	382	381	287	286	287
- totale	g/d	1810	1700	1620	1513	1563	1619
ICA	g/g	2.152ab	2.262b	2.060a	1.781a	1.980b	1.942b

(*) valori covariati con il p.v. iniziale.

(**) valori covariati con la settimana di allevamento.

a,b diversi per P<0.05 all'interno della prova.

Con riferimento ai consumi di sostanza secca totali e ripartiti per le diverse fonti alimentari (tabella n.2), non è stato possibile mettere in evidenza differenze significative legate al tipo di incrocio. L'effetto della prova (stagione di allevamento) è invece risultato quasi sempre altamente significativo: ciò induce a ritenere che, poiché tutti gli alimenti, ad eccezione del latte ricostituito, erano forniti *ad libitum*, gli animali abbiano usufruito di razioni diverse nelle due prove, regolandosi in tal modo al fine di rendere maggiormente adeguate le razioni stesse ai fabbisogni, che variavano in relazione alle mutate condizioni ambientali.

Come si evince dall'esame della tabella n.2, gli animali hanno regolato l'assunzione di alimento durante l'inverno a valori superiori del 3,91% rispetto alla primavera; tenendo conto anche della assunzione del latte ricostituito, somministrato fino alla 11ª settimana nella prova 1 e alla 9ª nella prova 2, la differenza sale al 9,27% (P<0,10).

Tale differenza nella assunzione totale giornaliera di sostanza secca, deriva, in realtà, da un maggior consumo, nel corso della prova invernale, di fieno (+35%; P<0,01) e di granella di mais (+114%; P<0,01), accanto ad una minor assunzione di mangime complementare (-10%; P<0,10). Il latte ricostituito, come detto in precedenza, è stato somministrato in quantità più elevate nel corso della prova invernale (+33%; P<0,05).

I migliori indici di conversione sono stati registrati per gli incroci BF e PRF, rispetto a LF (P<0,01). Anche in questo caso, la stagione di allevamento si è dimostrata fonte di variabilità (P<0,01), con i valori più favorevoli ottenuti nella seconda prova. Pure significativa l'interazione fra tipo di incrocio e stagione di prova, dovuta essenzialmente al fatto che, posti a confronto con le medie di ciascuna prova, i soggetti BF hanno notevolmente migliorato il parametro nella seconda, rispetto alla prima (risp. -6,3% e -

0,3%), contrariamente ai LF (risp. +4,2% e +4,8%) e ai PRF (risp. +2,2% e -4,6%) (tabella n.3).

Il genotipo dei vitelli ha determinato variazioni significative a carico di tutte le misurazioni somatiche effettuate (tabella n.4). In particolare i soggetti BF, indipendentemente dalla prova, hanno mostrato, rispetto ai LF, una maggior altezza al garrese (+1,87%; $P<0,05$), dovuta ad una maggior altezza del torace (+3,80%; $P<0,01$) ed una più elevata circonferenza del torace (+0,55%; $P<0,01$) e dello stinco (+1,89%; $P<0,05$); nei confronti dei PRF, i primi sono inoltre risultati in possesso di una maggior circonferenza toracica (+0,87%; $P<0,01$) e di una minor lunghezza del tronco (-3,28%; $P<0,01$). Gli incroci LF, rispetto ai PRF, hanno manifestato una minor altezza del torace (-3,35%; $P<0,01$) e lunghezza del tronco (-3,88%; $P<0,01$).

Tabella n.4 - Misure lineari e indici zootomici (medie stimate).

		Tipo di incrocio			Prova		Significatività degli effetti			Coefficiente di regressione	DSE
		BF	LF	PRF	1	2	incrocio	prova	interaz.		
Soggetti	n.	21	19	14	24	30					
Altezza al garrese	cm	91.19b	89.52a	90.64ab	89.90	91.00	<0.05	<0.05	n.s.	0.18*	1.85
Altezza del torace	cm	40.98b	39.48a	40.85b	40.12	40.75	<0.01	n.s.	<0.10	0.08	1.46
Circonferenza del torace	cm	112.67b	112.05a	111.70a	112.04	112.24	<0.01	n.s.	n.s.	0.02	0.82
Lunghezza del tronco	cm	89.55a	89.00a	92.59b	91.19	89.57	<0.01	<0.01	n.s.	0.26**	1.87
Circonferenza dello stinco	cm	15.08b	14.80a	14.90ab	14.74	15.11	<0.05	<0.01	n.s.	0.21**	0.34
Indice di anamorfofi		139.71b	140.11b	137.27a	139.66	138.40	<0.05	n.s.	n.s.	0.03	2.95
Indice corporale		79.42a	79.38a	82.99b	81.35	79.85	<0.01	<0.01	<0.05	0.11	1.64
Indice di profondità toracica		45.06	44.07	44.98	44.70	44.71	n.s.	n.s.	n.s.	0.04	1.49
Indice di conf. lat. del tronco		45.83b	44.45a	44.05a	44.12	45.44	<0.05	<0.10	n.s.	0.04	1.87
Indice dattilo-toracico		13.39	13.19	13.35	13.17	13.45	n.s.	<0.01	n.s.	0.13*	0.28

Tutti i valori sono covariati per i rispettivi valori iniziali.
a, b diversi per $P<0,05$.
n.s. = non significativo.
(*) $P<0,10$; (**) $P<0,05$

Le misure somatiche hanno messo in luce lievi differenze fra le due prove, con la presenza, nella seconda, di animali più alti e più corti.

A carico di alcuni indici zootomici (i. di anamorfofi, i. corporale, i. di conformazione laterale del tronco) sono state messe in luce differenze significative, in relazione al tipo di incrocio di appartenenza dei vitelli; in tal senso, i soggetti BF e LF, rispetto ai PRF, hanno mostrato valori più elevati dell'indice di anamorfofi (risp. +1,78% e +2,07%; $P<0,05$) e minori dell'indice corporale (risp. -4,30% e -4,35%; $P<0,01$). L'indice di conformazione laterale del tronco è risultato più alto negli incroci BF, rispetto a LF e PRF (risp. +3,10% e +4,04%; $P<0,05$).

Anche per gli indici zootomici lievi differenze sono emerse nel confronto fra le due prove.

Discussione e conclusioni

Un effetto positivo e significativo dell'incrocio fra tori di razza da carne e bovine da latte o da carne sulle prestazioni produttive dei vitelli in svezzamento è già stato messo in evidenza da diversi Autori (de Faria e Rodrigues de Faria, 1996; Cunningham e Magree, 1988). Weiher et al. (1988) ritengono, invece, che le differenze fra i soggetti di razza pura e gli incroci siano scarsamente apprezzabili fino allo svezzamento, ma diventino significative dallo svezzamento ai 200 d di età.

In altre ricerche sono stati posti a confronto incroci ottenuti utilizzando diverse razze in linea paterna e materna. Arpacik et al. (1993), impiegando su bovine Jersey tori di razza Piemontese, Simmental e Charolais, hanno notato pesi allo svezzamento non significativamente diversi (risp. kg 85,74; 85,90; 91,88); Reynolds et al. (1990), accoppiando bovine di razza Hereford con tori Angus, Pezzati Rossi (media mole), Pinzgauer e Simmental (grande mole), hanno notato un effetto significativo della razza paterna sul peso a 200 d (+6,1 kg negli incroci derivati da tori di grande mole) e sugli incrementi ponderali giornalieri (+53 g/d per i Simmental vs Pezzati Rossi). Essi inoltre affermano che la mole della razza paterna fornisce una buona indicazione sulle performance attese dai vitelli.

Circa l'effetto della razza materna, le indicazioni bibliografiche appaiono spesso contrastanti: da una parte c'è chi sostiene un effetto significativo della stessa (Beauchemin et al., 1989; Kress et al., 1990; Barlow et al., 1994; Hearnshaw et al., 1994), dall'altra chi lo nega (Marques, 1995; Khadem, 1996): dall'analisi della bibliografia appare tuttavia non sempre agevole ricavare notizie circa il tipo di svezzamento dei vitelli (allattamento naturale o svezzamento con sostituti del latte), dal momento che talvolta trattasi di ricerche compiute su intere regioni, nelle quali tali aspetti della tecnica di allevamento possono essere contemporaneamente presenti. Sembra tuttavia a noi, in accordo con Reynolds et al. (1990), che l'accrescimento prima dello svezzamento sia fortemente influenzato dalla produzione di latte della madre, ma che nei sistemi di svezzamento completamente artificiali tale effetto non possa risultare rilevante.

Nella presente ricerca, il tipo di incrocio si è rivelato in grado di influenzare il peso alla fine dello svezzamento, l'incremento ponderale giornaliero, l'indice di conversione e l'efficienza biologica dell'accrescimento. Nel confronto fra le razze paterne, particolari vantaggi sembrano derivare dall'impiego di tori di razza Bianco Blu Belga. Tali vantaggi potrebbero essere legati anche alla presenza nei tori del carattere "ipertrofia muscolare", che permette di ottenere nella progenie, rispetto a quella di tori di genotipo normale, un vantaggio produttivo di circa il 24% (Hanset e Michaux, 1985).

Da notare la significativa interazione fra tipo genetico e stagione di allevamento nei confronti della durata del ciclo di svezzamento, dalla quale emerge una particolare sensibilità dei soggetti derivati dalla razza Limousine alle condizioni climatiche fredde, rispetto agli altri incroci. Tale aspetto sarebbe da prendere particolarmente in considerazione, soprattutto nel caso di allevamento nelle regioni settentrionali del Paese.

La razza paterna ha determinato anche variazioni significative sulla morfologia degli animali; sono risultati quasi sempre significativi i confronti fra derivati Bianco Blu Belga e Limousine, a vantaggio dei primi. Variazioni dell'altezza al garrese, legate al genotipo paterno, sono state descritte anche da Arpacik et al. (1993).

In conclusione si può affermare che le performance durante la fase di svezzamento di vitelli ottenuti dall'incrocio fra tori di razze da carne e bovine da latte risulta influenzato dal genotipo paterno. Nelle condizioni della ricerca effettuata, i migliori risultati sono derivati dall'impiego della razza Bianco Blu Belga, rispetto alla Limousine e alla Pezzata Rossa Italiana.

Parole chiave: incrocio, razza Frisona Italiana, razza Limousine, razza Pezzata Rossa Italiana, razza Bianco Blu Belga, svezzamento, performance vitelli.

Key words: crossbreeding, Italian Friesian Breed, Limousine breed, Italian Simmental breed, Belgian Blue breed, weaning, calves performance.

RIASSUNTO - E' stato valutato l'effetto dell'incrocio fra bovine di razza Frisona Italiana e tori Bianco Blu Belga (BF), Limousine (LF) e Pezzata Rossa Italiana (PRF) sulle performance di vitelli in svezzamento. Nel corso di due prove distinte, una in inverno ed una in primavera, 54 vitelli sono stati alimentati con la stessa dieta e allevati dalla quarta alla sedicesima settimana di vita. Il tipo di incrocio ha influenzato significativamente il peso vivo finale (120,80; 118,19; 119,81 kg, rispettivamente per BF, LF e PRF, $P < 0,05$), l'incremento ponderale giornaliero (848, 774, 811 g/d; $P < 0,01$), l'indice di conversione dell'alimento (1,967; 2,121; 2,002 g s.s./g IPG; $P < 0,01$) e l'efficienza biologica dell'accrescimento (924; 840; 873 g/(100kg)^{0.75}; $P < 0,01$), calcolata come rapporto tra incremento ponderale e peso metabolico mantenuto [EBA=IPG(g)/PV(100kg)^{0.75}]. Il tipo di incrocio ha inoltre influenzato significativamente le misurazioni somatiche e i relativi indici. I risultati ottenuti mostrano particolari vantaggi derivanti dall'incrocio di tori Bianco Blu Belga e bovine di razza Frisona Italiana.

SUMMARY - Genetic type effect on production performance of weaning calves.

The effect of crossbreeding Friesian cows to Belgian Blue (BF), Limousine (LF) and Italian Simmental (PRF) sires was evaluated on the basis of weaning performance of 54 male calves, reared from 4 to 16 weeks of age and fed the same diet. Two different trials were carried out, the first one in winter, the second in spring. Genetic type significantly affected final body weight (120.80; 118.19; 119.81 kg, respectively for BF, LF and PRF, $P < 0.05$), average daily gain (848, 774, 811 g/d; $P < 0.01$), feed:gain ratio (1.967; 2.121; 2.002 g d.m./g ADG; $P < 0.01$) and biological efficiency of growth, (924; 840; 873 g/(100 kg)^{0.75}; $P < 0.01$), calculated as ratio between average daily gain and metabolic body weight [BEG=ADG(g/d)/BW(100 kg)^{0.75}]. Genetic type significantly affected also somatic measurements and respective indices. It comes out that special advantages result by crossbreeding Italian Friesian cows to Belgian Blue sires.

Bibliografia

- Armbruster G., Nour A.Y.M., Thonney M.L., Stouffer J.R. (1983) Changes in cooking losses and sensory attributes of Angus and Holstein beef with increasing carcass weight, marbling score or Longissimus ether extract. J. Food Sci., 48, 835-840.
- Arpacik R., Bayraktar M., Alpan O., Cekgul E. (1993) Ease of calving and calf growth from matings of Jersey cows with Simmental, Piedmont and Charolaise bulls. Lalahan Hayvancilik Arastirma Enstitusu Dergisi, 33, 3-4, 16-29.
- ASPA (1980) Valutazione degli alimenti di interesse zootecnico. 1. Analisi chimica. Zoot. Nutr. Anim., 6, 19-34.
- Barlow R., Hearnshaw H., Arthur P.F., Darnell R.E. (1994) Evaluation of Hereford and first-cross cows on three pasture system. 1. Calf growth and reproductive performance of young cows. J. Agric. Sci., 122, 1, 121-129.
- Beauchemin K.A., Bailey D.R.C., Pettitclerc D. (1989) Effects of genotype and pre-weaning environment on growth of beef calves. J. Dairy Sci., 72, suppl.1, 466.
- Bittante G., Gallo L. (1990) Possibili schemi riproduttivi nella produzione di latte e carne. L'Informatore Agrario, 46, (48), 31-37.
- BONANNO A., ALABISO M., TODARO M., DI GRIGOLI A. (1997) Prestazioni in vita di agnelli di diverso tipo genetico definite mediante curve di accrescimento. Zoot. Nutr. Anim. 1997, 23: 195-206.
- Buchter L. (1986) Eating quality in low fat beef. Manuscript n.730E. Danish Meat Research Institute, Maglegardsvej 2, DK-4000, Roskilde, Denmark.
- Cundiff L.V., Gregory K.E., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaria M. (1994) Carcass and meat characteristics of Tuli, Boran, Brahman, Belgian Blue, Piedmontese, Hereford and Angus breed crosses in the cattle germplasm evaluation program. Proc. 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph, vol. 17, 272-275.
- Cunningham B.E., Magee W.T. (1988) Breed direct, breed maternal and non additive genetic effects for preweaning traits in crossbred calves. Canadian J. Anim. Sci., 68, 1, 83-92.
- Dikeman M.E. (1987) Fat reduction in animals and the effects on palatability and consumer acceptance of meat products. Reciprocal Meat Conference Proceedings, vol. 40, 93-104.
- Dikeman M.E., Kemp K.E., Crouse J.D. (1979) Composition and meat sensory evaluation characteristics of carcasses in the five USDA yield grades, five fatness categories and five marbling categories. J. Anim. Sci., 49, (suppl.1), 217 (abstr.).
- Falaschini A., Ridolfi M., Trombetta M.F. (1993) "Misurazioni ed indici corporali di bovine Romagnole". Italian Beef Cattle Magazine, 2, 1, 21-25.
- FARIA N.R. de, RODRIGUES de FARIA N. (1996) Meat production projects, production systems, costs and commercial aspects. Revista Brasileira de Reproducao Animal, 20, 3-4, 106-111.
- Hanset R., Michaux C. (1985) On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. 1. Experimental data. Genet. Sel. Evol., 17, (3), 359-368.
- Hearnshaw H., Arthur P.F., Kohun P.J., Barlow R. (1994) Evaluation of Hereford and first-cross cows on three pasture systems. 2. Growth of Hereford and Brahman sired calves out of mature cows. J. Agric. Sci., 122, 1, 131-138.
- Homer D.B., Cuthbertson A., Homer D.L.M., McMenamin P. (1997) Eating quality of beef from different sire breeds. Anim. Sci., 64, 403-408.
- Johnson E.R. (1987) Marbling fat in beef. Meat Science, 20, 267-279.
- Khadem A.A., Morris S.T., Purchas R.W., McCutcheon S.N., Parker W.J. (1996) Growth, reproduction and carcass and meat quality characteristics of once bred Hereford x Friesian and Simmental x Friesian heifers managed for low or high liveweight gain during mid pregnancy. New Zealand Journal of Agricultural Research, 39, 2, 271-280.
- Kress D.D., Doornbos D.E., Anderson D.C. (1990) Performance of crosses among Hereford, Angus and Simmental cattle with different levels of Simmental breeding. 5. Calf production, milk production and reproduction of 3 to 8 year old dams. J. Ani. Sci., 68, 7, 1910-1921.
- Magliano A. (1950) "Ezoognosia Generale". Ed. Vallardi, Milano.
- Marques A.F.A. (1995) Sources of variation in the body weight of Simmental and crossbred cattle in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 24, 4, 542-558.
- Meregalli A. (1980) "Conoscenza morfofunzionale degli animali domestici". Liviana Editrice, Padova.
- Pilla A.M. (1991) Nuovi criteri di valutazione dei riproduttori bovini in performance. 1. Formulazione teorica. Zoot. Nutr. Anim., 17, 7-12.
- Pilla A.M., Catillo G., Gigli S., Romita A. (1987) Confronto fra vitelli meticcii (Chianini, Charolaises, Limousines, Marchigiani, Piemontesi e Romagnoli) e puri su base materna Frisona. II - Efficienza biologica dell'accrescimento. Ann. Ist. Sper. Zootec., 20 (S.S.2), 27-44.
- Pilla A.M., Catillo G., Gigli S., Romita A. (1989) Confronto fra vitelloni meticcii (Chianini, Charolais, Limousines, Piemontesi e Pezzati Rossi) e puri (Bruni e Brown Swiss) su base materna Bruna. II - Efficienza biologica dell'accrescimento. Ann. Ist. Sper. Zootec., 22 (S.S.3), 15-23.
- Reynolds W.L., Urick J.J., Knapp B.W. (1990) Biological type effects on gestation length, calving traits and calf growth rate. J. Anim. Sci., 68, 630-639.
- Sabbioni A., Superchi P., Bonomi A., Mazzali I. (1994) Produzione del vitello a carne bianca con soggetti di razza Frisona Italiana (ITF) e con gli incroci Bianco Blu Belga x ITF, Piemontese x ITF e Garonese x ITF. Rilevi in vita. Annali Fac. Med. Vet. di Parma, 14, 149-163.
- SAS Institute Inc. (1989) Sas/Stat User's Guide, ver.6, 4th Ed., vol.2, Cary NC: Sas Inst. Inc., pp.846.
- Weiher O., Neumann W., Wittig G. (1988) Growth of male dairy calves and crosses of beef bulls with German Black Pied dairy cows. 1. Wight gain as influenced by various factors. Archiv für Tierzucht., 31, 5, 457-467.

ALCUNE CARATTERISTICHE STRUTTURALI ED ECONOMICHE DI ALLEVAMENTI DI STRUZZI°

A. Salghetti**

° Ricerca eseguita con il cofinanziamento del M.U.R.S.T., anno 1999; Coordinatore Scientifico del Programma di Ricerca: Prof. A. Sabbioni.

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

1. Introduzione

L'allevamento dello struzzo in Italia ebbe inizio circa 10 anni fa, quasi in sordina, per poi prendere piede negli anni successivi grazie all'affermarsi della "catena degli animali da vita". E' questa una tappa inevitabile che accompagna la comparsa di una nuova attività produttiva, in particolare nell'introduzione di una nuova specie animale da reddito.

Per entrare nel ciclo produttivo è necessario infatti disporre degli animali da rimonta, animali reperibili nei pochi allevamenti che hanno avuto la fortuna di iniziare per primi l'attività di allevamento.

La disponibilità di pochi capi, a fronte di una domanda in forte crescita, non può che spingere verso l'alto i prezzi di mercato degli animali da riproduzione, che a metà degli anni '90 hanno superato i 10 milioni di lire per capo.

Si viene ad instaurare anche un fenomeno che rientra tra le "eccezioni alla legge della domanda". L'aspettativa di un ulteriore aumento di prezzo di un bene spinge verso l'alto la quantità domandata nella speranza di risparmiare sui futuri acquisti, oppure di lucrare con la riammissione del bene sul mercato. Il processo si autoalimenta dall'ingresso sul mercato di nuovi soggetti disposti ad acquistare che fanno lievitare ulteriormente i prezzi.

In queste condizioni l'efficienza tecnico-economica degli allevamenti passa in secondo ordine, perché l'entità dei prezzi dei riproduttori venduti consente di chiudere in attivo qualsiasi allevamento che riesca a produrre pochi capi all'anno.

In effetti per alcuni allevatori sono state annate fortunate, che hanno attirato altri allevatori nella "catena" assieme ad alcuni speculatori, molto attivi nella fase crescente della domanda e pronti a scomparire in quella decrescente.

E' ormai in esaurimento la fase pionieristica legata alla "catena degli animali da vita", per cedere il posto alla gestione ordinaria degli allevamenti, quella finalizzata alla produzione di beni destinati al consumo: carne, pelli, uova e piume.

Con la vendita dei riproduttori ad elevati prezzi qualsiasi gestione si poteva ritenere economicamente in attivo. Invece con la vendita di prodotti sul mercato al consumo i ricavi sono decisamente inferiori e l'allevatore per continuare l'attività deve contrapporre i nuovi ricavi, che sono in calo, con le spese che sono analoghe a quelle degli anni precedenti.

E' quanto si è verificato alla fine degli anni '90, che ha portato ad un drastico ridimensionamento del numero degli allevamenti, con la chiusura in particolare di quelli di piccole dimensioni. Ciò nonostante molti allevatori continuano la loro attività e stanno addirittura potenziando le mandrie.

Qualcuno ha cercato di fare un parallelismo tra quanto sta avvenendo con gli allevamenti degli struzzi e quello che è avvenuto per i cincillà, i lombrichi ed altre specie minori. Non c'è dubbio che la "catena degli animali da vita" è comune a qualsiasi specie di animali da reddito di nuova introduzione; nei prossimi anni potrebbe essere la volta degli Alpaca. Non necessariamente le conclusioni possono essere le stesse, ciò che fa la differenza sono le diverse prospettive dei consumi, che sembrano particolarmente favorevoli per la carne di struzzo.

Un primo quadro della situazione sugli allevamenti di struzzi in Italia ci viene fornito dall'Istat, grazie ad una recente indagine su tutto il territorio nazionale. Le nostre ricerche forniranno un ulteriore contributo alla conoscenza del comparto sulle realtà territoriali a noi più vicine.

2. L'allevamento dello struzzo in Italia

Nel 1990, in occasione dell'ultimo Censimento generale dell'agricoltura, non si parlava ancora di struzzi. Infatti la specie non rientrava tra le rilevazioni censuarie.

L'attualità dell'allevamento ha spinto l'Istat a condurre nel frattempo una indagine specifica sugli allevamenti di struzzi in Italia nel corso del 1999, senza attendere il nuovo Censimento previsto tra il 23 ottobre e il 31 dicembre 2000, con il quale le conoscenze verranno aggiornate e completate.

Inoltre l'Istat ha in programma per il 2001 una ulteriore indagine specifica diretta sugli allevatori, alla quale si aggiungerà un'indagine sperimentale presso i macelli autorizzati che fornirà informazioni sulla produzione di carne.

L'indagine Istat è la prima rilevazione statistica ufficiale in Italia, dove nel frattempo le informazioni del comparto erano costituite da stime effettuate dalle Associazioni di rappresentanza.

Lo stimolo alla rilevazione è conseguente alla rapida evoluzione che hanno avuto questi allevamenti nel nostro paese, dopo le prime esperienze maturate all'inizio degli anni '90. A distanza di 10 anni gli allevamenti di struzzi si sono diffusi su tutto il territorio nazionale, con la macellazione autorizzata dei capi, con quote crescenti di mercato sia per i prodotti alimentari sia delle pelli.

Gli allevamenti di struzzi rilevati dall'Istat nel 1999 ammontavano a 1.425 unità, per un patrimonio complessivo di 39.830 capi e una consistenza media di 28 capi per azienda [Istat, 2000]. Nel 1997 il numero degli allevamenti italiani era stimato intorno alle 1.500 unità, con all'incirca 5.000-6.000 riproduttori [Burlini, 1997], successivamente la stima è arrivata ad oltre 2.000 allevamenti [Burlini, 2000]. Trattandosi di stime dobbiamo ritenere più attendibile l'indagine dell'Istat.

Tab. 1 – Numero degli allevamenti di struzzi e consistenza dei capi per regione

REGIONI	Allevamenti		Capi	
	n	%	n	%
Piemonte	162	11,4	3.603	9,0
Valle d'Aosta	0	0,0	0	0,0
Lombardia	137	9,6	4.820	12,1
Trentino-Alto Adige	10	0,7	106	0,3
Veneto	106	7,4	2.597	6,5
Friuli-Venezia Giulia	14	1,0	668	1,7
Liguria	12	0,8	295	0,7
EmiliaRomagna	151	10,6	6.753	17,0
Toscana	121	8,5	2.158	5,4
Umbria	54	3,8	770	1,9
Marche	91	6,4	3.533	8,9
Lazio	116	8,1	2.890	7,3
Abruzzi	76	5,3	1.504	3,8
Molise	34	2,4	422	1,1
Campania	138	9,7	2.001	5,0
Puglia	23	1,6	475	1,2
Basilicata	26	1,8	654	1,6
Calabria	37	2,6	653	1,6
Sicilia	76	5,3	1.004	2,5
Sardegna	41	2,9	4.924	12,4
Italia	1.425	100,0	39.830	100,0
Nord	592	41,6	18.842	47,3
Centro	492	34,5	11.277	28,3
Mezzogiorno	341	23,9	9.711	24,4

Fonte: Istat

Graf. 1 - Graduatoria della consistenza degli struzzi per regione

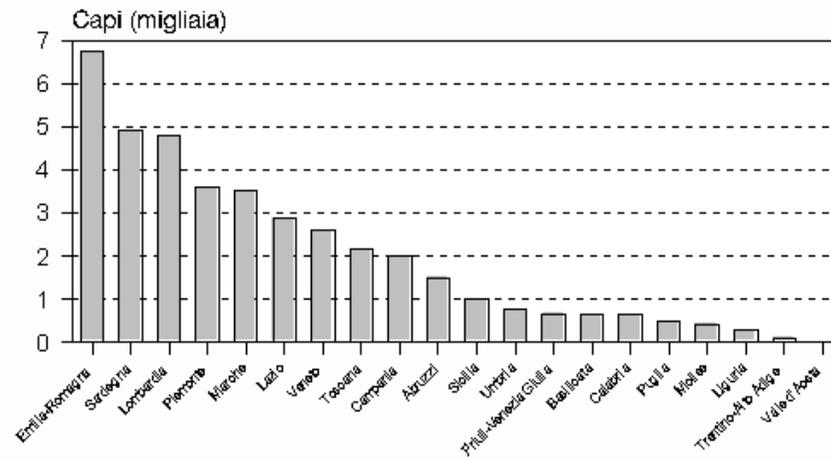


Fig. 1 – Allevamenti di struzzi per regione

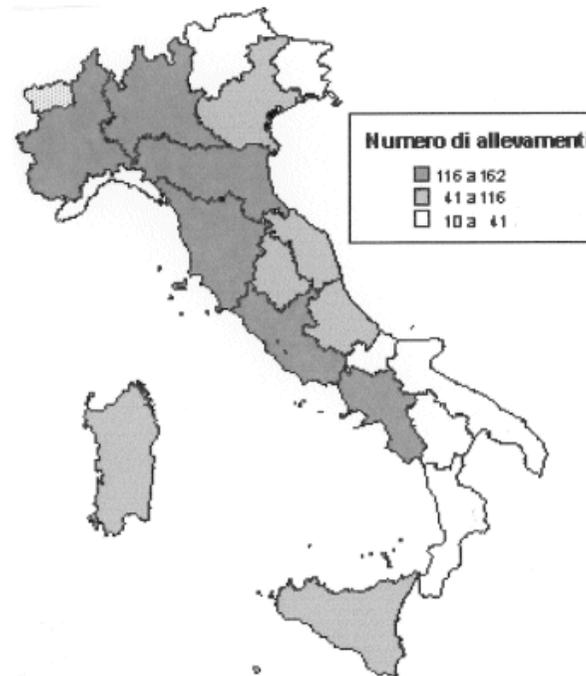
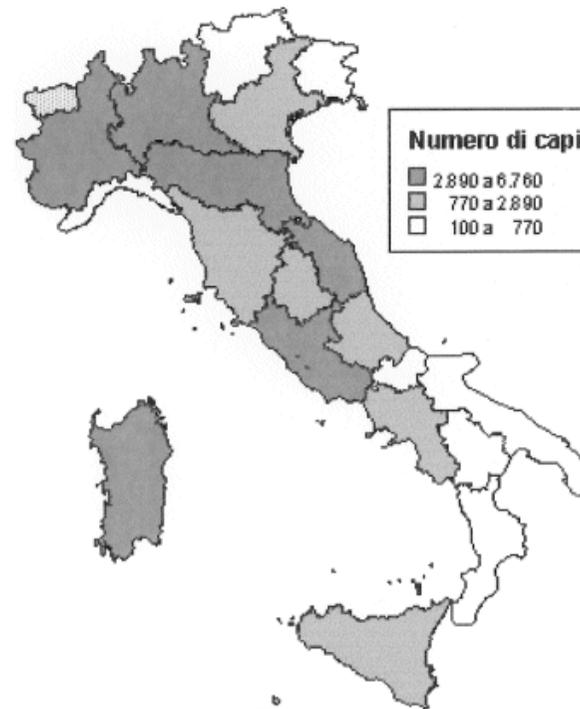


Fig. 2 – Struzzi allevati per regione



Fig. 2 – Struzzi allevati per regione



Fonte: Istat

Gli allevamenti di struzzi sono presenti in tutte le regioni, ad eccezione della Valle d'Aosta, a dimostrazione della rapida diffusione della nuova attività e dell'alta capacità di adattamento di questa specie animale alle diverse condizioni ambientali del nostro paese.

La tendenza è comunque quella di spostare gli allevamenti nelle aree climatiche più favorevoli e con terreni più facili al drenaggio, visto il continuo calpestio degli animali, soprattutto per le mandrie all'ingrasso che sono particolarmente concentrate nei recinti. Alcuni di questi recinti diventano spesso degli acquitrini e durante le gelate notturne vi possono essere dei capi che vengono intrappolati al terreno dalle piume, con le immaginabili conseguenze sulla crescita e la stessa vita degli animali.

Rimane comunque prevalente la concentrazione degli allevamenti nelle regioni settentrionali (41,6%) e al Centro (34,5%) rispetto al Mezzogiorno (23,9%). Anche la presenza maggiore di capi si colloca ancora nell'Italia settentrionale (47,3%) e nel Centro (28,3%), mentre il Mezzogiorno mantiene una incidenza analoga a quella degli allevamenti (24,4%).

Più in particolare la regione Piemonte è quella con il maggior numero di aziende (162), seguita dall'Emilia-Romagna (151), dalla Campania (138) e dalla Lombardia (137).

Per quanto riguarda la consistenza dei capi è l'Emilia-Romagna in testa con 6.753 unità, seguita dalla Sardegna con 4.924 e dalla Lombardia con 4.820 capi.

Mediamente la densità dei capi a livello nazionale, si ripete, è di 28 unità per allevamento, che salgono a 120 unità in Sardegna per la presenza di alcuni grandi

allevamenti che hanno individuato nell'isola le condizioni pedoclimatiche più favorevoli all'allevamento della specie.

Tab. 2 – Graduatoria delle prime 20 province per numero degli allevamenti di struzzi e consistenza dei capi

ALLEVAMENTI			CAPI		
	Provincia	n		Provincia	n
1	Cuneo	64	1	Cagliari	4.636
2	Perugia	41	2	Bologna	1.548
3	Benevento	38	3	Ascoli Piceno	1.395
4	Latina	37	4	Ancona	1.309
5	Avellino	37	5	Cuneo	1.294
6	Torino	35	6	Forli	1.048
7	Bologna	34	7	Cremona	1.036
8	Roma	33	8	Bergamo	987
9	Teramo	32	9	Rimini	956
10	Grosseto	31	10	Ravenna	888
11	Macerata	29	11	Verona	887
12	Padova	27	12	Frosinone	874
13	Ascoli Piceno	26	13	Brescia	836
14	Caserta	25	14	Alessandria	816
15	Salerno	25	15	Torino	780
16	Brescia	24	16	Roma	714
17	Chieti	23	17	Latina	706
18	Campobasso	23	18	Reggio-Emilia	667
19	Reggio-Emilia	22	19	Teramo	648
20	Ancona	22	20	Modena	646

Fonte: Istat

A livello provinciale il maggior numero di allevamenti è stato rilevato a Cuneo (64), seguito da Perugia (41) e Benevento (38). Cagliari detiene il maggior numero di capi allevati (4.636), al secondo posto viene Bologna (1.548), che contribuisce a portare in testa la regione Emilia-Romagna nella consistenza dei capi, grazie soprattutto all'area romagnola (74% dei capi). Infatti l'area emiliana è specializzata per l'allevamento dei bovini da latte e trovano meno spazio gli allevamenti alternativi.

La maggior parte degli allevamenti è di piccolissima dimensione: l'89,8% ha al massimo 50 capi e il 56,6% arriva appena a 10 capi, soltanto 6 allevamenti hanno oltre 500 capi. In pratica il 10,2% delle aziende, quelle con oltre 50 capi, detiene il 61,6% degli struzzi allevati.

Tab. 3 – *Struttura degli allevamenti di struzzi in Italia*

Classi di capi	Allevamenti		Capi	
	n	%	n	%
Fino a 10	807	56,6	4.032	10,1
11-25	298	20,9	4.938	12,4
26-50	174	12,2	6.289	15,8
51-80	56	3,9	3.655	9,2
81-150	54	3,8	5.872	14,7
151-200	13	0,9	2.388	6,0
201-500	17	1,2	5.596	14,0
Oltre 500	6	0,4	7.060	17,7
Totale	1.425	100,0	39.840	100,0

Fonte: Istat

In definitiva la struttura degli allevamenti di struzzi in Italia è caratterizzata da una dicotomia con la presenza di una quota massiccia di allevamenti con pochi capi da una parte e da pochi allevamenti con numerosi capi dall'altra. I piccolissimi allevamenti sono destinati ad essere emarginati dal mercato se non sono in grado di raggiungere adeguate dimensioni, come in effetti è avvenuto anche per altre tipologie di allevamenti.

Le stime sul consumo di carne di struzzo in Italia, secondo le valutazioni degli esperti e degli operatori del settore, fanno riferimento a circa 1.000 tonnellate, di cui tra il 70 e l'80% è di provenienza estera. La potenzialità produttiva di carne dei nostri allevamenti è decisamente maggiore, solo che non si è ancora potuta esprimere perché è stato privilegiato sino ad ora il reimpiego in azienda dei capi per ampliare la mandria o la vendita dei riproduttori.

La prolificità della specie ha ormai saturato questo canale di collocazione dei capi e si sta apprestando ad esitare sul mercato carne di struzzo in quantità via via crescente. Il prossimo Censimento generale dell'agricoltura ci fornirà un ulteriore contributo di conoscenze al riguardo.

Dando uno sguardo alla situazione europea emerge che nei paesi del Nord Europa si assiste ad una drastica riduzione degli allevamenti di struzzi o alla scomparsa della produzione locale. Ciò non significa una corrispondente riduzione della domanda di carne.

I paesi con il maggiore consumo procapite sono il Belgio, l'Olanda e la Svizzera. In quest'ultimo paese il consumo di carne continua a crescere, nonostante gli allevamenti siano pochi, evidentemente è sempre la carne di importazione la fonte principale.

Pertanto la collocazione naturale degli allevamenti di struzzi sono i paesi che si affacciano sul mediterraneo, dove l'espansione continua. In quest'area l'Italia è quella che detiene il maggior numero di allevamenti, anche se la consistenza media dei capi per allevamento è la più bassa rispetto agli altri paesi.

3. La ricerca aziendale

3.1 Metodologia

La conoscenza delle caratteristiche strutturali ed economiche degli allevamenti di struzzi ha come presupposto la rilevazione dei dati presso le singole aziende secondo una metodologia omogenea. A tale scopo abbiamo individuato un gruppo di aziende, grazie anche alla collaborazione dell'Associazione per la Valorizzazione dell'Allevamento dello Struzzo (AVAS), che fosse rappresentativo della realtà del territorio in cui operiamo. Infatti l'area dell'indagine aziendale è riferita alle regioni Emilia-Romagna e Toscana.

La scelta del campione non è stata effettuata con il criterio della rappresentatività statistica, non essendo ancora note le caratteristiche dell'universo, bensì attraverso dei parametri sulla dimensione aziendale riferita al numero delle femmine riproduttrici presenti negli allevamenti. A tale scopo sono stati esclusi i piccolissimi allevamenti, cosiddetti hobbistici, e quelli di grosse dimensioni, che sono pochi e con caratteristiche molto peculiari.

Pertanto il campione individuato è costituito da 26 allevamenti di struzzi, con un minimo di 4 femmine riproduttrici per allevamento e un massimo di 31 al primo gennaio 2000.

Per ciascun allevamento si è proceduto alla rilevazione delle schede aziendali e dell'inventario iniziale, con la successiva raccolta dei fatti amministrativi per l'intera annata agraria, il lavoro si concluderà il 31 dicembre con la rilevazione dell'inventario finale.

Le prime rilevazioni aziendali hanno avuto inizio alla fine del 1999 e verranno completate nei primi mesi del 2001. Le aziende sono tenute sotto controllo contabile per un'intera annata agraria: dalla elaborazione dei dati verranno redatti il bilancio economico e quello patrimoniale; dai confronti tra le aziende si individueranno alcuni parametri sull'efficienza tecnico-economica delle imprese.

Accanto alle rilevazioni contabili sull'annata agraria del 2000, sono state raccolte ulteriori informazioni strutturali ed economiche sull'annata agraria 1999 con l'ausilio di un questionario.

In attesa dei risultati economico-contabili del 2000, abbiamo ritenuto utile anticipare alcuni dati strutturali ed economici degli allevamenti di struzzi del campione relativi all'annata 1999.

3.2 Le aziende del campione

Gli allevamenti posti sotto controllo sono 26, dei quali 21 in Emilia-Romagna e 5 in Toscana. Va ricordato che l'Emilia-Romagna è la regione che detiene, secondo l'Istat, il maggiore patrimonio di struzzi in Italia e merita quindi un'indagine più ampia. Gli allevamenti della Toscana sono stati inclusi nella ricerca per le loro caratteristiche strutturali di media dimensione e per l'orientamento mercantile che prefigura interessanti prospettive di sviluppo.

Per quanto riguarda la collocazione altimetrica troviamo 16 aziende in pianura e 10 in collina, a dimostrazione della adattabilità della specie ai diversi climi.

Fig. 3 – Distribuzione degli allevamenti di struzzi del campione



Nel nostro campione il primo allevamento di struzzi è sorto nel 1991, si è poi arrivati a 8 nel 1996 per tornare a uno nel 1999. Possiamo quindi convenire che ad una fase di espansione degli allevamenti ha fatto seguito una fase di rallentamento nell'apertura di nuove attività, sino alla stasi odierna. Infatti ci troviamo oggi in una fase di ripensamento e di assestamento degli allevamenti esistenti nel momento in cui, conclusa la "catena degli animali da vita", l'obiettivo dell'imprenditore deve essere quello di produrre carne al minor costo possibile per il mercato al consumo.

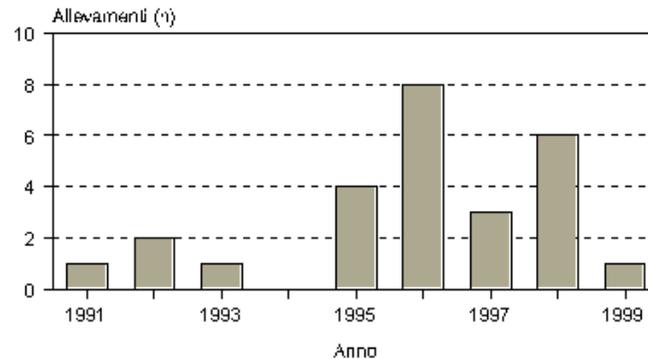
Gli imprenditori hanno mediamente un'età di 44 anni, con un minimo di 26 ed un massimo di 62. Evidentemente gli oneri finanziari per l'apertura dell'attività richiedono una certa disponibilità, che non è prerogativa dei giovani. In ogni caso il livello di istruzione è decisamente medio-alto, tenuto conto che la metà degli imprenditori ha un titolo di studio di scuola media superiore o universitaria. L'età e il titolo di studio hanno portato negli allevamenti notevoli esperienze professionali anche di natura extragricola. L'immissione di nuove energie imprenditoriali trova una analogia in altre attività agricole quali l'agriturismo, l'agricoltura biologica ecc. con risultati a volte inattesi.

E' stata anche l'occasione per un ritorno in campagna di ex agricoltori, in particolare pensionati, o comunque di appassionati della natura. Ciò ha comportato la necessità di ristrutturare i rustici con il recupero del patrimonio edilizio in abbandono e il ritorno nelle aree agricole di nuovi residenti, contribuendo ad alimentare la

domanda di beni e servizi e fare da volano alle economie in depauperamento di risorse.

L'introduzione di una nuova specie animale nelle aziende agricole ha portato ad una differenziazione delle produzioni, per ricercare nuovi mercati che non siano soggetti a limitazioni produttive.

Graf. 2 - Distribuzione del numero degli allevamenti per anno d'inizio dell'attività



Le difficoltà maggiori che lamentano gli allevatori di struzzi sono la mancanza di punti di riferimento certi sia di carattere tecnico che economico e mercantile. Sono ancora da approfondire le conoscenze sui fabbisogni della specie, sulle modalità di gestione degli allevamenti e sulle aspettative dei consumatori.

Pertanto siamo ancora alla ricerca di modelli standard di allevamento che possano esprimere tutte le potenzialità produttive, condizione indispensabile, anche se non sufficiente, per fornire agli allevatori prospettive future di sviluppo e di reddito.

3.3 Gli aspetti strutturali

La dimensione dei recinti, in rapporto alla superficie delle aziende agricole, mette in evidenza la complementarietà dell'allevamento dello struzzo rispetto alle altre attività aziendali.

La superficie media aziendale è infatti poco più di 16 ettari quando le recinzioni per gli struzzi si limitano a 1,2 ettari. Solo in due casi la superficie aziendale coincide con quella recintata e in ogni modo il recinto più grande non supera i 3 ettari.

In genere la gestione dell'allevamento dello struzzo tende ad essere distinta da quella aziendale, anche perché le incombenze e i rischi vengono lasciati al familiare promotore dell'iniziativa, in attesa di verificare l'esito della sperimentazione.

Infatti il lavoro medio profuso dai familiari non arriva ad occupare metà tempo di una unità lavorativa (1.100 ore). In realtà vi sono due allevamenti che fanno ricorso ai salariati fissi per l'elevato numero di capi presenti o perché l'imprenditore è impegnato anche in altre attività. Altri quattro imprenditori ricorrono a lavoratori avventizi, sufficienti a coprire il fabbisogno di lavoro delle piccole mandrie anche in assenza del titolare.

Tab. 4– Alcuni parametri strutturali degli allevamenti

Descrizione	Valori
- Aziende (n)	26
- Superficie aziendale/Aziende (ha)	16,0
- Superficie recintata/Aziende (ha)	1,2
- Unità lavoratrici/Aziende (n)	0,6
- Unità lavoratrici familiari sul totale (%)	82,8
- Ore di lavoro familiare/Aziende (n)	1.100
- Capi totali/Aziende (n)	62
- Femmine riproduttrici/Aziende (n)	12
- Maschi riproduttori/Aziende (n)	8
- Miglioramenti fondiari/Aziende (000 lire)	37.600
- Bestiame/Aziende (000 lire)	63.700
- Macchine/Aziende (000 lire)	17.500
- Prodotti di scorta/Aziende (000 lire)	1.500

Si conferma comunque che gli allevamenti di struzzi sono improntati principalmente sul lavoro familiare, tenuto conto delle dimensioni contenute delle mandrie e dei ridotti fabbisogni di lavoro per questa specie.

Solamente nel periodo dell'incubazione delle uova, che interessa per altro solo la metà degli allevamenti, cresce il fabbisogno di lavoro per il tempo da dedicare alla schiusa delle uova e allo svezzamento dei pulcini.

Gli investimenti necessari all'apertura dell'allevamento variano in funzione della dimensione della mandria e dell'indirizzo zoeconomico.

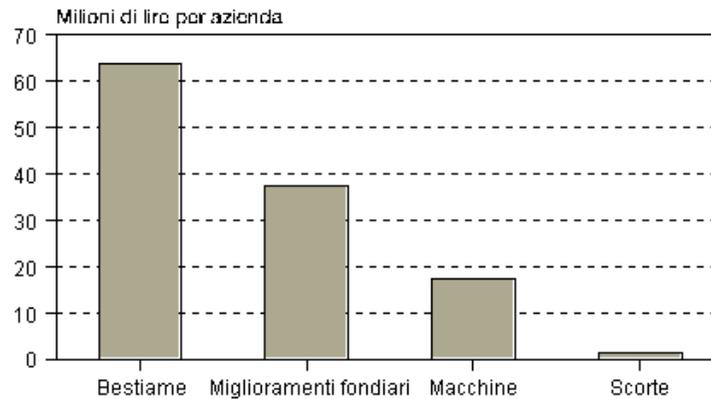
Dall'inventario al 31 dicembre 1999 risulta che il valore del bestiame è quello che riveste maggiore importanza, infatti il valore medio aziendale è di 63,7 milioni di lire, attribuibile principalmente ai riproduttori i cui prezzi sono ancora elevati (2,5-3 milioni di lire), anche se decisamente inferiori a quelli degli anni precedenti (5-10 milioni di lire).

In complesso la consistenza degli struzzi presenti alla fine dell'anno è di 1.617 capi, con una media di 62 capi per azienda, di cui 12 femmine e 8 maschi riproduttori, a cui vanno aggiunti altri 42 capi in allevamento e all'ingrasso.

I capi sotto controllo rappresentano il 18,1% della consistenza complessiva dei capi presenti nelle due regioni indagate dall'Istat: in particolare è del 15,2% per l'Emilia-Romagna ed arriva al 27,2% per la Toscana.

Il rapporto femmine-maschi è di 3 a 2: prevalentemente si tratta di coppie, a queste si aggiungono alcuni tris (2 femmine e 1 maschio), mentre sono solo due le esperienze di branco (più femmine e più maschi), che sono però in fase di esaurimento. La scelta della migliore combinazione tra femmine e maschi dipende da diversi fattori e viene modificata secondo le prestazioni del maschio e le competizioni interne tra le femmine.

Graf. 3 - Capitali mediamente investiti per azienda



Sulla base delle presenze rilevate il primo gennaio 1999 si può risalire all'analisi evolutiva di un'intera annata agraria: il numero dei capi è cresciuto complessivamente dell'85,2%, con particolare intensità per la rimonta e l'ingrasso (109,8%), seguito dalle femmine (57,6%) e dai maschi riproduttori (38,0%).

I dati ci confermano che la fase di espansione delle mandrie non si è ancora conclusa, ciò comporta un differimento dell'incontro con il mercato della carne e quindi lo spostamento nel tempo della fase di assestamento, quella che porta ad una gestione ordinaria degli allevamenti.

Per quanto riguarda le razze allevate esistono situazioni diverse negli allevamenti, in ogni caso la presenza di razze pure è piuttosto incerta, mentre sono tutti concordi della diffusa presenza di incroci dei quali è difficile discriminare la provenienza. Vengono comunque segnalate in ordine di consistenza le seguenti razze: Black Neck, Blue Neck Zimbabwe, Blue Neck Namibia e Red Neck.

Altri investimenti importanti sono costituiti dai fabbricati, dai recinti e dalle tettoie con 37,6 milioni di lire per azienda. Trattasi in parte di strutture preesistenti ed in parte di nuove costruzioni, come la sala incubazione e schiusa. In ogni caso le spese per le recinzioni e le tettoie sono piuttosto contenute perché gli allevatori ricorrono spesso a materiali di recupero e a lavori in economia. Sono gli allevamenti più grandi che investono in nuove strutture, mentre quelli piccoli si limitano allo sfruttamento delle strutture aziendali già esistenti.

Anche per i macchinari e le attrezzature le spese sono contenute, grazie anche ai mezzi già disponibili in azienda. Le spese più elevate interessano le macchine per l'incubazione e la schiusa, il cui acquisto deve trovare una giustificazione economica nel numero delle uova da incubare.

Infatti solo metà delle aziende ne è dotata, sono quelle con le maggiori capacità produttive, mentre le aziende più piccole preferiscono appoggiarsi alle dotazioni e alle esperienze di incubazione delle prime.

Mediamente la consistenza delle macchine ed attrezzature ammonta a 17,5 milioni di lire per azienda, ma in cinque allevamenti non ne esistono affatto. Le aziende che non hanno l'incubatrice e non raccolgono il foraggio aziendale per alimentare gli animali non hanno infatti necessità di alcun macchinario.

Per i prodotti di scorta la consistenza inventariale è assai ridotta e si limita a 1,5 milioni di lire, rappresentata dai mangimi, dall'erba medica disidratata e dai foraggi affienati. La provenienza mercantile degli alimenti non richiede molte scorte perché l'approvvigionamento può essere fatto in qualunque momento, anche per evitare anticipazioni finanziarie e l'eventuale deperimento delle merci in magazzino.

In conclusione, le caratteristiche strutturali degli allevamenti di struzzi hanno messo in evidenza che ci troviamo ancora in una fase dinamica per quanto riguarda gli

investimenti, soprattutto a livello della mandria, che prefigura impegno e fiducia nelle prospettive future della nuova attività.

Le tipologie aziendali presenti nel campione ci consentono di mettere in evidenza un dualismo nelle caratteristiche strutturali:

- piccoli allevamenti, con scarsi investimenti, che limitano il ciclo produttivo alla sola produzione delle uova, o comunque all'ingrasso di pochi capi per l'autoconsumo familiare o per la vendita diretta della carne, con un impegno lavorativo della famiglia alquanto limitato;

- grossi allevamenti che dispongono di incubatrici e che stanno effettuando notevoli investimenti con l'ampliamento della mandria per realizzare un ciclo produttivo completo; in aggiunta svolgono alcuni servizi per conto terzi ad altri allevatori di struzzi in modo da sfruttare al meglio i capitali fissi.

Da questa differenziazione strutturale prendono corpo le successive differenziazioni a livello gestionale.

3.4 Alcuni aspetti economici

La contrapposizione dei ricavi con le spese ci consente di analizzare i risultati economici delle aziende. In questa occasione possiamo prendere in esame solo alcune voci del bilancio relativo al 1999, frutto della raccolta di dati con un questionario. Il bilancio economico-contabile vero e proprio sarà riferito all'anno 2000, per il quale sono ancora in corso le elaborazioni.

Con i dati disponibili è comunque possibile ottenere alcune indicazioni utili di carattere economico per le voci di ricavo e di spesa. Iniziamo col prendere in considerazione la parte attiva del bilancio, rappresentata dai prodotti ottenuti.

Le uova sono quelle che danno inizio al ciclo produttivo degli animali. Nel 1999 i 26 allevamenti sotto controllo hanno ottenuto 4.722 uova, corrispondenti a 189 per allevamento e a 15 per femmina riproduttrice.

In realtà dobbiamo considerare che gli allevamenti di struzzi sono ancora in fase di costituzione e di assestamento, con la diffusa presenza di giovani riproduttori, sui quali dovrà essere fatta una selezione, una volta accertata la prolificità dei capi e le caratteristiche delle uova e dei redi. Dagli allevamenti di maggiore dimensione, che hanno già avviato la selezione dei riproduttori, ci si doveva aspettare quanto meno una maggiore produttività di uova per capo.

Tab. 5 – Alcuni parametri economici degli allevamenti

Descrizione	Valori
- Ricavi/Aziende (000 lire)	23.000
- Ricavi/Unità lavoratrici (000 lire)	39.700
- Uova prodotte/Aziende (n)	189
- Uova prodotte/Femmine riproduttrici (n)	15
- Uova schiuse (%)	59
- Pulcini svezzati (%)	72
- Mangimi/Aziende (000 lire)	10.480
- Foraggi/Aziende (000 lire)	1.600
- Quote di ammortamento/Aziende (000 lire)	4.200
- Prezzo delle uova (000 lire)	20-100
- Prezzo dei riproduttori (000 lire)	2.500-3.000
- Prezzo della carne in mezzene (000 lire/kg)	9-12
- Prezzo della carne in tagli pronti (000 lire/kg)	25-30

Delle uova prodotte solo il 12% vengono vendute; sono quelle degli allevatori che non dispongono della incubatrice e che non possono o non intendono effettuare l'ingrasso; in questo caso il ciclo produttivo si limita alla sola produzione delle uova.

I prezzi realizzati dalla vendita delle uova sono molto variabili in relazione alle caratteristiche e alla loro destinazione: si parte da 20.000 lire per quelle destinate al consumo fresco sino ad arrivare a 100.000 lire per quelle da incubare.

La stragrande maggioranza delle uova viene pertanto incubata, sia in azienda che per conto terzi, in questo caso sono da aggiungere anche le 389 uova acquistate. Dall'incubazione delle uova si è avuta una schiusa del 59%, alla quale ha fatto seguito un tasso di svezzamento dei pulcini del 72%. I risultati, non molto incoraggianti, sono motivo di difficoltà per gli allevatori che hanno realizzato le peggiori performances. Infatti la variabilità dei risultati è molto elevata: accanto ad allevamenti con buoni livelli di schiusa e di svezzamento dei pulcini ve ne sono altri che rischiano la chiusura per la mancanza di nuovi soggetti.

Questi risultati sono decisamente inferiori alle attese dei produttori e alla potenzialità della specie. Infatti, secondo le indicazioni fornite da esperti del settore, i risultati raggiungibili dovrebbero essere di 50 uova deposte per femmina riproduttrice, con una fecondità del 90%, una schiusa delle uova del 91% ed uno svezzamento dei pulcini del 86% [Anderloni, 2000]. Vi sono quindi ampi spazi di manovra per un miglioramento.

E' tutta la filiera riproduttiva che richiede una messa a punto, con interventi sulla selezione dei capi, l'alimentazione e lo stato sanitario, soprattutto per i piccoli, per i quali anche le condizioni ambientali sono determinanti.

Le entrate più consistenti negli allevamenti provengono dalla vendita dei capi vivi e della carne. Gli animali vivi possono essere venduti da macello o da riproduzione, anche se i confini tra le due destinazioni non sono bene definiti. Infatti chi ritira i capi cerca innanzitutto di collocarli come riproduttori, in considerazione dei prezzi più elevati rispetto a quelli da macello. Basti dire che nei primi anni, all'epoca della "catena degli animali da vita", era considerato uno spreco macellare dei capi, salvo i maschi in eccesso, per gli elevati prezzi spuntati dai riproduttori sul mercato, anche perché non si ponevano ancora problemi di selezione come sta avvenendo oggi.

La macellazione dei capi è iniziata infatti nelle prime aziende a partire dal 1998 (2 aziende), nel 1999 solamente la metà degli allevatori era pronta a macellare presso le strutture autorizzate; altri allevatori si sono limitati alla macellazione di alcuni capi in azienda per il consumo familiare.

In complesso la macellazione all'esterno o in azienda ha interessato 20 allevamenti per complessivi 316 capi. L'età media di macellazione dei capi è sui 12 mesi, mentre il peso si aggira sugli 80-100 chilogrammi.

La carne è stata venduta in parte in mezzene, a 9-12.000 lire il chilogrammo, e in parte in tagli pronti al consumo, ad un prezzo di 25-30.000 lire il chilogrammo.

Gli altri capi sono stati venduti vivi a partire dai pulcini più piccoli, a 80-120.000 lire a capo, per passare ai capi in accrescimento i cui prezzi sono correlati al peso, infine a quelli da ingrasso che hanno spuntato dalle 700 alle 800.000 a capo, per concludersi con i capi da riproduzione che hanno raggiunto i 2,5-3 milioni di lire.

Gli sbocchi mercantili per i riproduttori si vanno via via restringendo, rimane ancora aperta la strada della esportazione verso la Grecia, ma per i soggetti più piccoli.

Complessivamente il valore delle vendite dei capi vivi e di quelli macellati supera il mezzo miliardo di lire, circa un terzo del valore del bestiame presente il 31 dicembre 1999, con un incasso medio per azienda di poco più di 20 milioni di lire.

A questi ricavi possiamo aggiungere le uova vendute, le pelli grezze e qualche guscio, per un valore di circa 3 milioni di lire per azienda. Pertanto l'entità complessiva delle vendite è di 23 milioni di lire. Volendo individuare il valore complessivo della produzione lorda vendibile dovremmo tener conto anche dell'incremento delle mandrie durante l'anno, il cui patrimonio è ancora presente in azienda. Ciò sarà possibile con il bilancio economico relativo al 2000.

La vendita delle pelli grezze, del valore di 100-120.000 lire l'una, tende ad eguagliare la spesa della macellazione. I ricavi ottenuti dalla vendita dei gusci sono assai

modesti, mentre non risultano entrate dalle piume.

Sul fronte delle spese teniamo distinte quelle per i capitali fissi da quelle per i consumi. Le prime sono le quote relative alle strutture e ai macchinari, le seconde sono le spese varie rappresentate principalmente dagli alimenti.

Dai dati disponibili sulla consistenza dei fabbricati e delle macchine siamo in grado di quantificare le quote di ammortamento in 4,2 milioni di lire per azienda.

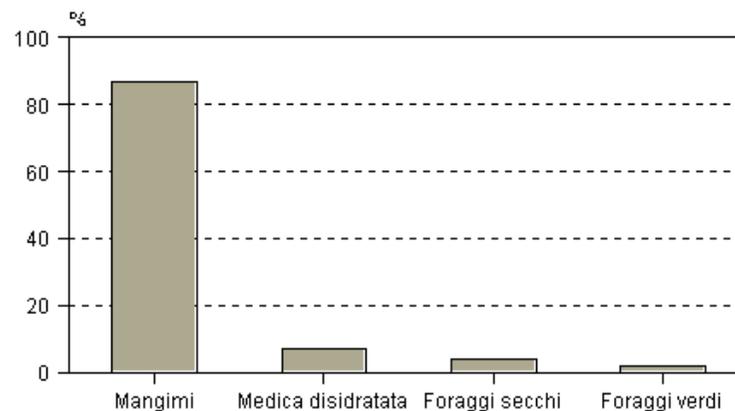
Le spese di alimentazione possono essere considerate tutte di origine mercantile avendo dato un prezzo anche agli alimenti prodotti in azienda per tenere distinta la gestione degli struzzi dalle altre attività aziendali.

Gli alimenti sono rappresentati in primis dai mangimi (87%), seguono a notevole distanza l'erba medica disidratata (8%), il fieno e i foraggi verdi (5%) con una spesa media per azienda di 12,1 milioni di lire.

Gli altri costi comprendono le manutenzioni e le assicurazioni, le spese energetiche, amministrative, sanitarie e i piccoli consumi, il cui ammontare dipende dalle dimensioni dell'allevamento e dalla presenza del ciclo completo o meno.

Per quanto riguarda le spese di manodopera sono da considerare le remunerazioni di quasi 6 mila ore di lavoro dipendente, rappresentato da due unità fisse e le rimanenti da avventizi. Questi ultimi vengono compensati sulle 10-12.000 lire all'ora.

Graf. 4 - Ripartizione percentuale della spesa per gli alimenti



L'incidenza del lavoro dipendente si limita al 17% del lavoro totale, per cui possiamo ritenere che la gestione degli allevamenti di struzzi sia tipicamente familiare, considerate anche le dimensioni ancora modeste della maggior parte degli allevamenti, dove l'apporto di lavoro è mediamente rappresentato da una unità familiare impiegata a metà tempo.

Gli allevatori di struzzi nella maggioranza dei casi sono lavoratori part-time, alcuni condividono il lavoro con l'azienda agricola tradizionale, altri svolgono attività lavorative extragricole, che rappresentano la fonte prevalente di reddito.

In affitto vi è una sola azienda che ha rilevato le strutture di un precedente allevatore, mentre non figurano presenti investimenti con finanziamenti pubblici agevolati.

In definitiva, i primi risultati economici della ricerca mettono in evidenza situazioni aziendali molto differenziate, alla ricerca di un equilibrio gestionale che tarda ad

arrivare.

E' questa la fase più critica degli allevamenti di struzzi, come di tutti i nuovi allevamenti, che va superata nel più breve tempo possibile per giungere ad una gestione ordinaria che consenta una equilibrata contrapposizione delle entrate con le spese per valutare le reali capacità dell'impresa di fornire reddito.

Analogamente alle caratteristiche strutturali delle aziende anche per quelle economiche si prospetta una forma di dualismo aziendale che vede la contrapposizione di due tipologie:

- da una parte le piccole aziende la cui produzione si può limitare alla sola vendita delle uova e di poca carne con un ridotto volume d'affari al quale si contrappongono limitate spese di gestione, con rischi ridotti ma con un limitato reddito;

- dall'altra parte le aziende di maggiori dimensioni che continuano ad ampliare il loro budget per raggiungere il più rapidamente possibile il punto di break-even, punto nel quale i costi di produzione eguagliano i prezzi di mercato per rimanere competitive. E' questa la fase di industrializzazione degli allevamenti di struzzi, in analogia con quanto è avvenuto per altre produzioni sia vegetali che zootecniche.

4. Considerazioni conclusive

L'allevamento degli struzzi in Italia ha una storia troppo breve per consentire di esprimere delle valutazioni conclusive circa le prospettive di sviluppo, anche perché i dati oggi disponibili sono ancora limitati e passibili di rapide modificazioni.

Ci troviamo infatti nella fase conclusiva della "catena degli animali da vita" e si sta affermando la fase mercantile di commercializzazione della carne.

Ciò nonostante si possono trarre alcune considerazioni conclusive sui dati disponibili. A livello strutturale sono presenti due tipologie aziendali:

- la prima è imperniata sulla piccola azienda che si avvale di strutture, in parte recuperate alla vecchia gestione agricola, con pochi investimenti e ridotti fabbisogni di lavoro prettamente familiare;

- la seconda tipologia aziendale ha una impronta di tipo industriale, con la formazione di grosse mandrie, la dotazione di incubatrici e il ricorso al lavoro dipendente, con grossi investimenti di capitale.

Analogamente, a livello gestionale e mercantile, si possono individuare due indirizzi zoeconomici:

- il primo indirizzo è rappresentato da allevamenti con ridotto volume d'affari, che cercano di valorizzare la poca produzione ottenuta con la vendita diretta della carne al consumatore che si reca in azienda; la strategia è quella di risparmiare sui costi della distribuzione in modo da contenere i prezzi della carne al consumo e nello stesso tempo di garantirsi un prezzo maggiore alla produzione, in ogni caso superiore a quello realizzabile tramite la vendita al commerciante;

- il secondo indirizzo zoeconomico è rappresentato da allevamenti che dispongono di una massa di prodotto che non può trovare collocazione in loco e che pertanto si deve collegare alla grande distribuzione con l'adozione delle moderne strategie di marketing.

In tutti i casi gli allevatori di struzzi debbono ancora risolvere una serie di problemi tecnici senza la soluzione dei quali possono essere compromessi gli stessi risultati economici. A questo scopo dovranno avvalersi delle nuove tecnologie e di professionisti esperti che sappiano indirizzare correttamente gli allevatori verso le soluzioni più razionali.

Sul fronte dei consumi c'è ancora tutto da fare in quanto il consumatore italiano non conosce ancora la carne di struzzo per la carenza di informazione, la scarsità di prodotto ed è frenato dagli elevati prezzi.

Tuttavia non possiamo non sottolineare tutta una serie di elementi che depongono a favore di un futuro incremento dei consumi di carne di struzzo in Italia e quindi di prospettive per gli allevatori. Se a queste prospettive si aggiunge una migliorata efficienza aziendale che consenta di portare sul mercato una massa critica di prodotto ad un prezzo più contenuto possiamo essere ottimisti sulle prospettive di sviluppo nel prossimo futuro.

Gli elementi favorevoli per un futuro sviluppo del mercato della carne di struzzo traggono origine dalle seguenti osservazioni:

- la rusticità degli animali e gli investimenti contenuti sono elementi favorevoli all'apertura di nuove attività;
- l'adozione delle moderne tecniche produttive, già in uso negli allevamenti avicoli, consentirà di tenere sotto controllo la filiera con abbattimento dei costi di produzione;
- la prolificità della specie è in grado di fornire in poco tempo numerosi soggetti e quindi elevate masse di carne;
- il clima particolarmente favorevole allo struzzo di buona parte del territorio nazionale e il facile adattamento della specie alle specifiche condizioni ambientali depongono a favore di una diffusione capillare degli allevamenti;
- la recente introduzione di normative per l'apertura di macelli autorizzati all'abbattimento dei capi e alla lavorazione delle carni di struzzo consente di esitare sul mercato carne fresca italiana con tutte le garanzie igienico-sanitarie e di qualità;
- la propensione del consumatore a differenziare la dieta alimentare e a rivolgere le proprie preferenze verso prodotti di qualità e con elevato contenuto salutistico può trovare nella carne di struzzo la risposta ai nuovi bisogni;
- i consumi di carne di struzzo non hanno ancora avuto possibilità di espressione in Italia, vista la carenza di informazioni e la scarsità di prodotto, per cui il mercato è ancora tutto da soddisfare;
- il recente interessamento della grande distribuzione per la carne di struzzo è un ulteriore segnale positivo;
- i prezzi ancora elevati, anche della carne di importazione, consentono ai nostri allevatori più capaci, attraverso la riduzione dei costi, ampi spazi di manovra per essere competitivi;
- le caratteristiche qualitative e di salubrità della carne di struzzo hanno già trovato il favore dei consumatori nei paesi con maggiore benessere, come la Svizzera, che fanno da apripista anche per il nostro;
- il problema emergente della sicurezza alimentare delle carni tradizionali, dopo le note vicende delle carni agli ormoni, alla diossina e della mucca pazza che hanno gravemente allarmato l'opinione pubblica, induce a spostare i consumi verso le carni alternative;
- la nascita delle Associazioni produttori in diverse regioni, quali organismi di rappresentanza della categoria e per una politica di concentrazione dell'offerta e di promozione commerciale, sono un segnale positivo verso l'acquisizione di una maggiore forza contrattuale;
- l'interesse che l'Istat sta dedicando agli allevamenti di struzzi, con una specifica indagine nel 1999, alla quale seguirà il Censimento generale dell'agricoltura del 2000 e da ulteriori programmi di indagine su alcuni allevamenti e sulla macellazione delle carni nel 2001, sono espressioni di fiducia nelle prospettive future.

Per definire i limiti e le possibilità di sviluppo degli allevamenti bisogna comunque attendere che le mandrie di struzzi raggiungano la dimensione ottimale e possano approdare ad una gestione ordinaria, quella che consente di contrapporre i ricavi ai costi.

Siamo quindi in attesa di disporre dei risultati dell'annata agraria 2000 per potere verificare le ipotesi avanzate e individuare con maggiori elementi di conoscenza gli obiettivi che gli allevatori sono stati in grado di raggiungere e la direzione verso la quale intendono incamminarsi.

Parole chiave: Struzzo, allevamento, economia.

Key words: Ostrich, breeding farms, economics.

Mots-clés: autruche, élevage, économie.

RIASSUNTO – L'Istat ha rilevato che in Italia nel 1999 vi erano 1.425 allevamenti di struzzi con 39.830 capi, pari a 28 unità per allevamento. L'indagine ha messo in evidenza l'importanza crescente di questi allevamenti in soli dieci anni di vita.

La nostra indagine ha interessato 26 allevamenti di struzzi, di cui 21 in Emilia-Romagna e 5 in Toscana, sui quali sono state effettuate delle rilevazioni economico-contabili al fine di approfondire le conoscenze sulle caratteristiche strutturali e gestionali delle nuove aziende.

I primi risultati della ricerca hanno messo in evidenza la dinamicità degli allevamenti che in un anno hanno accresciuto la dimensione della mandria del 85,2%, con 62 capi mediamente presenti per azienda alla fine del 1999.

E' emerso inoltre che la "catena degli animali da vita" si sta avviando alla conclusione e che gli allevatori hanno iniziato la macellazione dei capi, grazie anche all'approvazione delle normative per abilitare alcuni macelli all'abbattimento dei capi.

La nascita delle Associazioni produttori e l'emergere di tipologie aziendali sul modello industriale fanno bene sperare sulle possibilità di sviluppo del comparto, che in futuro potrebbe assicurare all'Italia l'autosufficienza nella produzione di carne di struzzo, in analogia con quanto è avvenuto per le produzioni avicole.

Nello stesso tempo non si possono nascondere le difficoltà ancora presenti che attengono ai problemi tecnici ed a quelli economici, la risoluzione dei quali consentirà agli allevatori di portare sul mercato della carne di struzzo a prezzi concorrenti con la carne d'importazione.

SUMMARY - Some structural and economic characteristics of ostrich breeding

According to Istat (Italian Statistical Institute) in 1999 there were 1,425 ostrich breeding farms in Italy with a total of 39,830 animals, equal to 28 units per farm. The survey highlighted the growing importance of these breeding farms after only ten years of life.

Our survey covered 26 ostrich breeding farms, 21 in Emilia-Romagna and 5 in Tuscany, on which economic-accounts studies were performed for an in-depth study of the structural and managerial characteristics of the new breeding farms.

The first results of the research have highlighted the dynamism of the breeding farms which, in a single year, have increased the dimensions of their herds by 85.2%, with an average of 62 animals per breeding farm at the end of 1999.

It also emerged that the "breeding animals chain" is reaching a conclusion and that the breeders have started the slaughtering of the animals, also aided by the approval of regulations to qualify certain slaughter-houses for the killing of these animals.

The founding of Producer Associations and the emergence of industrial-style types of breeding farm give good reason to hope that the sector will be able to develop and that in the future the sector will be able to guarantee self-sufficiency to Italy in the production of ostrich meat, as was the case for avicultural production.

At the same time, one cannot ignore the difficulties still present concerning technical and economic problems. The solving of these problems will make it possible for breeders to bring ostrich meat to the market at prices that are competitive with those of imported meat.

Résumé - Quelques caractéristiques structurelles et économiques des élevages d'autruche. L'Istat a relevé que l'Italie comptait en 1999 1.425 élevages d'autruches avec 39.830 bêtes, soit 28 unités par élevage. La recherche a mis en évidence l'importance croissante de ces élevages en dix années seulement d'existence.

Notre recherche a porté sur 26 élevages d'autruches, dont 21 en Emilie-Romagne et 5 en Toscane. Des relevés économiques et comptables ont été effectués dans le but d'approfondir les caractéristiques structurelles et de gestion de ces nouvelles exploitations.

Les premiers résultats ont mis en évidence le dynamisme des éleveurs qui ont augmenté leur cheptel de 85,2% en un an avec une moyenne de 62 unités par exploitation à la fin de 1999.

Il ressort aussi que la "la chaîne des animaux de reproduction" est en train de finir et que les éleveurs ont commencé l'abattage des bêtes, grâce aussi à l'approbation des normes pour agréer quelques abattoirs pour l'abattage des autruches.

La naissance des associations de producteurs et l'émergence d'exploitations sur le modèle industriel donnent de bons espoirs sur les possibilités de développement du secteur. A l'avenir l'Italie pourrait être autosuffisante dans la production de viande d'autruche, comme ce fut le cas pour la production avicole.

En même temps on ne peut pas cacher les difficultés encore présentes concernant les problèmes techniques et économiques. Leur résolution permettra aux éleveurs de présenter sur le marché de la viande d'autruche à des prix concurrentiels avec ceux de la viande importée.

Bibliografia

- 1) ANDERLONI G. (2000). Manuale sull'allevamento dello struzzo. Calderini Edagricole, Bologna.
- 2) BURLINI F. (1997). Manuale pratico per l'allevamento dello struzzo. Edizioni "L'Informatore Agrario", Verona.
- 3) BURLINI F. (1998). Analisi economica dell'allevamento dello struzzo. L'Informatore Agrario, n. 9.

- 4) BURLINI F. (1999). Per l'allevamento dello struzzo è in arrivo la verifica del mercato. L'Informatore Agrario, n. 19.
- 5) BURLINI F. (2000). C'è un futuro per l'allevamento dello struzzo? Rivista "Struzzo e dintorni", n. 14.
- 6) CIVES I. (1998). Lo struzzo. Situazione in Italia. Aspetti produttivi, sanitari e legislativi. Il Progresso Veterinario, n. 1.
- 7) DEEMING D. C., ANGEL C. R. (1996). Introduction to the ratites and farming operations around the world. International Conference held in Manchester, England.
- 8) DOWSLEY W. G., GARDNER C. (1993). Ostrich foods e feeding. The Publishers – Grahamstown, South Africa.
- 9) DRZKA B. (1995). Cattle Yesterday - Ostrich Today. The Ostrich News, n. 76, Oklahoma, Usa.
- 10) ENDRIGHI E., BIANCHI A., ZUCCHI G. (1996). Filiera struzzo, condizioni per un futuro. Rivista di Avicoltura, n. 12.
- 11) ENDRIGHI E., BIANCHI A., ZUCCHI G. (1997). La raticoltura nel Nord Italia. Rivista di Avicoltura, n. 1/2.
- 12) MARTINELLI A., ANDERLONI G. (1992). Lo struzzo ha contagiato gli italiani. Rivista di Avicoltura, n. 10.
- 13) MARTINELLI A., ANDERLONI G. (1993). Lo struzzo e il suo ambiente. Rivista di Avicoltura, n.4.
- 14) RALEICH A. J., HENDRICKSON G. (1994). Ostriches. Economic analysis of a commercial production system. Department of Agricultural Economics, Oklahoma State University, Usa.
- 15) SPORTELLI F. G. (1999). Il nuovo corso della struzzicoltura. Rivista di Avicoltura, n. 9.
- 16) VAN ZYL P. (1997). Lo struzzo interessa tutto il mondo. Rivista di Avicoltura, n. 6.
- 17) WALLANCE C. (1995). Breeding Concepts e Practical System. The Ostrich News, n. 78, Oklahoma, Usa.
- 18) Istat (2000). La consistenza degli allevamenti di struzzi in Italia. Statistiche in breve

The heat stress and seasonal effects on reproduction in dairy cow

Fabio De Rensis¹ and Rex J. Scaramuzzi²

¹*Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, via del Taglio 8,
Università di Parma, 43100 Parma, Italy*

²*Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Royal College
Street, London NW1 0TU, UK.*

Introduction

Summer heat stress is a major contributing factor to low fertility of dairy cows inseminated in the summer months (Faust *et al*, 1988; Ray *et al*, 1993; Thompson *et al*, 1996). Anglo Saxon authors (Cavenstany *et al*, 1985) report that conception rates fall from 40 to 60% during cold seasons and to 10 to 20% during hot seasons. A delayed effect of heat stress in the summer on fertility in the autumn is also evident. In fact, low summer fertility generally associated with the warm months of the year (usually June to September) remains low in autumn (October and November) although cows are no longer exposed to heat stress.

In heat stressed cows the duration and intensity of oestrus was reduced in some studies (Wolfenson *et al*, 1988; Younas *et al*, 1993; Gangwar *et al*, 1965; Abilay *et al*, 1975; Gwazdauskas *et al*, 1981) but was unchanged in others (Howell *et al*, 1994). Motor activity and other manifestation of oestrus were also reduced (Hansen, 1994) and the incidence of anoestrous and silent ovulation were increased (Gwazdauskas *et al*, 1981; Labhsetwar *et al*, 1963). Therefore there is a reduction in the number of inseminations and in the proportion of inseminations that result in pregnancy (Hansen, 1994).

The effect of heat stress on the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis

Since the main factors regulating ovarian activity are gonadotrophin-releasing hormone from

hypothalamus and the gonadotrophins, LH and FSH from anterior pituitary gland, several authors have studied the effect of the heat stress on the secretion of these hormones. The effects of heat stress on the LH concentrations of peripheral blood are inconsistent. Some studies, report unchanged concentrations (Gwazdauskas *et al*, 1981; Gauthier *et al*, 1986) while others report increased concentrations (Roman-Ponce *et al*, 1981) and others decreased concentrations (Madan and Johnson 1973; Wise *et al*, 1988; Gilad *et al*, 1993; Lee *et al*, 1993) following heat stress. However, in a single study the LH pulse frequency is not altered by heat stress (Gilad *et al*, 1993). The effect of heat stress on the preovulatory surge of LH is similarly controversial. A reduction of the endogenous LH surge by heat stress was reported in heifers (Madan and Johnson, 1973) but not in cows (Gwazdauskas *et al*, 1981; Rosenberg *et al*, 1982; Gauthier *et al*, 1986).

The concentrations of plasma FSH were higher during the preovulatory period in summer and this was associated with lower circulating concentrations of inhibin (Roth 1998).

In conclusion most studies report that LH levels are decreased by heat stress. Consequently, in summer, the dominant follicle grows in a low LH environment and leads to lower fertility. There is insufficient published information on the effect of heat stress on blood concentrations of FSH and further research is required before a conclusion can be reached.

Plasma oestradiol concentrations are reduced by heat stress in dairy cows (Wolfenson, 1995, 1997; Wilson *et al*, 1998a,b; Roth, 1998). The effect of heat stress on plasma progesterone concentration is more controversial and several studies report either increased (Wilson *et al*, 1998a,b) or decreased blood concentrations of this hormone (Younas *et al*, 1993; Howell *et al*, 1994; Jonsson *et al*, 1997). These differences could be due to the fact that plasma progesterone concentrations depend on the rate of production by the corpus luteum and the rate of metabolism in the liver that is influenced by the diet and possibly the type of heat exposure (i.e. acute or chronic).

The concentration of plasma progesterone can be reduced by heat stress and this has important consequences for fertility. It is well known that low progesterone plasma levels during the luteal phase of the pre-conception oestrus cycle can compromise follicular development leading to abnormal oocyte maturation and early embryo death. During the conception cycle low progesterone

concentrations can also lead to failure of implantation and embryonic death. In the conception cycle the effect of progesterone is more probably related to the need for synchronous development of the embryo and the corpus luteum and delayed or advanced development of the corpus luteum will lead to a higher rate of implantation failure. The use of exogenous progesterone post-insemination to supplement endogenous progesterone has mixed effects on fertility with one paper reporting an improvement (Robinson *et al*, 1989) and another paper reporting no benefit (Bruel *et al*, 1990).

The mechanisms by which heat stress alters the concentrations of circulating hormones are not known. Increased corticosteroid secretion has been suggested (Roman-Ponce *et al*, 1977) as has increased GnRH and gonadotrophin secretion (Gilad *et al*, 1993) . In a detailed study, (Gilad *et al*, 1993) heat stress affected the secretion of gonadotrophins to a greater degree in cows with low concentrations of oestradiol compared to those with high concentrations. This study suggests that high concentrations of oestradiol can counteract the effect of heat stress, or alternatively, that the neuroendocrine mechanism controlling gonadotrophin secretion is more sensitive to heat stress when concentrations of plasma oestradiol are low. Therefore any alteration in the secretory activity of the ovary caused by heat stress could be an important factor in summer infertility. Acute heat stress could act on the hypothalamo-hypophyseal system to cause a transient fall in gonadotrophin secretion leading to a fall in oestradiol secretion that would augment the effect of the heat stress. Heat stress could also act directly on the ovary to decrease the sensitivity of the ovary to gonadotrophin stimulation.

The formation of gametes is temperature sensitive. Normal spermatogenesis requires a that is below normal body temperature and recent evidence indicates that the formation of oocytes is also temperature sensitive. The effect of heat stress on fertility might be the result of a direct effect of high ovarian temperatures on oocyte quality.

It is likely that heat stress affects reproductive performance by direct actions on the reproductive tract and by indirect actions mediated by alterations in energy balance. The metabolic hormone prolactin is temperature sensitive and its levels are increased in summer. Prolactin has anti-gonadotrophic actions and suckling-induced prolactin secretion is one of the major cause of post-partum anoestrus. The concentrations of other metabolic factors such as IGF-I and glucose are decreased in the summer months compared to winter (Ingraham *et al*, 1982; Butler and Smith, 1989; Whitaker *et al*,

1993; Jolly *et al*, 1995; Richards *et al*, 1995; Jonsson *et al*, 1997; Hamilton *et al*, 1999). Both IGF-I and glucose are generally stimulatory to ovulation and implantation. The effect of high temperatures on plasma glucose concentrations is caused by a reduced dry matter intake (Abilay *et al*, 1975; Roman-Ponce *et al*, 1981) and a reduced efficiency of nutrient absorption (Beede and Collier, 1986).

The secretion of LH is also modulated directly by glucose availability (Bucholtz *et al*, 1996) and hyperglycemia inhibits pulsatile LH secretion and prevents ovulation. This could be another mechanism by which heat stress and its associated reduction in appetite could decrease fertility in dairy cows.

Heat stress effect on follicular development and early pregnancy

Heat stress alters the efficiency of follicular selection and dominance and has adverse effects on the quality of ovarian follicles (Badinga *et al*, 1993) and on follicular steroidogenesis (Howell *et al*, 1994; Roman-Ponce *et al*, 1977; Rosemberg *et al*, 1977; Wolfenson *et al*, 1995; Faust *et al*, 1988). Summer heat stress reduces the dominance of the large follicle and more medium-size sub-ordinate follicles survive (Wolfenson *et al*, 1995; Roth, 1998; Wilson *et al*, 1998). Consequently there is more than one large dominant follicle and an increase in twinning in dairy cows during the hot season (Ryan and Boland, 1991). The period of duration of dominance of the preovulatory follicle is increased and this is negatively correlated with fertility (Mihm *et al*, 1994).

The intrauterine environment is compromised in heat stressed cows and there is a decrease in blood flow and an increase in uterine temperature (Roman-Ponce *et al* 1978; Gwazdauskas *et al*, 1975). These changes will increase early embryonic loss and reduce the proportion of successful inseminations in summer. High ambient temperatures will also affect pre-attachment stage embryos (Ray *et al*, 1992) but the magnitude of the effect decreases as the embryo develops (Ealy *et al*, 1993).

System utilized to improve fertility during summer months

Various cooling procedures that are used on farms do not substantially improve fertility and the conception rate was still below that in winter (Hansen, 1994). The most widely used cooling systems

are based on misting the cows with water from overhead sprays or on cooling the air. The use of these systems achieved some improvement of fertility but it did not match winter fertility (Bucklin *et al*, 1991; Berman and Wolfenson 1992; Armstrong *et al*, 1994; Huber, 1996; Hansen, 1997)

In summer, the administration of GnRH to lactating dairy cows at oestrus increased conception rate from 18% to 29% (Ullah *et al*, 1996) but the induction of ovulation and a corpus luteum with a single injection of hCG (3000 i.u.) on day 5 or 6 after insemination did not improve fertility (Schmitt *et al*, 1996). Similar results have been reported following the exogenous administration of progesterone with an intravaginal delivery device (CIDR) (Wolfenson *et al*, 1994). The administration of the antioxidant, vitamin E at the time of AI or at 30 days post-partum had no beneficial effect on pregnancy rate during summer months and likewise nor did the administration of selenium or beta-carotene (Arechiga *et al.*, 1998)

Seasonal infertility of dairy cows in Northern Italy

The use of fixed time insemination (AI) has the distinct advantage of not requiring the detection of oestrus. Recently, simple effective synchronization systems for fixed time AI, based on the injection of GnRH (or hCG) followed by PGF 6 to 7 days later and then a second injection of GnRH (or hCG) 24 to 60h after the PGF have been developed (Pursley *et al*, 1995, 1997a,b; Shmitt *et al*, 1996b; De Rensis *et al*, 1999). Using one of these programs (de la Sota *et al*, 1998) the pregnancy rate at 120 days post-partum was increased and the number of days open was reduced.

We have used these techniques (F. De Rensis, P. Marconi, T. Capelli and R.J. Scaramuzzi, unpublished data) to investigate the pregnancy rate and the number of days open in dairy cows after an induced oestrus at two times of the year, in winter (December, January and February) and summer (June, July and August). Oestrus was synchronized in 100 cows starting 60-70 days post-partum, on commercial dairy farms near Bergamo in Northern Italy using either a combination of the Gonadotrophin-releasing hormone agonist, Buserelin (GnRH; Receptal, 10 µg) followed by the Prostaglandin F₂ analogue Luprostiol (PGF; Prosolvin 15 mg) 7 days later followed by another injection of GnRH 2 days after PGF or the human Chorionic Gonadotrophin (hCG; Chorulon, 1500u.i.) followed by PGF 7 days later and hCG 2 days after PGF. The cows were inseminated 16-18h after

the last treatment irrespective of oestrus and pregnancy was diagnosed by rectal palpation 40 to 50 days post- insemination. Cows returning to oestrus were inseminated again.

We compared hCG with GnRH because, although both are equally effective in inducing ovulation, corpus luteum formation and progesterone secretion (Sianangama *et al*, 1996; Rajamahendran *et al*, 1992) the subsequent increase in progesterone concentrations is greater in hCG-treated compared to GnRH-treated cows. The hCG may provide a longer period of LH-like stimulation to the follicle compared to GnRH-induced endogenous LH secretion and with a greater degree of luteotropic support (Schmitt *et al*, 1996a).

The preliminary results of our study indicate that control animals inseminated in summer showed a reduction in pregnancy rate and an increase in days open compared to control cows inseminated in winter. The treatments did not alter the number of cow pregnant to first or second AI (Figure 1) but did increase the number of cows pregnant by 90 days post-calving. There were no interactions between treatment and season.

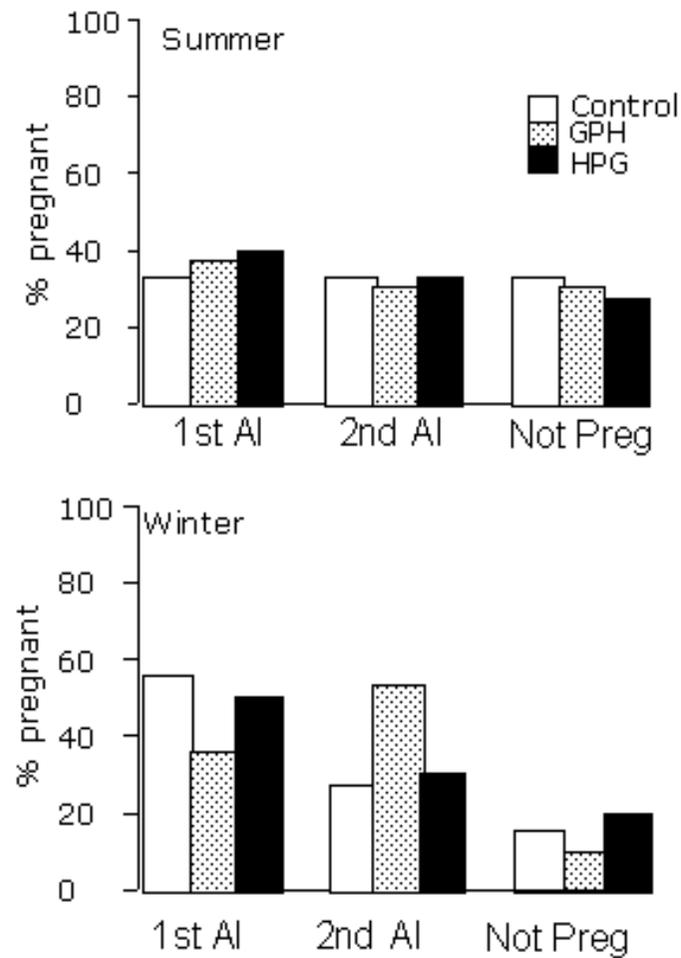


Figure 1 The percentage of post-partum Dairy cows pregnant to a first (1st AI) and a second (2nd AI) insemination and the percentage of cows not pregnant after two inseminations (Not Preg) carried out in during winter or summer. The three groups of cows were (i) not treated (Control), (ii) synchronised using GnRH (GPH) and (iii) synchronised using hCG (HPG)

Conclusions

There is a widely observed decrease in the fertility of dairy cows inseminated in the summer compared to cows inseminated in winter and heat stress is the most likely cause of the lower fertility.

The precise mechanism of this effect has not been conclusively identified. An indirect action mediated by corticosteroids has been suggested. A direct action on the reproductive system mediated by reproductive hormones has also been suggested.

The site of action of heat-stress on fertility is also unclear but the most likely site appears to be the hypothalamo-hypophyseal system although a site of action in the ovarian follicle and the oocyte cannot be excluded. In addition there is probably an effect on implantation and embryo development associated with impaired luteal function and reduced progesterone secretion in summer.

The use of cooling systems in hot weather or of a synchronized ovulation combined with fixed time insemination that does away with the need to detect oestrus can partially but not completely restore fertility.

References

- Abilay TA, Johnson HD, Madan ML (1975). Influence of environmental heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 58:1836-1839.
- Arechiga CF, Vazquez-Flores S, Ortiz, O, Hernandez-Ceron J, Porras A, McDowell LR, Hansen PJ (1998). Effect of injection of Beta-carotene or vitamin E and Selenium on Fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 50:65-76.
- Armstrong DV. (1994). Heat stress interaction with shade and cooling. *Dairy Science* 77:2044-2050.
- Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M, Wolfenson D. (1993). Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 39:797-810.
- Beede DK, Collier RJ. (1986). Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *J. Anim. Sci.*, 62:543-554.
- Berman A, Wolfenson D. (1992). Environmental modifications to improve production and fertility. In: Van Horn HH, Wilcox CJ (Eds) *Large dairy herd management* American dairy science association, Champaign, IL:126-1234.
- Breuel KF, Spitzer JC, Thompson CE, Breuel JF (1990). First-service pregnancy rate in beef heifers as influenced

by human chorionic gonadotrophin administration before and/or after breeding. *Theriogenology*, 34:139-145.

- Bucholtz DC, Vidwans NM, Herbosa CG, Schillo KK, Foster DL (1996). Metabolic interfaces between growth and reproduction V. Pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinology*, 137:601-607.
- Bucklin RA, Turner LW, Beede DK, Bray DR, Hemken RW (1991). Methods to relieve heat stress for dairy cows in hot, humid climates. *Appl. Eng. Agric.* 7:241-247.
- Buthler WR, Smith RD (1989). Interrelationship between energy balance on postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 7:767-783.
- Cavestany D, El-Whishy AB, Foot RH, (1985). Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 68:1471-1478.
- De la Sota RL, Burke JM, Risco CA, Moreira F, DeLorenzo MA, Thatcher WW (1998). Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 49:761-770.
- De Rensis F, Allegri M, Seidel, G.E. Jr (1999). Estrus synchronization and fertility in post-partum dairy cattle after administration of human chorionic gonadotropin (hCG) and prostaglandin PGF₂alpha analog. *Theriogenology*, 52:259-269.
- Ealy AD, Drost M, Robinson OW, Britt JH. (1993). Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*, 76:2899-2905.
- Faust MA, McDaniel BT, Robinson OW, Britt JH (1988). Environmental and yield effects on reproduction in primiparous Holstein. *J. Dairy Sci.*, 71:3092-3099.
- Gangwar PD, Branton C, Evens DL (1965). Reproductive and physiological responses in Holstein heifers to controlled and natural climatic conditions. *J. Dairy Sci.*, 48:222-227.
- Gauthie D. (1986). The influence of season and shade on estrus behaviour, timing of preovulatory LH surge and the pattern of progesterone secretion in FFPN and Creole heifers in a tropical climate. *Reproduction, Nutrition and Development*, 26:767-775.
- Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber Y, Wolfenson D. 1993). Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows, *J. Reprod. Fert.*, 99:315-321.
- Gwazdauskas FC, Wilcox CJ, Thatcher WW. (1975). Environmental and management factors affecting conception rate in a subtropical climate. *J. Dairy Sci.*, 58:88-92.
- Gwazdauskas FC, Thatcher WW, Kiddy CA, Pape MJ, Wilcox CJ. (1981). Hormonal pattern during heat stress following PGF₂alpha-tham salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology*, 16:271-285.
- Hamilton TD, Vizcarra JA, Wettman RP, Keefer BE, Spicer LJ (1999). Ovarian function in nutritionally induced anoestrus cows: effect of exogenous gonadotrophin-releasing hormone in vivo and effect of insulin and insulin-like growth factor I in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 117:179-187.
- Hansen PJ, (1994). Causes and possible solutions to the problem of heat stress in reproductive management of dairy cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:161-170.
- Hansen PJ (1997). Effects of environment of bovine reproduction. In: Youngquist RS (Ed). *Current therapy in large animal Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia, PA, 403-415
- Howell JL, Fuquay JW, Smith AE, (1994). Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during

spring and summer. *J. Dairy Sci.*, 77:735-739.

- Huber JT (1996) Amelioration of heat stress in dairy cattle. In: Philips CJC (Ed) progress in dairy Science CAB Int Oxon, UK, 211-243.
- Ingrahm RH, Kappel LC, Morgan EB, Babcock DK, (1982). Temperature-humidity vs seasonal effects on concentrations of blood constituents of dairy cows during the pre and post-calving periods: relationship to lactation level and reproductive functions. In: 2nd International Livestock and Environment Symposium, American Society of Agricultural Engineers, St Joseph, Michigan, 565-570.
- Jolly PD, McDougall S, Fitzpatrick LA, Macmillan KL, Entwistle K (1995) Physiological effects of undernutrition on postpartum anestrous in cows. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 49:477-492.
- Jonsson NN, McGowan MR, McGuigan K, Davison TM, Hussain AM, Kafi M, Matschoss A. (1997). Relationship among calving season, heat load, energy balance and postpartum ovulation of dairy cows in a subtropical environment *Anim. Reprod. Sci.*, 47:315-326.
- Labhsetwar AP, Tyler WJ, Casida LE (1963). Genetic and environmental factors affecting quiet ovulation in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, 46:843-845.
- Lee CN (1993). Environmental stress effect on bovine reproduction. *Vet Clin. N Am: Food Anim. Oract.*, 9:263-273
- Madam ML, Johnson HD (1973). Environmental heat effects on bovine luteinizing hormone. *J. Dairy Sci.*, 56:1420-1423.
- Mihm M, Baguisi A, Boland MO, Roche JF (1994). Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fert.*, 102:123-130.
- Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Gaverik HA, Anderson LL. (1997). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.*, 80:295-300.
- Rajamahendran R, Sianangama PC. (1992). Effect of human chorionic gonadotrophin (hCG) on dominant follicles in cows: Accessory corpus luteum formation, progesterone production and pregnancy rate. *J. Reprod. Fert.*, 95:577-584.
- Ray DE, Halbach TJ, Armstrong DV (1993). Season and lactation number effects on milk production and reproduction in dairy cattle in Arizona. *J. Dairy Sci.*, 75:2976-2983.
- Richards MW, Spicer LJ, Wettemann RP (1995). Influence of diet and ambient temperature on bovine serum insulin like growth factor I and thyroxine: relationship with non-esterified fatty acids, glucose, insulin, luteinizing hormone and progesterone. *Anim. Reprod. Sci.*, 36:267-279.
- Ryan DP, Boland MP (1991). Frequency of twin births among HolsteinXFriesian cows in a warm dry climate. *Theriogenology*, 36: 1-10.
- Robinson NA, Leslie KE, Walton JS, (1989) Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 72: 202-207
- Roman-Ponce H, Thatcher WW, Buffington DE, Wilcox CJ, Van Horn HH (1977). Physiological and production responses of dairy cattle to a shade structure in a subtropical environment. *J. Dairy Sci.*, 60:424-430.
- Roman-Ponce H, Thatcher WW, Canton D, Barron DH, Wilcox CJ (1978). Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 46:175-180.
- Roman-Ponce H, Thatcher WW, Wilcox CJ (1981). Hormonal interrelationship and physiological responses of

- lactating dairy cows to shade management system in a subtropical environment. *Theriogenology*, 16:139-154.
- Rosenberg M, Herz Z, Davidson M, Folman J. (1977). Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels and conceptions in primiparous and multiparous dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, 51:363-367.
 - Rosemberg M, Folman Y, Herz Z, Flamenbaum I, Berman A, Kaim M. (1982). Effect of climatic condition on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17 β in high milk-yielding cows. *J. Reprod. Fert.*, 66:139-146.
 - Roth Z (1998). Immediate and delayed effect of heat stress on ovarian follicular development and function in dairy cows. MSc Thesis, Israel
 - Schmitt EJ, Diaz T, Barros CM, de-la-Sota REL, Drost M, Fredriksson EW, Staples CR, Tohrner R, Thatcher WW (1996) Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotrophin or an agonist of gonadotrophin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.*, 74:1074-1083.
 - Schmitt EJ-P, Diaz RL, de la Sota RL, Thatcher WW. (1993). Differential responses of the luteal phase in cattle following ovulation of the first wave follicle with a GnRH agonist versus hCG. *J. Anim. Sci.*, 71 (Suppl. 1): 212 abstr.
 - Schmitt EJ-P, Barros CM, Fields PA, Fields MJ, Diaz T, Kluge JM, Thatcher WW. (1996a). A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotrophin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotrophin on Day 5 of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 74:1915-1929.
 - Schmitt EJ-P, Diaz T, Drost M, Fredriksson EW, Thatcher WW. (1996b). Use of a releasing-releasing hormone or human chorionic gonadotrophin for timed insemination in cattle. *J. Anim. Sci.*, 74:1084-1091.
 - Sianangama PC, Rajamahendran R. (1996). Effect of hCG administration on Day 7 of the estrous cycle on follicular dynamics and cycle length in cows. *Theriogenology*, 45:583-592.
 - Thompson, J.A., Magee, D.D., Tomaszewski, M.A., and Wilks D.L: Fourdraine, R.H. (1996). Management of summer infertility in Texas Holstein dairy cattle. *Theriogenology*, 46:547-558.
 - Ullah G, Fuquay JW, Keawhoong T., Clark BL, Pogue DE, Murphey EJ, (1996). Effect of gonadotrophin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating Holstein during heat stress. *J. Dairy Sci.*, 79:1950-1953.
 - Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH, Lucy MC (1998a). Effect of controlled heat stress on ovarian function in dairy cattle: I. Lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 1: 2124-2131.
 - Wilson SJ, Kirby CJ, Keosnigfeld AT, Keisler, DH, Lucy MC (1998b). Effect of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle: 2. Heifers. *J. Dairy Sci.*, 81, 2132-2138.
 - Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter R, Wiersma F (1988) Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J. Dairy Sci.*, 71:2480.
 - Withaker DA., Smith EJ., da Rosa GO., Kelly JM., (1993) Some effects on nutrition and management on the fertility of dairy cattle. *Veterinary Record*, 133:61-64.
 - Wolfenson D, Flamenbaum I, Berman A (1988). Hyperthermia and body energy store effects on estrous behaviour, conception rate, and corpus luteum function in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 71:3497
 - Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, Braw-Tal R, Berman A. (1995). The effect

of heat stress on follicular development during the estrous cycle dairy cattle. *Biol. Reprod.*, 52:1106-1113.

- Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R. (1997). Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cow. *Anim. Reprod. Sci.*, 47:9-19.
- Younas M, Fuquay JW, Smith AE, Moore AB. (1993). Estrus and endocrine responses of lactating Holstein to forced ventilation during summer. *J. Dairy Sci.*, 76:430-434.

RECENTI ACQUISIZIONI e PARTICOLARITA' SULL'IMMUNITA' CELLULO-MEDIATA NELLA SPECIE SUINA

Miduri F., De Angelis E., Borghetti P., Corradi A., Cabassi E.

Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Parma. e-mail: apvet@unipr.it

Introduzione

Il sistema immunitario del suino, analogamente a quello delle altre specie animali, può essere suddiviso in componenti **aspecifici** (*innati o naturali*) e **specifici** (o *acquisiti*); entrambi intervengono in difesa dell'organismo contro gli agenti patogeni.

L'immunità cosiddetta **aspecifica** gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'infezione nei primi giorni successivi al contagio; le sue componenti umorali (complemento, alcuni tipi di interferone, proteina C reattiva, lisozima, lactenine, criptidine, difensine ecc.) e cellulari (granulociti neutrofilii, eosinofili, macrofagi e cellule Natural Killer) agiscono in modo del tutto indipendente da una precedente esposizione all'antigene e sono in grado di attivarsi in tempi molto brevi. Qualora questa prima linea di difesa sia superata, interviene il sistema immunitario reattivo che dà luogo ad una risposta immunitaria specifica verso ciascun tipo di agente patogeno.

I linfociti B e T ed i loro prodotti (anticorpi e citochine) sono ritenuti gli agenti principali dell'immunità cosiddetta **specifici**. Tale specificità è strettamente dipendente dalla presenza di recettori (TCR per i linfociti T, immunoglobuline di superficie o BCR per i linfociti B), ciascuno dei quali riconosce in maniera specifica un determinato antigene od epitopo antigenico e ne distingue la natura estranea ("*non self*") all'organismo, discriminando tra milioni di determinanti antigenici. Questa capacità viene conferita ad ogni linfocita (linfocita T o B vergine o "*naive*"), attraverso un complesso processo di riarrangiamento genico e molecolare nella sintesi di tali recettori ed avviene prima dell'incontro con l'antigene, durante la loro maturazione differenziativa negli organi linfoidi primari.

Concetto direttamente conseguente ed altrettanto fondamentale è quello della **selezione clonale**. I linfociti vergini circolano nel sangue, penetrano nei linfonodi e negli altri tessuti linfoidi secondari dove possono venire in contatto con gli antigeni specifici. L'antigene quindi seleziona il clone pre-esistente di linfociti T o B vergini, legandosi ai loro recettori cellulari e dopo il contatto i linfociti vengono stimolati a dividersi ulteriormente (**espansione clonale**) dando origine ad un gruppo di cellule tutte dotate della stessa specificità e che sono in grado, dopo alcuni giorni, di *attivare* (cellule effettrici) una risposta di tipo umorale (sostenuta dai linfociti B) o cellulo-mediata (sostenuta dai linfociti T helper e citotossici), oltrechè di *regolarla* (cellule regolatrici e soppressori) e di *memorizzarla* (cellule memoria) (Roth J.A., 1996).

La risposta immunitaria *primariasi* innesca al primo contatto con l'antigene e viene attivata dopo circa 2-3 settimane mentre nelle successive esposizioni la capacità di ricordare, anche dopo molto tempo, gli antigeni incontrati precedentemente (**memoria antigenica**) permetterà un'attivazione cellulare ed una risposta immunitaria *secondaria* molto più rapida ed efficace.

In questa sede focalizzeremo l'attenzione sull'immunità cellulo-mediata della specie suina, tuttavia non potremo ragionare in termini troppo rigidi poichè il ruolo svolto dai linfociti T e B è, come vedremo, strettamente dipendente l'uno dall'altro. Inoltre il nostro interesse sarà rivolto soprattutto allo studio delle sottopopolazioni linfocitarie T del sangue periferico, che tanta importanza sta acquistando in ambito di immunologia ed immunopatologia comparata.

Organi linfoidi e particolarita' anatomiche del suino

La maggioranza dei linfociti, dei fagociti mononucleati e di altre cellule accessorie è concentrata in organi e tessuti specifici, e spesso in aree anatomicamente ben definite di tali organi; tuttavia tale particolare localizzazione non sembra essere del tutto rigida poichè molti linfociti ricircolano ("*trafficking*") continuamente tra il torrente circolatorio ed i tessuti.

Gli organi linfoidi del suino vengono classificati in due gruppi principali, seguendo lo schema di classificazione generale utilizzato negli altri mammiferi: gli **organi linfoidi primari** e gli **organi linfoidi secondari**.

Negli **organi primari** originano e maturano tutti i linfociti; in particolare nel midollo osseo (sede dell'ematopoiesi) hanno origine tutti i linfociti, nel timo maturano ed acquisiscono lo stato di competenza funzionale solo i linfociti T, mentre negli organi cosiddetti "bursa equivalenti" (midollo osseo) maturano ed acquisiscono la competenza solo i linfociti B.

Il **timo** può funzionare anche come ghiandola endocrina poichè è in grado di secernere alcuni tipi di ormoni (timosina, timopoiatina, timostimulina, fattore umorale timico e timulina); fra questi il più conosciuto e studiato è, per il momento, *la timulina* (FTS, facteur thymique sérique). Questo ormone è stato isolato dal siero di varie specie animali (topo, ratto, suino, pollo e uomo); in riferimento particolare alla specie suina, la sua sequenza aminoacidica è stata descritta già da tempo (Bach J.F. et al., Pléau J.M. et al., 1977) e studi effettuati in proposito hanno dimostrato che tale sequenza è del tutto identica a quella dell'analogo ormone umano (Bach J.F. et al., 1989).

La timulina (a differenza degli altri ormoni timici) viene prodotta esclusivamente dalle cellule epiteliali della corticale timica e la sua attività biologica dipende fortemente dalla presenza dello zinco

all'interno della sua molecola (Bach J.F. et al., 1989) a cui si lega attraverso tre principali siti di legame (Asn, Ser4 e Ser8), (Cung M.T. et al., 1988). Nella sua forma attiva, Zn-legata, la timulina induce la differenziazione antigenica dei linfociti T e ne esalta la funzionalità sia in soggetti normali che in soggetti con deficienza timica parziale. Inoltre, ad elevate dosi interviene sui linfociti T-soppressori, mentre a basse dosi sembra stimolare specificatamente l'attività dei linfociti T-helper e T-citotossici (Plèau J.M. et al., 1985). Il livello sierico della timulina decresce progressivamente con l'aumentare dell'età dell'animale e con l'involutione del timo ed è strettamente dipendente dalla biodisponibilità di Zn. In corso di deficienza di Zn si verifica atrofia timica, con riduzione dell'area corticale, diminuita attività timica endocrina, ed alterazione delle funzioni immunitarie periferiche T-dipendenti; inoltre la carenza di Zn causa ridotta sintesi e rilascio di GH, ormone della crescita, che, insieme alla prolattina, svolge un ruolo fondamentale nella maturazione delle funzioni immunitarie ed endocrine (secrezione di timulina) del timo (azione diretta mediata da recettori ormonali sui timociti e sulle cellule epiteliali, azione indiretta mediata dall'IGF-1 o correlata alla biodisponibilità di Zn) (Fabris N. et al., 1984).

Gli **organi linfoidi secondari** sono le sedi in cui i linfociti già maturi vengono in contatto con gli antigeni estranei e subiscono conseguentemente la selezione clonale e la differenziazione antigene-dipendente; essi comprendono i linfonodi, la milza, il tessuto linfoide associato alle mucose ed alla cute ed infine alcuni aggregati di linfociti (scarsamente definiti anatomicamente) presenti nei tessuti connettivi ed in tutti gli organi, fatta eccezione per il sistema nervoso centrale.

In questa sede meritano una descrizione particolare i linfonodi del suino in quanto ritenuti morfologicamente diversi da quelli di tutti gli altri mammiferi domestici: essi infatti presentano un'inversione nella localizzazione della zona corticale e midollare.

Secondo Marcato P.S. (1998) "ogni linfonodo risulta dalla fusione o aggregazione di più *unità nodulari* di varie dimensioni, che costituiscono ciascuna un piccolo linfonodo autonomo". Tali unità nodulari risultano essere orientate in modo tale che la zona corticale si localizza al centro di ogni nodulo, mentre la zona midollare si localizza alla sua periferia. A sua volta la zona corticale centrale si presenta circondata dalla zona paracorticale. Ogni nodulo è servito da un singolo vaso linfatico afferente che, penetrando in profondità nella corticale, va a formare i seni linfatici paratrabeolari. In questo modo la linfa afferente viene veicolata nella zona più profonda del linfonodo. Per la presenza di numerosi noduli costituenti e di molteplici ili afferenti ed efferenti, drenanti regioni comuni a più linfonodi e che costringono la capsula ad introflettersi formando così delle fessure, il linfonodo del suino appare caratteristicamente lobulato.

Alcuni autori preferiscono parlare di *tessuto simil-corticale o nodulare* per definire meglio quella porzione di tessuto linfoide ricca di follicoli situata sia al centro di ogni unità nodulare, sia in periferia in posizione corticale subcapsulare. Si parla inoltre di un *tessuto simil-midollare o diffuso* per definire una particolare struttura a filtro, esclusiva del suino, formata da una fitta rete di fibre reticolari le cui maglie accolgono numerose cellule reticolari dendritiche (istiociti). Esso, come già detto in precedenza, si trova distribuito principalmente alla periferia del linfonodo e può essere condiviso da più noduli adiacenti, inoltre per la sua particolare struttura a filtro si dimostra essere relativamente impermeabile alle cellule che riciccolano attraverso la linfa (Tizard I.R., 1996).

Nel suino manca la caratteristica organizzazione in "cordoni linfatici-seni-trabeole" propria delle altre specie, mentre è possibile rinvenire seni paratrabeolari e sottocapsulari al margine del tessuto midollare stesso.

Per quanto concerne la circolazione ematica, i vasi sanguigni penetrano insieme ai vasi linfatici afferenti ed escono con quelli efferenti, inoltre a differenza degli altri mammiferi originano da un'estesa rete arteriosa localizzata sulla superficie linfonodale e penetrano attraverso la capsula nel punto in cui essa si trova a contatto con il tessuto diffuso (punto nel quale si trovano le arterie più grosse del linfonodo che si dirigono poi verso il tessuto nodulare periferico e centrale).

Ricircolazione linfocitaria

Tutti i linfociti e soprattutto i linfociti T riciccolano continuamente per tutto l'organismo al fine d'aumentare le probabilità di incontrare un antigene specifico.

In tutti i mammiferi i linfociti provenienti dal torrente circolatorio entrano nei tessuti attraversando gli spazi tra le cellule endoteliali delle venule post-capillari, mediante un meccanismo di *diapedesi*; una volta nei tessuti i linfociti possono rimanervi oppure guadagnare la circolazione linfatica, attraverso l'endotelio dei linfatici. In questo ultimo caso i linfociti possono quindi entrare in un linfonodo, tramite i vasi afferenti drenanti, oppure ritornare al sangue (vena cava craniale) mediante il dotto toracico.

Sono state individuate vie di ricircolo differenti per le cellule T vergini e per le cellule T memoria.

I linfociti T vergini lasciano il circolo sanguigno ed entrano direttamente nei linfonodi, nel tessuto linfoide associato alle mucose e nelle placche del Peyer, preferenzialmente attraverso le venule ad endotelio alto (HEV). Al contrario i linfociti memoria lasciano il circolo sanguigno attraverso le venule ad endotelio piatto e si localizzano nei siti di accumulo degli antigeni (siti di infiammazione tissutali, tessuti linfoidi associati alle mucose); raggiungono quindi i linfonodi attraverso i linfatici afferenti e riguadagnano il circolo tramite i vasi efferenti ed il dotto toracico che si svuota nella vena cava craniale.

Le HEV si sviluppano da venule ad endotelio piatto in risposta a citochine prodotte dagli stessi linfociti T stimolati dall'antigene; si ritrasformano quindi in venule ad endotelio piatto quando cessa lo stimolo antigenico linfonodale.

I linfociti T vergini migrano di preferenza attraverso le HEV piuttosto che attraverso le cellule ad endotelio piatto poiché essi presentano, sulla loro superficie, recettori di adesione specifici (L-

selectine, integrina $\alpha_{4\beta 7}$ etc.) per molecole presenti sull'endotelio di queste particolari venule (GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1). Tali recettori sono definiti "recettori di

localizzazione" ("homing") e possono influenzare la diversa efficienza con cui gli stessi linfociti si localizzano in particolari tessuti linfatici piuttosto che in altri. I ligandi presenti sulle HEV e specifici per i recettori di homing, vengono denominati "addressine vascolari" (Tabella 1).

L'attivazione del linfocita modifica il pattern di molecole di adesione superficiali, per cui sui linfociti T memoria sono presenti recettori di homing (VLA-4, LFA-1, CLA-1) differenti rispetto a quelli dei linfociti T vergini; questi recettori permettono ai linfociti T memoria di lasciare il circolo sanguigno (attraverso venule ad endotelio piatto) proprio in concomitanza del sito infiammatorio.

In definitiva, mentre i linfociti T vergini esprimono molecole di adesione che permettono loro di visitare indifferentemente tutti gli organi linfoidi secondari ma non le sedi di infiammazione, i linfociti T memoria esprimono molecole di adesione differenti che permettono loro di ritornare esattamente nell'organo linfoide secondario nel quale hanno acquisito la memoria antigenica e di ricircolare di preferenza nella sede tissutale dove è penetrato per la prima volta l'antigene (Sompayrac L., 1999).

Tabella 1. Recettori per la localizzazione ("homing") dei linfociti T (modificato da Abbas A.K., 1997)

RECETTORE DI HOMING	LIGANDO ENDOTELIALE	ESPRESSIONE SU	"HOMING"
L-selectine	GlyCAM-1 CD34 MadCAM-1	linfociti T vergini	Organi linfoidi periferici
Integrina $\alpha 4\beta 7$	MadCAM-1	linfociti T vergini	Tessuti linfoidi mucosali (placche Peyer e linfonodi mesenterici)
CD44	Ac ialuronico	linfociti T cellule epiteliali del SNC e del tessuto connettivo	Tessuti linfoidi mucosali, organi linfoidi periferici e siti infiammatori
VLA-4 (<i>integrina</i>) (<i>Vascular Leukocyte Antigen</i>)	VCAM-1	linfociti T memoria ed effettori	Tessuti linfoidi mucosali (placche Peyer) e siti infiammatori
LFA-1 (<i>Leukocyte Function Antigen</i>)	ICAM-1 ICAM-2	linfociti T memoria ed effettori	Endoteli non organo specifici e siti infiammatori
CLA-1 (<i>P-selectine</i>) (<i>Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen</i>)	E-selectine	linfociti T memoria	Siti flogistici cutanei

Analogamente a quanto abbiamo visto avvenire nelle altre specie animali, anche nel suino i linfociti penetrano nel linfonodo fondamentalmente secondo due vie: o aderendo direttamente alla parete endoteliale delle venule del linfonodo, mediante il meccanismo di diapedesi descritto in precedenza, oppure tramite le vie linfatiche afferenti, per i linfociti provenienti dalla linfa.

Meccanismo del tutto differente è invece quello che riguarda il ricircolo linfocitario in uscita dal linfonodo; mentre infatti nei mammiferi diversi dal suino i linfociti escono mediante le vie linfatiche efferenti e attraverso il dotto toracico ritornano al sangue (vena cava craniale), nel suino i linfociti guadagnano direttamente il circolo sanguigno attraverso le HEV della paracorticale (venule efferenti); è dimostrato infatti che la linfa efferente del suino contiene relativamente pochi linfociti.

L'immunità' cellulo-mediata

La risposta immunitaria cellulo-mediata è considerata il meccanismo fondamentale nelle difese immunitarie verso i microorganismi intracellulari (protozoi, funghi, virus e batteri), contro i quali gli anticorpi hanno effetto scarso o nullo. Inoltre interviene nei fenomeni di rigetto dei trapianti e nella sorveglianza immunitaria verso le cellule neoplastiche (Poli G. et al., 1996).

Essa è gestita dai linfociti T che (come del resto tutte le cellule del sangue) originano nel midollo osseo da una comune cellula staminale totipotente; da qui i linfociti T immaturi migrano poi nel timo dove vengono selezionati in base alla specificità antigenica ("self" e "non self") ed acquisiscono la competenza funzionale.

In base all'espressione di marcatori fenotipici superficiali, i linfociti T maturi si distinguono fondamentalmente in due popolazioni, una principalmente regolatrice (linfociti T Helper, LTh) ed una principalmente effettrice (linfociti T Citotossici, CTL).

L'attività effettrice dei linfociti T si esplica attraverso una azione citotossica diretta (linfociti T citotossici), oppure indirettamente tramite cellule ad attività fagocitaria o citolitica (macrofagi, cellule NK) che vengono attivate da citochine (IL-1, TNF- α , IFN- γ) liberate dai linfociti T stessi.

I linfociti T riconoscono e reagiscono con gli antigeni attraverso un particolare recettore (*T Cell Receptor*: "TCR"); tale recettore è un eterodimero che viene espresso sulla membrana dei linfociti in associazione ad un altro complesso molecolare detto CD3 (coinvolto nella trasmissione di segnali all'interno della cellula).

Il TCR è formato da due catene polipeptidiche α e β oppure γ e δ ; le percentuali di linfociti α/β e di linfociti γ/δ possono variare, anche ampiamente, a seconda della specie animale. Per il momento basti ricordare che le catene γ/δ vengono espresse in maggiori quantità in quelle specie in cui gli anticorpi non passano la placenta (ruminanti e suino) e quindi, in questi casi, si dimostrano importanti nel determinare una precoce ed immediata risposta cellulo-mediata.

La capacità del linfocita T di riconoscere e reagire con un antigene attraverso il suo specifico recettore è sottoposta ad un controllo di "restrizione genetica", cioè un linfocita T-helper verrà attivato solo se il suo TCR, associato alla molecola CD3 e CD4, riconoscerà e reagirà con l'epitopo antigenico verso cui è specifico.

I linfociti T riconoscono e quindi rispondono solo ad antigeni associati alla superficie cellulare e non ad antigeni solubili. Gli antigeni riconosciuti dai linfociti T sono in realtà porzioni di un agente patogeno estraneo (peptidi), che sono presentate sulla superficie di specifiche cellule definite "cellule presentanti l'antigene" o APCs (cellule dendritiche, cellule di Langerhans, macrofagi ecc.), solo dopo essere state elaborate dalla cellula stessa ed associate ad un complesso di proteine codificate da geni del *complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)* (Tabella 2), (Nossal G.J. V., 1993).

Per i linfociti T helper, l'epitopo antigenico viene presentato in associazione ad una molecola MHC di classe II mentre il linfocita T citotossico riconosce e sarà attivato solo se il suo TCR (associato alla molecola CD3 e CD8) reagirà con l'antigene associato alla molecola MHC di classe I sulla superficie cellulare.

Solo così il linfocita T, attraverso i suoi recettori, sarà in grado di riconoscere la specifica combinazione peptide-MHC e, successivamente, di attivarsi. L'interazione del TCR con l'antigene-MHC è un meccanismo necessario ma non sufficiente per spiegare l'attivazione linfocitaria che richiede fenomeni ed interazioni cellula-cellula più complessi (vedi linfociti T helper).

Tabella 2. MHC negli animali domestici, (da Tizard I.R., 1996).

MHC	SPECIE
BoLA (<i>Bovine leukocyte antigen</i>)	Bovino
ELA (<i>Equine leukocyte antigen</i>)	Equino
SLA (<i>Swine leukocyte antigen</i>)	Suino
OLA (<i>Ovine leukocyte antigen</i>)	Ovino
CLA (<i>Caprine leukocyte antigen</i>)	Caprino
DLA (<i>Dog leukocyte antigen</i>)	Canino
FLA (<i>Feline leukocyte antigen</i>)	Felino

La cellula T attivata libera particolari prodotti cellulari, noti sotto il nome di *citochine (linfocine)*, che hanno la funzione di promuovere la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T stessi nonché di altre componenti del sistema immunitario, tra cui i linfociti B specifici che cooperano quindi nella neutralizzazione dell'antigene. Tali linfocine determinano inoltre l'attivazione dei leucociti infiammatori, costituendo così un importante anello di congiunzione tra immunità specifica T e risposta infiammatoria.

I linfociti T-helper (LTh) costituiscono circa 1/3 della popolazione T matura ed hanno un ruolo centrale nell'innescò, sostegno e modulazione della risposta immunitaria cellulo-mediata; inducono la differenziazione dei linfociti citotossici in cellule effettrici ed intervengono nella cooperazione tra immunità umorale e cellulo-mediata. Inoltre amplificano la funzione di altre cellule, in particolare stimolano i macrofagi infiammatori ed attivano le cellule Natural Killer.

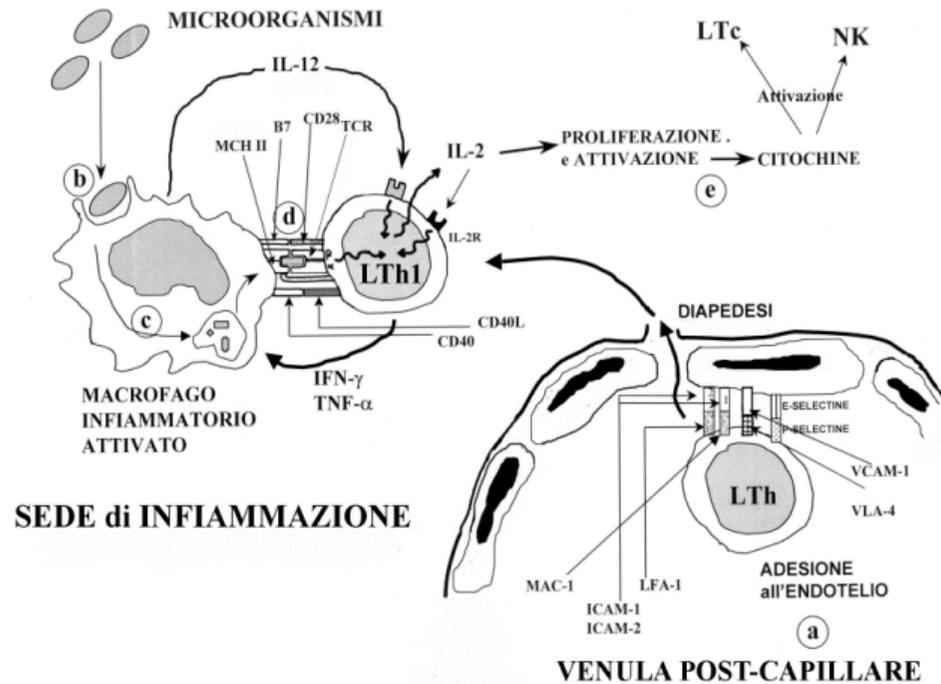


Fig. 1: Meccanismi della cooperazione cellulare nella risposta cellulo-mediata.

a) Il linfocita aderisce alle cellule endoteliali della vena post-capillare grazie all'interazione di molecole di adesione (selectine, integrine e immunoglobuline) e passa attraverso la parete vascolare raggiungendo il sito di infiammazione. **b e c)** Il macrofago infiammatorio fagocita, processa e presenta l'epitopo antigenico associato a molecole MHC di tipo II al linfocita T helper specifico. **d)** La combinazione Antigene/MHC II con il TCR, l'interazione di molecole di adesione tra le due cellule (B7/CD80 e CD40/CD40L) e l'azione dell'IL-12 prodotta dal macrofago innescano dei segnali intracellulari che attivano la sintesi di IL-2 ed altre citochine (IFN- γ e TNF- α) da parte del linfocita. **e)** Tali citochine stimolano la proliferazione e ed il differenziamento del linfocita T helper nonché attivano le cellule effettrici della risposta cellulo-mediata (Linfociti T citotossici, cellule NK e macrofagi)

Il legame con l'antigene associato all'MHC rappresenta il primo segnale nel processo di attivazione del linfocita. Il secondo segnale è rappresentato dall'interazione di molecole di adesione presenti sulla superficie del linfocita (CD28 e CD40L) che reagiscono specificatamente con proteine complementari presenti sulla superficie della cellula presentante l'antigene (CD80/CD86 e CD40) (Fig.1).

Il terzo segnale di attivazione è rappresentato da citochine (IL-1, IL-12) prodotte dalla cellula presentante l'antigene che agiscono sul linfocita stimolando la sintesi di ulteriori linfocine specifiche che possono influenzare il successivo indirizzo della risposta immunitaria.

Infatti i linfociti T helper si suddividono in due sottoclassi definite Th1 e Th2, che producono un pattern diverso di citochine ed attivano due tipi di risposte immunitarie differenti fra loro, ma al tempo stesso complementari e regolatrici l'una sull'altra (Fig.2).

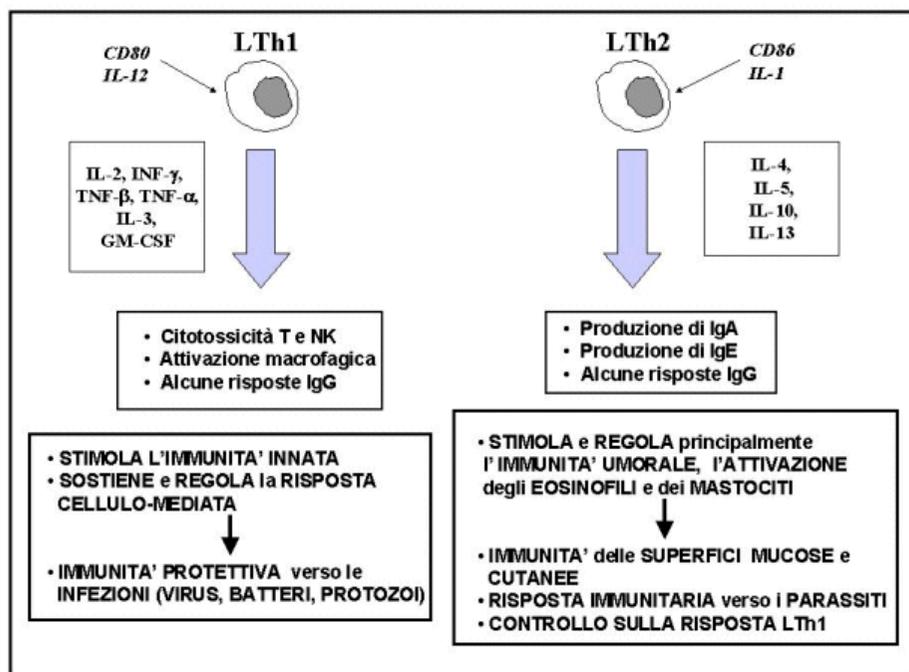


Fig.2: Sottopopolazioni di linfociti T-helper e finalizzazione della risposta immunitaria (modificata da Borghetti P. et al., 2000).

L'indirizzo verso un tipo di risposta rispetto all'altra sembra dipendere da alcuni importanti fattori quali: il tipo di antigene presentato dalla APCs (virus, batteri o parassiti), il tipo di APCs che presenta l'antigene, il tipo di citochine prodotte (IL-1 o IL-12) ed il tipo di citochina predominante nel microambiente in cui avviene la stimolazione del linfocita Thelper. Ad esempio se l'antigene presentato dalla APCs è un batterio o un virus, i macrofagi attivati risponderanno a questo attacco secernendo elevati quantitativi di IL-12; questa citochina, a sua volta, influenzerà il tipo di risposta immunitaria dirigendola verso la produzione del sottotipo linfocitario Th1.

I linfociti Th1 sintetizzano caratteristicamente IL-2, INF- γ e TNF- β poche ore dopo la stimolazione da parte dell'antigene, del legame con il CD80 e dell'azione dell'IL-12 e fungono primariamente da cellule effettrici nelle risposte immunitarie cellulo-mediate soprattutto nei confronti di agenti patogeni virali o batterici.

Al contrario i linfociti Th2 secernono prevalentemente IL-4, IL-5, IL-10 ed IL-13 parecchi giorni dopo la stimolazione con l'antigene, il CD86 e l'IL-1. Queste citochine stimolano primariamente la differenziazione dei linfociti B e la secrezione di immunoglobuline (IgG1, IgA ed IgE) mentre non hanno effetti stimolatori sulla risposta cellulo-mediate. I linfociti Th2 promuovono pertanto l'immunità umorale verso i batteri e finalizzano una risposta immunitaria protettiva nei confronti di molti parassiti.

Le citochine prodotte dai linfociti T helper vengono quindi caratteristicamente distinte a seconda dei due sottotipi (LTh1 e LTh2) che le producono (Tabella 3). In generale si può affermare che quelle prodotte dai linfociti Th1 tendono ad avere un'attività biologica del tutto o in parte contrastante a quella delle citochine prodotte dai linfociti Th2; in effetti è noto che sia l'IL-4 che l'IL-10 (derivanti dai linfociti Th2) sono potenti regolatori negativi dei linfociti Th1 (Borghetti P. et al., 2000).

Una seconda popolazione di cellule regolatrici è rappresentata dai linfociti T-soppressori ("suppressor"), il cui compito è fondamentalmente quello di sopprimere, direttamente o attraverso fattori solubili, l'attività di altre cellule immunitarie in particolare dei linfociti B, di alcuni linfociti T e dei macrofagi, limitando e modulando in tal modo la fase di attivazione della risposta immune, soprattutto di tipo anticorpale. Questo fatto se da una parte impedisce l'insorgenza di una risposta immunitaria eccessiva, dall'altra evita un'inutile produzione di anticorpi quando questi non sono più richiesti.

Tabella 4. Principali CD delle cellule della risposta immunitaria ed infiammatoria nei mammiferi, (da Tizard I.R., 1996).

CD	DISTRIBUZIONE
CD1	timociti, macrofagi, linfociti B cellule dendritiche
CD2 (LFA-2)	linfociti T e B
CD3	linfociti T
CD4	linfociti Th, timociti, monociti
CD5	linfociti T e B
CD8	linfociti T citotossici
CD14	macrofagi, granulociti
CD19	linfociti B, precursori linf. B, cellule dendritiche
CD21	linfociti B, cellule dendritiche
CD25	linfociti T attivati, linfociti B monociti
CD28	linfociti B attivati, linfociti T
CD40	linfociti B
CD44	linfociti T, B, monociti, granulociti
CD45	tutte le cellule del sangue eccetto gli eritrociti
CD56	Natural Killer
CD58 (LFA-3)	gran parte delle cellule
CD71	leucociti attivati
CD72	linfociti B
CD79a (Igg,MB1)	linfociti B maturi
CD79b (Igg, B29)	linfociti B maturi
CD80 (B7-1)	macrofagi
CD86 (B7-2)	linfociti B presentanti l'antigene

Sono state identificate due diverse sottopopolazioni di cellule suppressor: quella non antigene-specifica, deputata alla soppressione della risposta immunitaria nei confronti di qualsiasi antigene, e quella antigene-specifica deputata alla soppressione della risposta immunitaria nei confronti di un solo antigene .

Le cellule effettrici sono rappresentate dai linfociti T citotossici (CTL) che agiscono attaccando e distruggendo fisicamente le cellule bersaglio, in particolare cellule infette o comunque alterate. Come i linfociti T helper hanno un'insolita specificità per gli antigeni: essi infatti sono in grado di riconoscere solo peptidi legati a proteine codificate dai geni del complesso maggiore di

istocompatibilità (MHC) di classe I, espresse sulla membrana di cellule accessorie.

Ulteriore popolazione di linfociti T funzionalmente definita è rappresentata dalle cellule memoria. Queste cellule sono state sensibilizzate da un loro precedente incontro con un particolare antigene e rimangono quiescenti finché non lo incontrano nuovamente; quindi si riattivano in tempi molto brevi e dalla loro proliferazione origina un pool linfocitario sia di natura regolatore che effettore. Il loro ruolo fondamentale è quello di ridurre la durata del periodo di latenza, cioè il periodo che intercorre tra la stimolazione antigenica e lo sviluppo di un'immunità protettiva.

Esiste un'altra popolazione di linfociti (circa il 10%) che sembra non esprimere i markers di superficie che caratterizzano sia i linfociti B sia i T, e pertanto è stata per molto tempo denominata "non B e non T" o "null". Oggi questa terminologia è stata abbandonata dalla quasi totalità degli autori poiché alcune di queste cellule sono state, anche se solo parzialmente, meglio definite e fenotipizzate. Tra queste le meglio definite sono, nell'uomo, particolari cellule con caratteristiche morfologiche paragonabili a *grossi linfociti granulari* (LGL, *Large Granular Lymphocyte*), con dimensioni maggiori di circa il 50% rispetto ai normali linfociti e che presentano abbondante citoplasma contenente granuli azzurrofilii e nucleo reniforme. Tuttavia questa particolare morfologia cellulare non sembra essere confermata nella specie suina poiché tali linfociti sembrano essere del tutto paragonabili sia per forma, sia per dimensione e sia per contenuto, alle altre sottopopolazioni linfocitarie.

Per tali cellule non si hanno indicazioni precise circa la loro origine ma per la caratteristica attività citolitica che manifestano vengono definite cellule killer e *natural killer*.

Sottopopolazioni linfocitarie nella specie suina

Le sottopopolazioni di linfociti T, precedentemente differenziate su base funzionale (cellule regolatrici, cellule effettrici e cellule memoria), vengono fenotipicamente distinte in base all'espressione o meno di alcuni marcatori di superficie (CD) (Fig.3). Il termine "CD" sta per "*cluster di differenziazione*" e viene estrapolato da un sistema di nomenclatura unificato utilizzato in medicina umana per descrivere il fenotipo dei leucociti umani; esso si riferisce ad una molecola riconosciuta da un cluster o gruppo di anticorpi monoclonali, che può essere usata per identificare la linea o lo stadio differenziativo dei linfociti, distinguendo in tal modo una classe di linfociti dall'altra ed una sottopopolazione da un'altra (Tabella 4).

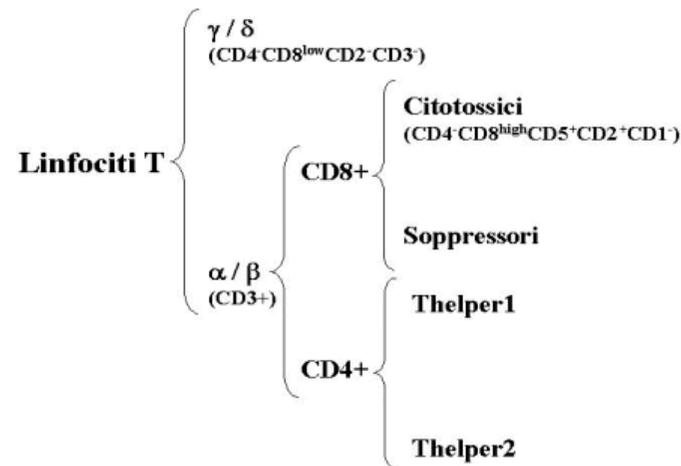


Fig. 3. Classificazione dei Linfociti T

L'espressione dei principali marcatori di superficie (CD4 e CD8) nei linfociti T extratimici del suino, differisce completamente da quella nota per le altre specie animali: infatti, oltre ai fenotipi T-helper (CD4⁺CD8⁻) e T-citotossico (CD4⁺CD8⁺), in questa specie esistono altre due sottopopolazioni, una caratterizzata da cellule doppio negative (CD4⁻CD8⁻) ed una caratterizzata da cellule doppio positive (CD4⁺CD8⁺), che sembrano prevalere nel compartimento extratimico.

Mentre la sottopopolazione CD4⁻CD8⁻ è comune anche ad altri mammiferi ungulati (pecora e bovino), quella CD4⁺CD8⁺ è presente unicamente nel suino ed in questa specie si quantifica come la popolazione maggiormente rappresentata nel sangue periferico (Saalmuller A. et al., 1994). Inoltre la percentuale di CD4⁺CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ sembra essere inversamente correlata (Saalmuller A. et al., 1987).

Queste quattro sottopopolazioni, che mostrano notevole variabilità individuale, sono reperibili sia nel timo che nel sangue periferico del suino, tuttavia possono essere agevolmente differenziate grazie all'espressione o meno del marcatore superficiale CD1: infatti le sottopopolazioni timiche presentano il CD1 (forme immature), anche se con diversa espressione, mentre le sottopopolazioni extratimiche (del sangue circolante e residenti nei tessuti linfoidi periferici) non esprimono il CD1 (forme mature).

La popolazione di linfociti T caratterizzata dall'espressione del CD4 (CD4⁺) appare abbastanza omogenea ed in base alla coespressione o meno dell'antigene CD8, può essere ulteriormente suddivisa in due diverse sottopopolazioni. La prima manifesta la caratteristica funzione di *T-helper* ed è definita dal fenotipo CD4⁺CD8⁻ (comune alle altre specie), la seconda è propria solo del sistema immunitario suino ed è fenotipicamente caratterizzata dalla coespressione di entrambi i marcatori di superficie; per questo motivo viene definita "doppio positiva" CD4⁺CD8⁺. Entrambe le due frazioni linfocitarie manifestano un'omogenea espressione degli antigeni CD2 e CD5 e mostrano il fenotipo morfologico tipico del linfocita maturo (CD1⁺).

Al contrario la sottopopolazione di linfociti T caratterizzata dall'espressione del CD8 (CD4⁻CD8⁺) appare abbastanza eterogenea, coesprime il marcatore di superficie CD2 ed a seconda dell'espressione o meno dell'antigene di superficie CD5, può essere ulteriormente suddivisa in due diverse frazioni.

Tabella 4. Principali CD delle cellule della risposta immunitaria ed infiammatoria nei mammiferi, (da Tizard I.R., 1996).

CD	DISTRIBUZIONE
CD1	timociti, macrofagi, linfociti B cellule dendritiche
CD2 (LFA-2)	linfociti T e B
CD3	linfociti T
CD4	linfociti Th, timociti, monociti
CD5	linfociti T e B
CD8	linfociti T citotossici
CD14	macrofagi, granulociti
CD19	linfociti B, precursori linf. B, cellule dendritiche
CD21	linfociti B, cellule dendritiche
CD25	linfociti T attivati, linfociti B monociti
CD28	linfociti B attivati, linfociti T
CD40	linfociti B
CD44	linfociti T, B, monociti, granulociti
CD45	tutte le cellule del sangue eccetto gli eritrociti
CD56	Natural Killer
CD58 (LFA-3)	gran parte delle cellule
CD71	leucociti attivati
CD72	linfociti B
CD79a (Iga,MB1)	linfociti B maturi
CD79b (Igb,B29)	linfociti B maturi
CD80 (B7-1)	macrofagi

CD72	linfociti B
CD79a (Igg,MB1)	linfociti B maturi
CD79b (Igg, B29)	linfociti B maturi
CD80 (B7-1)	macrofagi
CD86 (B7-2)	linfociti B presentanti l'antigene

La frazione definita dal fenotipo $CD5^+CD4^+CD8^+$ contiene cellule con bassa espressione dell'antigene CD8 ($CD8^{low}$) e caratterizza le cd "cellule natural killer" (NK), cellule dotate di attività citolitica naturale nei confronti di alcuni virus e delle cellule neoplastiche e che esprimono i marcatori superficiali CD56 e CD16. In contrasto, la frazione definita dal fenotipo $CD5^+CD4^+CD8^+$, con elevata espressione dell'antigene CD8 ($CD8^{high}$), rappresenta la popolazione dei *linfociti T citotossici* (CTL), (Saalmuller A. et al., 1994).

A differenza dell'uomo, nella specie suina si è riscontrata un'inversione del rapporto CD4/CD8 delle sottopopolazioni linfocitarie T; infatti il suino presenta normalmente una percentuale pari al 25% circa di linfociti T helper ($CD4^+CD8^-$) ed una percentuale pari al 40% circa di linfociti T citotossici ($CD4^+CD8^+$), risultando in un rapporto CD4/CD8 (*ratio*) pari a 0.6, di molto inferiore a quello descritto nella specie umana (1,5-2) (Lunney J.K. et al., 1987).

Come precedentemente affermato sono stati identificati due differenti tipi di TCR (recettore dei linfociti T), il TCR α/β e il TCR γ/δ , presenti in percentuali diverse a seconda della specie animale. In particolare il TCR α/β viene espresso in percentuali maggiori nei linfociti T del sangue periferico dell'uomo (95%) e dei roditori, al contrario nel suino (e nei ruminanti) tale percentuale si riduce notevolmente (15%-30%) mentre aumenta la percentuale di espressione del TCR in forma γ/δ (30%-40%) (Tabella 5), (Thome M. et al., 1994).

Nel sangue periferico del suino sono stati individuati quattro differenti sottopopolazioni cellulari esprimenti il TCR in forma α/β ($CD4^+CD8^+$; $CD4^+CD8^{low}$; $CD4^+CD8^{high}$) e tre sottopopolazioni esprimenti il TCR in forma γ/δ ($CD2^+CD4^+CD8^-$; $CD2^+CD4^+CD8^{low}$; $CD2^+CD4^+CD8^+$).

E' stata inoltre descritta un'altra popolazione, presente in percentuali elevate, avente fenotipo $CD2^+CD3^+CD4^+CD8^{low}$ e TCR γ/δ e che manifesta attività natural killer (Binns R.M., 1994).

Considerando che l'attività ed il fenotipo delle due principali sottopopolazioni linfocitarie (T-helper e T-citotossiche) si sono rilevate essere del tutto paragonabili a quelle delle altre specie animali, focalizzeremo l'attenzione principalmente sulle particolarità rinvenute nella specie suina, e cioè sul fenotipo $CD4^+CD8^+$ e sul fenotipo $CD4^+CD8^-$.

Tabella 5. Markers (CD) delle cellule T del sangue periferico (modificato da Tizard I.R., 1996).

Markers	% di cellule			
	Topo	Bovino	Suino	Pecora
TCR α/β	85-95	5-30	14-34	5-30
TCR γ/δ	5-15	45-50	31-39	22-68
CD2	-	41-60	58-72	10-36
CD4	-	8-28	23-43	8-22
CD8	-	10-30	17-39	4-22

La sottopopolazione linfocitaria caratterizzata dal fenotipo doppio positivo $CD4^+CD8^+$ è sottoposta a restrizione genetica MHC II e costituisce una percentuale abbastanza elevata nel sangue periferico di suino (dal 10% al 60%); inoltre tale percentuale sembra aumentare sensibilmente in seguito alla stimolazione "in vitro" con vari antigeni (tra cui il virus della malattia di Aujeszky) e con l'età dell'animale. È stato infatti dimostrato che in suini di età superiore ai 3 anni la percentuale di queste cellule può arrivare fino a più del 60%, mentre in suinetti di età inferiore all'anno tale percentuale scende al di sotto del 15% (Pescovitz M.D. et al., 1994).

Anche nell'uomo, probabilmente come conseguenza di alcune forme patologiche, è stata individuata una percentuale molto bassa di queste cellule (inferiore al 3%). Tuttavia molte sono le

differenze riscontrate tra l'uomo ed il suino. La più evidente è, come affermato in precedenza, la notevole differenza percentuale riscontrata nel sangue periferico del suino rispetto a quello dell'uomo (60% rispetto al 3%). Un'altra differenza importante è lo stato di attivazione in cui si trovano le cellule: mentre infatti le cellule suine si sono rivelate essere fondamentalmente in uno stato di riposo e di piccole dimensioni, quelle umane hanno manifestato caratteri di attivazione, dimostrabili dall'espressione di alcuni marcatori come il CD25 ed il CD71. Ancora, mentre il fenotipo delle cellule suine si è dimostrato essere tendenzialmente "fisso" (cioè anche in coltura esse continuano ad esprimere contemporaneamente entrambi i CD, CD4 e CD8), le cellule umane poste nelle medesime condizioni hanno perso la capacità di esprimere il marcatore superficiale CD8.

In entrambe le specie, tuttavia, si è evidenziata la mancanza di espressione dell'antigene CD1, a dimostrazione del fatto che queste cellule sono effettivamente forme mature; inoltre entrambe le specie hanno manifestato il medesimo livello di espressione dell'antigene CD8, che nella sottopopolazione doppio positiva si è dimostrato essere di molto inferiore rispetto a quello evidenziato nella sottopopolazione singolo positiva (CD4⁺CD8⁺). Infatti, sia per il suino che per l'uomo si preferisce parlare in modo più preciso di fenotipo *CD4⁺CD8^{low}*.

Per quanto riguarda la funzione di queste particolari cellule sono state fatte varie ipotesi, ma per il momento la più accreditata sembra essere quella che le fa assomigliare a *cellule T della memoria*. Esse infatti sembrano possedere alcune caratteristiche funzionali proprie delle cellule T-helper, dimostrando in tal modo di essere una popolazione dotata di attività funzionale propria; inoltre è stato dimostrato che esse aumentano in percentuale con l'aumentare dell'età dell'animale, iniziando in percentuali molto basse (circa il 2%) in suinetti di soli 3 giorni di vita, aumentando gradatamente fino al compimento dell'anno di età (circa il 15%) per poi arrivare a circa il 60% nell'età adulta (Pescovitz M.D. et al., 1994).

Alcuni studi condotti in vitro hanno suggerito che tali cellule potevano derivare da cellule T-helper a seguito di una riattivazione avvenuta per un secondo contatto con il medesimo antigene; secondo questa ipotesi la cellula T-helper (CD4⁺CD8⁻) avrebbe acquisito il marcatore superficiale CD8 dopo essere stata sensibilizzata da un precedente incontro con l'antigene e lo avrebbe poi mantenuto anche dopo la reversione a piccolo linfocita quiescente, diventando in tal modo una cellula della memoria. Varie altre ipotesi devono comunque essere ancora avvalorate; una di queste asserisce la possibilità che queste cellule possano rappresentare una linea del tutto indipendente e senza alcuna relazione con le cellule mature singolo positive (CD4⁺ o CD8⁺) (Pescovitz M.D. et al., 1994).

La sottopopolazione linfocitaria caratterizzata dal fenotipo doppio negativo CD4⁻CD8⁻ si presenta molto eterogenea ed è rilevabile in percentuali abbastanza elevate (40%-50%, Tizard I.R., 1996) nel sangue periferico del suino. A differenza della sua controparte positiva, la sottopopolazione doppio negativa non è propria di questa specie ma viene riscontrata anche in altri mammiferi ungulati, come il bovino e la pecora (Joling P. et al., 1994). In base all'espressione o meno del marcatore superficiale CD2 è possibile suddividere tale popolazione in due frazioni: una CD2⁺ e l'altra CD2⁻.

La frazione che esprime il CD2 (definito dal fenotipo CD4⁻CD8⁻CD2⁺) viene riscontrata in percentuali relativamente basse nel sangue periferico del suino (6,4%-30%, Saalmuller A. et al., 1989) e rimane prevalentemente confinata a livello di organi linfoidi secondari (milza e linfonodi); presenta il TCR in forma α/β .

Al contrario la frazione non esprimente il CD2 (definito dal fenotipo CD4⁻CD8⁻CD2⁻) si trova distribuita principalmente nel sangue periferico (66%-95%, Saalmuller A. et al., 1994) e presenta il TCR in forma γ/δ (Tizard I.R., 1996).

Nella specie suina, come del resto in tutti i mammiferi, il marcatore superficiale CD2 dei linfociti T (e delle cellule NK) sembra rappresentare una importante molecola di adesione intercellulare. Il suo ligando LFA-3 (CD58) è espresso su un'ampia varietà di cellule, sia ematopoietiche che non ematopoietiche nonché dall'endotelio vascolare. Il legame tra il CD2 ed il ligando LFA-3 promuove l'adesione cellula-cellula, momento importante per l'interazione tra i linfociti T e le APCs, tra i linfociti citotossici e le cellule bersaglio, e per la penetrazione dei linfociti stessi nei tessuti linfoidi (Abbas A.K. et al., 1997). Tale interazione può favorire, inoltre, il legame con eritrociti xenogenici.

La maggior parte delle cellule doppio negative rilevate nella specie suina appartiene al fenotipo che non esprime tale recettore (CD2⁻) e, proprio per questo motivo, viene maggiormente ritrovata a livello ematico. La caratteristica mancanza di espressione del recettore CD2 e la conseguente incapacità di legare eritrociti xenogenici rende ragione della denominazione di "cellule null" conferita a questo secondo subset (Saalmuller A. et al., 1989).

Come affermato in precedenza, la sottopopolazione doppio negativa si configura composta da elementi cellulari eterogenei, le cui caratteristiche funzionali sono state per molti autori oggetto di studio, nel tentativo di fornirne una caratterizzazione più dettagliata. Purtroppo fino ad oggi questi studi non hanno portato ad alcun risultato tangibile ed ancora poco si sa circa le reali funzioni (sia in vitro sia in vivo) di questa particolare sottopopolazione (Tabella 6).

Tabella 6. Sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico della specie suina

Linfociti	Fenotipo	TCR
T helper	CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD2 ⁺ CD5 ⁺ CD3 ⁺ CD1 ⁻	α/β
T memoria	CD4 ⁺ CD8 ^{low} CD2 ⁺ CD5 ⁺ CD3 ⁺ CD1 ⁻	α/β
Natural Killer	CD4 ⁻ CD5 ⁻ CD8 ^{low} CD2 ⁺ CD3 ⁻	/
T citotossici	CD4 ⁻ CD8 ^{high} CD5 ⁺ CD2 ⁺ CD3 ⁺ CD1 ⁻	α/β
Null	CD4 ⁻ CD8 ^{low} CD2 ⁻ CD3 ⁻	γ/δ

Conclusioni

In medicina il suino viene oggi considerato un utile modello sperimentale per le similitudini fisiologiche con l'uomo e proprio per questo motivo lo studio del suo sistema immunitario sta assumendo crescente interesse al fine di poterlo utilizzare come possibile fonte di organi per gli xenotrapianti. Tuttavia tale studio in questa specie, si presenta particolarmente complesso ed oggetto di continui approfondimenti da parte dei ricercatori.

Ancora sono da definire alcuni aspetti e particolarità di specie soprattutto in relazione al ruolo di certe popolazioni linfocitarie che risultano particolarmente rappresentate nella specie suina (sottopopolazioni doppio positiva, doppio negativa e γ/δ) e che potrebbero avere una importanza critica nella risposta difensiva verso gli agenti patogeni.

Inoltre lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie associato ad altri parametri di valutazione quantitativa della risposta cellulo-mediata (tests di blastogenesi) può essere applicato all'analisi dell'effetto che fattori endogeni ed esogeni di varia natura (fattori ambientali, vaccinali, manageriali, alimentari, virus, batteri, parassiti, etc.) possono esplicare sull'efficacia della risposta immunitaria, attivando i sistemi adattativi dello "stress" in maniera prolungata e con particolare intensità. È infatti risaputo che lo stress determina una disregolazione della risposta immunitaria ed infiammatoria mediata dalla liberazione di glicocorticoidi, di CRH, di ACTH e delle β -endorfine.

Il suino, in particolare, è un animale molto sensibile a vari fattori stressanti quali: lo svezzamento, il mescolamento delle nidi, la definizione delle gerarchie sociali, le variazioni delle condizioni climatiche e degli spazi disponibili, le condizioni di trasporto. Tali situazioni di stress possono causare profonde modificazioni dell'immunità cellulo-mediata, spesso in senso immunodepressivo; in particolare la riduzione dell'attività NK, la riduzione della capacità dei linfociti T a rispondere a stimoli mitogeni sia in vitro (PHA) che in vivo (infezioni, vaccinazioni).

Si è inoltre dimostrato che anche numerosi tossici naturali, come le micotossine, hanno un'azione immunosoppressiva; in particolare essi possono provocare sia una diminuzione del numero dei linfociti circolanti (linfopenia) sia una riduzione della capacità dei linfociti T a rispondere a stimoli mitogeni aspecifici (PHA) e specifici (Mocchegiani E. et al., 1998). Da ciò consegue una diminuita risposta immunitaria cellulo-mediata che rende ragione della incrementata suscettibilità del suino ad alcune malattie infettive in corso di aflattossicosi (Harvey R.B. et al., 1992).

Lo studio e la valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie della specie suina risulta quindi di notevole interesse poiché oltre a fornire un terreno adatto per la medicina sperimentale e comparata, può fornire utili indicazioni sulla patogenesi di alcune importanti patologie infettive di natura virale proprie di questa specie ed in particolare di virus emergenti che possono interagire drasticamente sulla cooperazione tra cellule macrofagiche e linfocitarie provocando immunodepressione (Circovirus).

In tale ottica potrebbe essere di notevole interesse scientifico valutare in modo sia quantitativo che qualitativo (grazie anche al supporto di metodiche come la citofluorimetria) quali, fra le sottopopolazioni linfocitarie T sono maggiormente coinvolte nella risposta immunitaria e quali subiscono l'azione citotossica del virus in modo diretto o indiretto, se mediato dall'attivazione di altre cellule (macrofagi) che vengono stimulate dal virus stesso.

Parole chiave: suino, immunità cellulo-mediata, linfociti del sangue periferico, CD4 e CD8.

Key words: pig, cell-mediated immunity, periferic lymphocytes, CD4 and CD8.

RIASSUNTO - La proposta degli autori è lo studio dell'immunità cellulo-mediata nella specie suina poiché in questa specie si sono rilevate numerose ed interessanti differenze rispetto agli altri mammiferi, compreso l'uomo. Il suino, infatti, oltre a presentare una struttura invertita dei tessuti linfonodali (corticale, midollare) manifesta anche un'insolita via di ricircolo dei linfociti ed un

diverso rapporto tra linfociti T CD4⁺ (a funzione T-helper) e linfociti T CD8⁺ (a funzione citotossica) nel sangue periferico. Inoltre, sempre in questa sede, si osserva l'esistenza di una non convenzionale sottopopolazione di linfociti T CD4⁺CD8⁺ (doppio positiva) non rilevabile in nessun'altra specie (eccetto l'uomo in talune forme patologiche) e di un'altra sottopopolazione di linfociti T CD4⁺CD8⁻ (doppio negativa), osservata oltre che nella specie suina, anche nella specie bovina ed ovina. Infatti il sangue periferico del suino contiene un'elevata percentuale di linfociti T che posseggono la forma γ/δ del T-cell-receptor (TCR). Questi linfociti T γ/δ rappresentano una prima linea difensiva contro gli agenti patogeni, risultando quindi di estrema importanza nelle fasi precoci della risposta cellulomediata, in particolare in quegli animali, come il suino, in cui le immunoglobuline non attraversano la placenta. In un'ottica più ampia l'approfondimento dello studio del sistema immunitario del suino oltre a fornire un terreno adatto per la medicina sperimentale e comparata, può fornire utili indicazioni nella valutazione della risposta immunitaria in corso di trattamenti vaccinali, in relazione all'influenza di stress ambientali, nonché nella patogenesi di alcune importanti malattie infettive di natura virale proprie di questa specie, ed in particolare di virus emergenti che possono interagire drasticamente sulla cooperazione tra cellule macrofagiche e linfocitarie, provocando immunodepressione (Circovirus).

SUMMARY - The aim of the authors is to study the cell-mediated immunity of swine because of the significant differences found in this species compared to other mammals. In fact the pig has an inverted lymphonodal structure and shows an unusual way of lymphocyte circulation. In addition, it shows a different CD4⁺/CD8⁺ ratio in peripheral blood and it also shows the presence of two particular subsets of T lymphocyte: the double positive subset (CD4⁺CD8⁺) is unique of swine and it is not detected in significant numbers in other species, the double negative one (CD4⁺CD8⁻) is also found in sheep and in cattle. The peripheral blood of pig is characterized by an high proportion of γ/δ T cells which are able to bind a wide variety of antigens, suggesting that they are of major functional significance. These γ/δ T cells are very important because they represent the first defensive line against various pathogens and they may also be required to provide an early cell-mediated response in animals whose immunoglobulins fail to cross the placenta (pig, horse). The investigation of the swine immune-system may help human and veterinary experimental researchers; particularly, it can provide helpful indications about the pathogenesis of some important new viral infectious disease of swine that can interact dramatically on the cooperation between macrophagic cells and lymphocytic cells (Circovirus).

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.: *Cellular and Molecular Immunology*. W.B.Saunders Company, USA, 1997.
2. Bach J.F., Dardenne M., Pléau J.M., Pléau R.: *Biochemical characterization of a serum thymic hormone*. Nature, 1977, 266, 55.
3. Bach J.F., Dardenne M.: *Thymulin, a zinc-dependent hormone*. Med.Oncol. & Tumor Pharmacother., 1989, 6:1, 25-29.
4. Becker B.A., Misfeldt M.L.: *Evaluation of the Mitogen-Induced Proliferation and Cell Surface Differentiation Antigens of Lymphocytes from Pigs 1 to 30 Days of Age*. J.Anim.Sci, 1993, 71, 2073-2078.
5. Bianchi A.T.J., Zwart R.J., Jeurissen S.H.M., Moonen-Leusen H.W.M.: *Development of the B-and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach*. Vet.Immunol. Immunopathol., 1992, 33, 201-221.
6. Binns R.M., Duncan I.A., Powis S.J., Hutchings A., Butcher G.W.: *Subsets of null and γ/δ T-cell receptor+ T lymphocytes in the blood of young pigs identified by specific monoclonal antibodies*. Immunology, 1992, 77, 219-227.
7. Binns R.M.: *The Null/ γ/δ TCR+ T cell family in the pig*. Vet. Immunol.Immunopathol., 1994, 43, 69-77.
8. Borghetti P., Cantoni A.M., Di Lecce R., Corradi A.: *L'immunità cutanea nel cane - Nota I, aspetti morfofunzionali*. Supplemento ODV, Giugno 2000, 6, 23-29.
9. Borghetti P., Cantoni A.M., Di Lecce R., Corradi A.: *L'immunità cutanea nel cane - Nota II, attivazione e regolazione della risposta immunitaria*. Supplemento ODV, Agosto 2000, 7/8, 14-21.
10. Brown O.A., Sosa Y.E., Dardenne M., Pléau J., Goya R.G.: *Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent*. Neuroendocr., 1999, 69:1, 20-27.
11. Burshtyn D.N., Long E.O.: *Regulation through inhibitory receptors: lessons from natural killer cells*. Cell Biology, 1997, 7, 473-479.
12. Consolini R., Legitimo A., Calleri A., Milani M.: *Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life*. Clin.Exp.Immunol., 2000, 121, 444-447.
13. Cung M.T., Marraud M., Lefrancier P., Dardenne M., Bach J.F., Lussac J.P.: *NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. An investigation of the Zn (II)-nonapeptide complexes (thymulin)*. J.Biol.Chem, 1988, 263, 5574.
14. Dardenne M., Pléau J.M., Blouquit J.Y., Bach J.F.: *Characterization of facteur thymique serique (FTS) in the hymus. II. Direct demonstration of the presence of FTS in thymosin fraction V*. Clin.Exp.Immunol., 1980, 42:3, 477-482.
15. Del Gobbo V.: *Immunologia ed Immunoematologia*. Piccin, Padova, 2000.
16. Evans D.L., Jaso-Friedmann L.: *Natural killer (NK) cells in domestic animals: phenotype, target cell specificity and cytokine regulation*. Vet. Res.Comm., 1993, 17, 429-447.
17. Fabris N., Mocchegiani E., Amadio L., Zannotti M., Licastro F., Franceschi C.: *Thymic hormone deficiency in normal aging and Down's syndrome: is there a primary failure of the thymus?*. Lancet 1984, 1, 983-986.
18. Fraker P.J., Gershwin M.E., Good M.A., Prasad A.S.: *Interrelationship between zinc and immune function*. Fed.Proc., 1985, 45, 1474-1479.
19. George A.J.T., Ritter M.A.: *Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping?*. Immunol.Today, 1996, 17:6, 267-272.
20. Harvey R.B., Elissalde M.H., Kubena L.F., Weaver E.A., Corrier D.E., Clement B.A.: *Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts*. Am.J.Vet.Res., 1992, 53:10, 1966-1970.
21. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Capra J.D.: *Immuno-Biology; the immune system in health and disease*. Fourth edition, Elsevier Science, London, 1999.
22. Joling P., Bianchi A.T.J., Kappe A.L., Zwart R.J.: *Distribution of lymphocyte subpopulations in Thymus, spleen and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age*. Vet.Immunol.Immunopathol., 1994, 40, 105-117.
23. Lunney J.K., Pescovitz M.D.: *Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations*. Vet.Immunol.Immunopathol., 1987, 17, 135-144.
24. Lunney J.K.: *Characterization of swine leukocyte differentiation antigens*. Immunol.Today, 1993, 14:4, 147-148.
25. Marcato P.S.: *Patologia suina - Testo e atlante*. Ed.Agricole, Bologna, 1998.
26. Mocchegiani E., Paolucci P., Balsamo A., Cacciari E., Fabris N.: *Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in humans*. Horm.Res., 1990, 33, 248-255.
27. Mocchegiani E., Corradi A., Santarelli L., Tibaldi A., De Angelis E., Borghetti P., Bonomi A., Fabris N., Cabassi E.: *Zinc, thymic endocrine activity and mitogen responsiveness (PHA) in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1*. Vet.Immunol.Immunopathol., 1998, 62, 245-260.
28. Murtaugh M.P.: *Porcine cytokines*. Vet.Immunol.Immunopathol., 1994, 43, 37-44.
29. Nossal G.J.V.: *Vita, morte e sistema immunitario*. Le Scienze, 1993, 303, 21-21-38.
30. Pescovitz M.D., Sakopoulos A.G., Gaddy J.A., Husmann R.J., Zuckermann F.A.: *Porcine peripheral blood CD4⁺/CD8⁺ dual expressing T-cells*. Vet.Immunol.Immunopathol., 1994, 43, 53-62.
31. Pléau J.M., Dardenne M., Blouquit Y., Bach J.F.: *Structural study of circulating thymic factor: a peptide isolated from pig serum. II. Aminoacid sequence*. J.Biol.Chem., 1977, 252, 8045.
32. Pléau J.M., Dardenne M., Bach J.F.: *The serum thymic factor (FTS). Chemical and biological aspects*. Mol.Cell.Biochem., 1981, 4:41, 67-72.
33. Pléau J.M., Gastinel L.N., Bach J.F.: *Thymulin*. Meth.Enzimol., 1985, 116, 269-279.
34. Poli G., Cocilovo A.: *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*. UTET, Torino, 1996.
35. Prasad A.S.: *Clinical, endocrinological and biochemical effects of zinc-deficiency*. J.Clin.Endocrinol.Metab., 1985, 14, 567-589.
36. Prasad A.S.: *Zinc and immunity*. Mol.Cell.Biochem., 1998, 188:1-2, 63-69.
37. Roitt I., Brostoff J., Male D.: *Immunologia*. IV ed., Zanichelli, Bologna, 1994.
38. Roth J.A. in Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J.: *Malattie del suino*. Piccin, Padova, 1996.
39. Saalmuller A., Reddehase M.J., Buhning H.J., Jonjic S., Koszinowski U.H.: *Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocyte*. Eur.J.Immunol., 1987, 17, 1297.

40. Saalmuller A., Hirt W., Reddehase M.J.: *Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocyte*. Eur.J.Immunol., 1989, 19, 2011-2016.
41. Saalmuller A., Bryant J.: *Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines*. Vet.Immunol.Immunopathol., 1994, 43, 45-52.
42. Saalmuller A., Hirt W., Maurer S., Weiland E.: *Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen*. Immunology, 1994, 81, 578-583.
43. Shankar A.H., Prasad A.S.: *Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection*. Am.J.Cli.Nutr., 1998, suppl.68, 447S-463S.
44. Sinkora M., Sinkora J., Rehakova Z., Splichal I., Yang H., Parkhouse R.M.E.: *Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs*. Immunology, 1998, 95, 595-603.
45. Sompayrac L.: *How the immune system works*. Blackwell Science, USA, 1999.
46. Tizard I.R.: *Veterinary Immunology, an introduction*. Fifth edition, W.B.Saunders Company, USA, 1996.
47. Thome M., Hirt W., Pfaff E., Reddehase M.J., Saalmuller A.: *Porcine T-cell receptors: molecular and biochemical characterization*. Vet. Immunol.Immunopathol., 1994, 43, 13-18.
48. Tlaskalova-Hogenova H., Mandel L., Trebichavsky I., Kovaru F., Barot R., Sterzl J.: *Development of immune responses in early pig ontogeny*. Vet. Immunol.Immunopathol., 1994, 43, 135-142.
49. Travaglini P., Mocchegiani E., Togni E.: *Thymulin and zinc circulating level in patient with GH and PRL secreting pituitary adenomas*. Int.J.Neurosci., 1990, 51, 269-271.
50. Travaglini P., Mocchegiani E., De Min C., Re T., Fabris N., Faglia G.: *Zinc and bromocriptine long-term administration in patients with prolactinomas: effects on prolactin and thymulin circulating levels*. Int.J.Neurosci., 1991, 59, 119-125.
51. Travaglini P., Mocchegiani E., De Min C., Re T., Fabris N.: *Modifications of thymulin titres in patients affected with prolonged low or high zinc circulating levels are independent of patient's age*. Arch.Gerontol.Geriatr., 1992, suppl.3, 349-366.
52. Wara D.W.: *Thymic hormones and the immune system*. Adv.Pediatr., 1981, 28, 229-270.
53. Yang H., Parkhouse R.M.E.: *Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues*. Immunology, 1996, 89, 76-83.

LA GELATINA REALE NELL'ALIMENTAZIONE DEL CONIGLIO DA CARNE¹

Bonomi A., Bonomi B.M., Quarantelli A.²

¹Ricerche effettuate con il contributo finanziario del M.U.R.S.T. (quota 60%).

² *Indirizzo per corrispondenza: Prof. A. Bonomi - Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione. Facoltà di Medicina Veterinaria. Via del Taglio, 8 43100 PARMA. Tel. 0521-902620 - Fax 0521 - 902622; e-mail: bonomi@unipr.it*

INTRODUZIONE

Le indagini condotte da biologi appassionati di apicoltura sembrano abbiano sortito risultati tali da avvalorare, fra le tante ipotesi, quella secondo la quale la causa determinante l'eccezionale sviluppo e la straordinaria vitalità dell'ape regina, debba essere quasi sicuramente identificata coll'alimento a quest'ultima riservato nei primi giorni della sua esistenza, alimento che gli studiosi hanno definito con gli appellativi di gelatina reale o pappa reale.

La sperimentazione (1÷ 13) si è doviziosamente occupata di questa sostanza, cercando, attraverso l'analisi della sua composizione, di scoprire quell'elemento o quegli elementi capaci di favorire l'evoluzione dell'importante fenomeno biologico accennato.

Le risultanze ottenute in Italia ed all'estero ci permettono di osservare che:

1) - i sorprendenti effetti fisiologici promossi, nella larva destinata a divenire ape regina, dalla c.d. gelatina reale non hanno trovato, a tutt'oggi, un'esauriente spiegazione. Mentre alcuni studiosi formulano l'ipotesi che il potente fattore biologico presente nella gelatina reale è capace di tante straordinarie trasformazioni (cioè: da un uovo non differenziato creare un insetto di peso assai maggiore di quello delle api d'altra casta e dotato, inoltre, di una prodigiosa longevità e fertilità), deve essere considerato come il frutto di una combinazione biologicamente perfetta di vari principi (vitamine, aminoacidi, grassi, ecc.); altri, invece, tendono a identificarlo con l'acido pantotenico, con l'acetilcolina o, ancora, con il coenzima A, tutti componenti, questi, presenti nella gelatina reale in eccezionale quantità;

2) - la gelatina reale sembra svolgere azione rimarchevole non solo nelle api ma anche nell'uomo. Le indagini fino ad oggi condotte hanno dimostrato che l'organismo di quest'ultimo è portato ad avvantaggiarsi dall'ingestione di tale sostanza, ricavandone benefici sia dal punto di vista clinico (negli stati nervosi, di psicosi, di obesità, di senescenza, di anemia, ecc.) che energetico (nell'affaticamento fisico e mentale) ed auxinico (nella fase di sviluppo del prematuro e del debole congenito).

Tenuto conto delle numerose incognite che ancora permangono in tema di composizione e di meccanismi d'azione della gelatina reale e, d'altra parte, considerati attentamente i risultati pratici ottenuti ogni qual volta la stessa sostanza è stata sperimentata sugli animali e sull'uomo ed, in modo particolare, allorquando è stata somministrata a giovani organismi in attivo accrescimento, abbiamo istituito e condotto presso il nostro Istituto una serie di prove di alimentazione che sono andate ad interessare le piccole specie.

Le nostre ricerche hanno permesso di accertare che:

1) - la gelatina reale liofilizzata, addizionata ad un mangime per broilers (14) alla dose di 5 p.p.m., si dimostra capace di influenzare favorevolmente l'accrescimento ponderale (14%), l'utilizzazione dell'alimento (8%) ed il processo evolutivo delle gonadi (sviluppo dei testicoli e attività spermatogenetica di questi) nonché di determinare interessanti modificazioni del quadro emocitometrico (contenuto in emoglobina superiore di circa il 22% rispetto a quello dei controlli);

2) - la gelatina reale liofilizzata, contenuta in un mangime per galline ovaiole (15) alle dosi di 10 e di 15 p.p.m., ha condizionato positivamente la ovodeposizione (risp. 10,50% e 11,00%), la resa del mangime in uova (risp. 21,00% e 22,00%), la pezzatura di queste ultime (risp. 5,00% e 4,80%), l'accrescimento ponderale dei soggetti (risp. 7,00% e 6,50%) e il grado di pigmentazione del tuorlo delle uova (risp. 9,50% e 9,70%);

3) - la gelatina reale liofilizzata, commistionata ai mangimi per tacchini da carne (16) alle dosi di 10, di 15 e di 20 p.p.m. durante l'intero ciclo di allevamento (dal 1° al 150° giorno di età) ha determinato effetti positivi sulla velocità di crescita (risp. 10,50%, 12,30% e 16,50%) e sull'utilizzazione dell'alimento (risp. 9,50%, 12,00% e 22,00%). Alle

dosi di 15 e di 20 p.p.m. la gelatina reale ha anche influenzato positivamente le rese in carcassa (risp. +6,00% e +9,50%), in carne (risp. +5,50% e +9,50%) e in grasso di deposito (risp. -17,00% e -30,00%) nonché il tenore in grasso della carne (risp. -24,00 e -35,50%), la digeribilità (risp. 3,50% e 4,00% per le prot. dig. dopo digestione pepsinica "in vitro") e la tenerezza di quest'ultima (risp. -20,00% e -33,00% per il tessuto connettivo dopo digestione tripsinica "in vitro") mentre, limitatamente alla dose di 20 p.p.m., il grado di pigmentazione della cute (10,50%).

La gelatina reale, a prescindere dal dosaggio, non ha provocato modificazioni nello stato di salute degli animali;

4) - la gelatina reale liofilizzata, aggiunta ai mangimi per anatre da carne (17) alle dosi di 5, di 10 e di 15 p.p.m. durante l'intero ciclo di allevamento (dal 1° al 60° giorno di età) ha svolto un'azione favorevole sulla velocità di crescita (risp. 5,00%, 9,00% e 14,00%), sull'utilizzazione dell'alimento (risp. 10,00%, 16,00% e 26,00%), sulle rese in carcassa (risp. + 3,50%, + 4,50% e + 8,00%) e in carne (risp. + 8,00%, + 9,50% e + 18,00%). Alle dosi di 10 e di 15 p.p.m. la gelatina reale ha anche influenzato positivamente la resa in grasso di deposito (risp. -26,00% e -39,00%) e il tenore in grasso della carne (risp. -26,00 e -46,00%) nonché la digeribilità (risp. 4,50% e 7,00% per le prot. dig. dopo digestione pepsinica "in vitro"), la tenerezza di quest'ultima (risp. -26,00% e -46,00% per il tessuto connettivo dopo digestione tripsinica "in vitro") e il grado di pigmentazione della cute (10,00% e 17,50%).

La gelatina reale, a prescindere dal dosaggio, non ha costituito fonte di variazione per lo stato di salute degli animali;

5) - la gelatina reale liofilizzata, inclusa in mangimi per faraone da carne (18) alle dosi di 5, di 10 e di 15 p.p.m. durante l'intero ciclo di allevamento (dal 1° al 100° giorno di età) ha esercitato un'azione positiva sull'accrescimento ponderale (risp. 8,50%, 14,50% e 20,50%), sull'utilizzazione dell'alimento (risp. 5,00%, 10,00% e 10,50%), sulle rese in carcassa (risp. + 4,00%, + 5,50% e + 9,00%), in carne (risp. + 5,00%, + 7,00% e + 13,00%), in grasso di deposito (risp. -10,50%, - 11,50% e -20,00%) nonché sul contenuto in grasso della carne (risp. -14,00, - 16,00% e -24,00%), mentre, limitatamente alle dosi di 10 e di 15 p.p.m., sulla digeribilità (risp. 3,70% e 5,80% per le prot. dig. dopo digestione pepsinica "in vitro") e sulla tenerezza della carne (risp. -28,00% e -44,00% per il tessuto connettivo dopo digestione tripsinica "in vitro").

La gelatina reale, ai vari dosaggi sperimentati, non ha influenzato, positivamente o negativamente, la pigmentazione della cute e lo stato di salute degli animali.

Visti i lusinghieri risultati ottenuti abbiamo creduto opportuno saggiare l'efficacia della gelatina reale anche nell'allevamento del coniglio da carne.

Scopo delle nostre ricerche è stato quello di osservare che:

- a) - se l'aggiunta alle razioni di gelatina reale liofilizzata fosse in grado di migliorare l'efficacia produttiva degli animali;
- b) - se la risposta dei soggetti alle razioni sperimentali, valutabile attraverso l'accrescimento ponderale, l'utilizzazione dell'alimento, lo stato di salute e le caratteristiche quantitative della carne, potesse essere condizionata dal dosaggio della sostanza.

MATERIALE E METODI

La sperimentazione ha interessato 400 conigli di razza Nuova Zelanda dell'età di circa 30 giorni, tutti maschi appena svezzati e distinti in quattro gruppi di 100 soggetti cadauno, contrassegnati con i numeri dall'1 al 4.

L'allevamento, praticato in gabbie collettive (10 soggetti per ogni gabbia), in condizioni di ambiente uniformi per i vari gruppi, ha avuto la durata di 60 giorni.

I soggetti del gruppo 1, considerato di "controllo", hanno ricevuto, durante il primo periodo (dal 30° al 60° giorno) ed il secondo (dal 61° al 90° giorno) due mangimi completi, la cui composizione è raccolta nelle tabelle nn. 1 e 2.

Tab.1 – Formulazione dei mangimi composti integrati.

Periodi		1°	2°
Farina di mais	Kg	20.00	30.00
Farina di orzo	“	10.00	10.00
Farina di frumento	“	5.00	5.00
Farina di soia (estr. 50% prot.)	“	9.00	9.00
Farina di girasole (estr. 45% prot.)	“	5.00	4.00
Farina di pesce	“	5.00	3.00
Farina di medica integrale	“	10.00	8.00
Farina di medica dis.	“	5.00	5.00
Crusca di frumento	“	15.00	10.00
Farinaccio di riso	“	5.00	5.00
Polpe secche di bietola	“	5.00	5.00
Melasso di canna	“	3.00	3.00
Carbonato di calcio	“	1.00	1.00
Fosfato bicalcico	“	1.00	1.00
Cloruro di sodio	“	0.50	0.50
Complesso vitamin. e oligomin. (*)	“	0.50	0.50

(*) Composizione del complesso vitaminico e oligominerale (per 1 kg) – Vit. A: U.I. 4.000.000; Vit. D3: U.I. 400.000; Vit. E: mg 5.000; Vit. B1: mg 400; Vit. B2: mg 300; Vit. B6: mg 500; Vit. B12: mg 4; Vit. PP: mg 4.500; Ac. Pantotenico: mg 3.000; Ac. Folico: mg 300; Colina cloruro: mg 100.000; DL-metionina: mg 50.000; Co: mg 150; Fe: mg 5.000; I: mg 200; Mn: mg 15.000; Cu: mg 200; Zn: mg 10.000; Se: mg 20; supporto vegetale q.b. a g 1000.

Tab. 2 – Analisi chimica dei mangimi composti integrati.

Periodi		1°	2°
Acqua	%	11.80	12.10
Ceneri gregge	“	6.40	6.20
Proteina greggia	“	18.00	16.00
Sostanze grasse gregge	“	4.00	3.60
Cellulosa greggia	“	10.50	10.00
Estrattivi inazotati	“	49.30	52.10

Per l'alimentazione dei gruppi 2, 3 e 4, considerati "di esperimento", si è fatto ricorso agli stessi mangimi con l'aggiunta però gelatina reale liofilizzata nelle rispettive dosi di 10, di 15 e di 20 p.p.m.

Per quanto concerne la gelatina reale è stato impiegato materiale proveniente dalla produzione corrispondente alla fioritura di molte specie botaniche presenti nella flora di collina, precisamente essenze di prato, castagno, tiglio, rovo e meliloto.

Le varie indagini, condotte sulla gelatina reale, hanno interessato la composizione chimica centesimale nonché i tenori di macro e microelementi minerali, di acidi grassi e di vitamine (tabelle nn. 3, 4, 5 e 6).

Tabella n. 3 – Contenuto in principi immediati ed in macro e microelementi minerali della gelatina reale (valori medi sulla sostanza secca).

Umidità	%	5,40
Ceneri gregge	%	2,50
Proteina greggia	%	38,60
Sostanze grasse gregge	%	13,60
Cellulosa greggia	%	0,70
Estrattivi inazotati	%	39,20
Calcio	mg/g	0,40
Fosforo	mg/g	6,10
Magnesio	mg/g	0,80
Sodio	mg/g	0,50
Potassio	mg/g	7,00
Cobalto	µg/g	0,30
Ferro	µg/g	90,00
Manganese	µg/g	2,00
Rame	µg/g	16,00
Selenio	µg/g	0,42
Zinco	µg/g	66,00

Tabella n. 4 – Contenuto in aminoacidi dei protidi della gelatina reale (valori medi).

Aminoacidi	In 100 di sostanza secca	In 100 di protidi
Treonina	1,50	3,90
Cistina	1,00	2,60
Valina	2,40	6,20
Metionina	1,80	4,60
Isoleucina	2,00	5,20
Leucina	3,00	7,80
Tirosina	2,10	5,44
Fenilalanina	1,98	5,15
Triptofano	0,81	2,00
Lisina	3,50	9,00
Istidina	0,90	2,40
Arginina	2,20	5,50
Ac. aspartico	5,30	13,80
Serina	2,10	5,35
Ac. glutammico	3,70	9,40
Prolina	1,40	3,70
Glicina	1,24	3,20
Alanina	1,66	4,60

Tabella n.5 – Contenuto percentuale in acidi grassi dei lipidi della gelatina reale (valori medi sulla sostanza secca).

Ac. laurico	1,30
Ac. adipico	0,27
Ac. pimelico	1,50
Ac. palmitico	3,32
Ac. stearico	4,00
Ac. sebacico	9,50
Ac. oleico	2,00
Ac. linoleico	1,15
Ac. idrossitransdecenoico	17,40
Ac. idrossitransdecendioico	20,10
Ac. chetotransdecendioico	39,46

Tabella n. 6 – Contenuto in vitamine della gelatina reale (valori medi sulla sostanza secca).

Vitamine	µg/g
A (retinolo)	tracce
D3 (colecalfiferolo)	tracce
E (tocoferoli)	tracce
K (fillochinone)	tracce
B1 (tiamina)	41,00
B2 (riboflavina)	45,50
B5 (ac. pantotenico)	530,00
B6 (piridossina)	140,00
B12 (cianocobalamina)	1,80
B9 (acido folico)	1,00
H (biotina)	13,00
PP (niacina)	490,50
C (ac. ascorbico)	91,30

Nel corso ed al termine della prova istituita sono stati effettuati i seguenti rilievi:

- a. – il controllo giornaliero dello stato di salute degli animali;
- b. – la verifica dell'incremento ponderale individuale e del consumo di alimenti;
- c. – la determinazione di alcuni parametri ematici.

Sui campioni di sangue, prelevati da 10 soggetti scelti nell'ambito di ciascun gruppo, sono stati determinati i contenuti di proteine totali, di albumina, di globuline, di glucosio, di fosfatasi alcalina, di fosfolipidi, di bilirubina totale, di colesterolo totale, di col. HDL, di col. LDL, di trigliceridi, di lipidi totali, di lipoproteine α e β , con kit della Boehringer Italia e di insulina con kit della Medical Systems S.p.a.;

- d. – il controllo della resa di macellazione e la valutazione delle carcasse alla spolpatura;

- e. – l'analisi chimico-bromatologica della carne secondo la metodica A.O.A.C. (19);
- f. – la determinazione della digeribilità pepsinica "in vitro" della carne, secondo la ben nota tecnica di Sjollema –Wedemeyer;
- g. – la valutazione della tenerezza della carne, secondo il procedimento proposto da Schömberg e Lochmann, elaborato da Krüger (20) e basato sull'impiego della tripsina, adottando gli accorgimenti resi noti da uno di noi in altra memoria (21), alla quale si rimanda;

I dati ottenuti a seguito delle indagini effettuate sono stati sottoposti ad analisi della varianza secondo il metodo dei minimi quadrati, adottando il seguente modello:

$$Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$$

dove

Y_{ij} = singola osservazione ;

μ = media generale ;

a_{ij} = effetto della dose ($i=1, \dots, 4$) ;

e_{ij} = effetto casuale residuo.

RISULTATI E DISCUSSIONE

A. – Lo stato di salute.

I conigli alimentati con mangimi contenenti la gelatina reale liofilizzata alle dosi di 10 p.p.m. (gruppo 2), di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) sono stati caratterizzati da uno stato di salute da definirsi buono nel corso dell'intero periodo di allevamento. Parimenti ai controlli (gruppo 1) il sensorio e le grandi funzioni organiche hanno denunciato uno svolgimento sempre entro i limiti della normalità.

Il tasso di mortalità si è rivelato decisamente basso, avendo toccato valori compresi fra il 3% e il 5%.

B) – L'incremento ponderale ed il consumo di alimenti.

I conigli sono stati pesati individualmente al 30°, al 60° e al 90° giorno di età.

Nella tabella n.7 sono compendiate i risultati ottenuti a seguito dell'elaborazione matematico-statistica condotta sui dati primitivi, mentre nella tabella n.8 sono riportati i valori medi relativi agli incrementi ponderali giornalieri. Il grafico n.1 mostra l'andamento delle curve empiriche relative allo sviluppo ponderale dei soggetti.

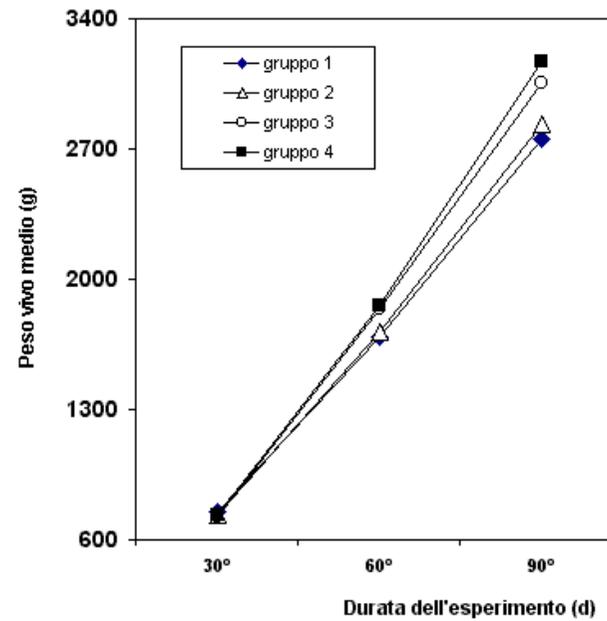


Grafico n. 1 - Accrescimento ponderale

Tab. 7 – Accrescimento ponderale (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Soggetti	n.	150	150	150	150
Durata della prova	d	60	60	60	60
Pesi medi iniziali (30° d)	g	750,42 \pm 49,10	735,81 \pm 56,40	726,11b \pm 50,00	730,48 \pm 58,34
Pesi medi al 60° d	g	1.690,64a \pm 75,13	1.720,18a \pm 81,62	1.840,43b \pm 86,48	1.855,27b \pm 80,00
Pesi medi al 90° d	g	2.750,39a \pm 96,62	2.830,15a \pm 104,20	3.050,36b \pm 100,00	3.170,40c \pm 95,19

- a, b, c diversi per $P < 0,05$.

Tab. 8 – Incrementi ponderali giornalieri (valori medi).

Gruppi		1	2	3	4
30° - 60° d	g	31.50	32.80	37.20	38.00
61° - 90° d	g	35.50	37.00	40.50	44.00
30°- 90° d	g	33.50	35.00	39.00	41.00

L'esame delle tabelle permette di osservare che:

1) – al 30° giorno di età le differenze fra i pesi medi non sono risultate significative ($P < 0,05$);

2) – al 60° giorno di età la gelatina reale liofilizzata addizionata ai mangimi alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) ha esercitato effetti positivi sulla velocità di crescita dei conigli. Dal confronto fra i soggetti trattati e i controlli (gruppo 1) sono emerse differenze significative ($P < 0,05$) pari, rispettivamente, al 8,00% e al 9,50%. Fra i due gruppi sperimentali la differenza non è risultata significativa ($P > 0,05$).

Risultanze pressoché analoghe a quelle dei controlli sono state registrate per i soggetti alimentati con mangime contenente gelatina reale liofilizzata alla dose di 10 p.p.m. (gruppo 2);

3) – al 90° giorno di età la gelatina reale liofilizzata, prevista nei mangimi alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) si è dimostrata più efficace, rispetto al periodo precedente, nel condizionare l'accrescimento ponderale ($P < 0,05$), soprattutto con riferimento al dosaggio più elevato ($P < 0,05$). A paragone con i controlli (gruppo 1) i soggetti dei gruppi 3 e 4 si sono infatti avvantaggiati, nell'ordine, in ragione del 11,00% e del 15,00%.

Alla dose di 10 p.p.m. di mangime (gruppo 2) la gelatina reale liofilizzata ha determinato un certo miglioramento nella velocità di crescita sulla base però di una differenza, fra il gruppo 2 e il gruppo 1, che non ha raggiunto la significatività statistica ($P > 0,05$).

Nella tabella n.9 (v. anche grafico n.2) sono raccolti gli indici di conversione dell'alimento in carne. Gli stessi indici consentono di accertare che i conigli razionati con mangimi in cui ha trovato posto la gelatina reale liofilizzata alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) hanno prodotto il chilogrammo di peso vivo, utilizzando una quantità di alimento inferiore rispetto a quella consumata dai controlli (gruppo 1) in virtù di differenze significative ($P < 0,05$), calcolate per l'intero ciclo di allevamento, pari, nell'ordine, al 8,50% e al 12,50%. Pure significativa la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4 ($P < 0,05$).

Tab. 9 – Indice di conversione - kg di mangime/kg p.v. (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
30° - 60° d	Kg	3.30b \pm 0.15	3.25b \pm 0.13	3.12a \pm 0.14	3.00a \pm 0.13
61° - 90° d	Kg	3.80c \pm 0.16	3.75c \pm 0.17	3.55b \pm 0.15	3.30a \pm 0.18
30° - 90° d	Kg	3.60c \pm 0.12	3.50c \pm 0.13	3.30b \pm 0.14	3.15a \pm 0.13

- a, b, c diversi per $P < 0,05$.

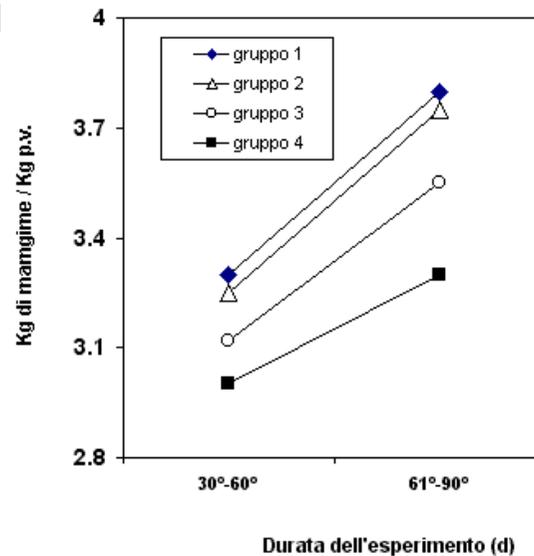


Grafico n. 2 - Indice di conversione

Un indice di conversione che collima, in linea di massima, con quello dei controlli ($P > 0,05$) è stato registrato per i soggetti che hanno assunto la gelatina reale alla dose di 10 p.p.m. di mangime (gruppo 2).

C. - I parametri ematici.

I risultati ottenuti a seguito delle indagini condotte sui campioni di sangue, prelevati al 30°, al 60° e al 90° giorno di età sono riportati nelle tabelle nn.10 e 11. Dall'esame delle tabelle si evince che:

- i contenuti di proteine totali, di albumina, di globuline non hanno subito variazioni statisticamente accertabili ($P > 0,05$) a seguito dei particolari regimi alimentari adottati;

- il tasso di glucosio ha fatto registrare valori più elevati nei conigli alimentati con mangimi contenenti la gelatina reale liofilizzata alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) sulla base di differenze significative ($P < 0,05$), nei confronti dei controlli (gruppo 1), pari, rispettivamente, al 16,00%, al 31,00%. Pure significativa ($P < 0,05$) la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Non ha trovato conferma attraverso l'elaborazione matematico-statistica la differenza fra i controlli e i soggetti che hanno ricevuto la gelatina reale alla dose di 10 p.p.m. di mangime (gruppo 2);

- i tenori di colesterolo totale, di col. HDL, di col. LDL, di trigliceridi, di bilirubina totale, di fosfolipidi, di lipidi totali e di fosfatasi alcalina sono stati caratterizzati da valori più bassi nei conigli trattati con gelatina reale liofilizzata aggiunta ai mangimi alle dosi di 10 p.p.m. (gruppo 2), di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) in virtù di differenze, a paragone con i controlli (gruppo 1), significative ($P < 0,05$) e pari, nell'ordine, al 10,50%, al 13,00% e al 24,00% per il colesterolo totale, al 26,00%, al 32,00% e al 56,00% per il col. HDL, al 16,00%, al 22,00% e al 32,00% per il col. LDL, al 16,00%, al 20,00% e al 33,00% per i trigliceridi, al 16,00%, al 18,00% e al 32,00% per la bilirubina totale, al 13,00%, al 18,00% e al 32,00% per i fosfolipidi, al 4,00%, al 6,50% e al 9,50% per i lipidi totali e al 18,00%, al 21,00% e al 34,00% per la fosfatasi alcalina. Pure significative ($P < 0,05$) le differenze fra il gruppo 4 e i gruppi 2 e 3;

- le lipoproteine α e β , determinate nel sangue dei conigli razionati con mangimi addizionati di gelatina reale alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4), hanno toccato, rispettivamente, quote più alte e più basse nei confronti del lipidogramma dei controlli (gruppo 1) in ragione di differenze significative ($P < 0,05$) pari,

nell'ordine, al 48,00% e al 79,00% per le α , al 16,50% e al 31,00% per le β . Per entrambi i parametri è pure significativa ($P < 0,05$) la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Alla dose di 10 p.p.m. (gruppo 2) la gelatina reale liofilizzata non ha costituito fonte di variazione ($P > 0,05$) per le lipoproteine α e β ;

- il contenuto di insulina ha denunciato valori più alti nei conigli alimentati con mangimi contenenti la gelatina reale liofilizzata alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) sulla base di differenze, a paragone con i controlli (gruppo 1), significative ($P < 0,05$) e pari, nell'ordine, al 26,50% e al 48,00%.

Significativa ($P < 0,05$) anche la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Dalla comparazione fra i controlli e i soggetti trattati con la gelatina reale alla dose di 10 p.p.m. di mangime (gruppo 2) la differenza a favore di questi ultimi non ha raggiunto la significatività statistica ($P > 0,05$).

D) – Le rese di macellazione.

Tab. 10 – Parametri ematici (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Proteine totali	g/100 ml	6.10 \pm 0.42	6.25 \pm 0.48	6.19 \pm 0.39	6.23 \pm 0.45
Albumina	g/100 ml	2.40 \pm 0.31	2.48 \pm 0.27	2.39 \pm 0.24	2.50 \pm 0.33
Globuline	g/100 ml	3.70 \pm 0.20	3.77 \pm 0.19	3.80 \pm 0.23	3.73 \pm 0.21
Glucosio	mg/100 ml	110.45a \pm 7.60	116.36a \pm 8.32	128.20b \pm 8.00	144.31c \pm 8.50
Colesterolo tot.	mg/100 ml	146.63c \pm 10.70	131.16b \pm 11.24	127.15b \pm 10.96	110.60a \pm 12.32
Colesterolo HDL	mg/100 ml	45.32c \pm 9.10	33.61b \pm 10.00	30.64b \pm 8.90	19.73a \pm 8.64
Colesterolo LDL	mg/100 ml	90.61c \pm 12.20	76.38b \pm 11.62	70.54b \pm 10.80	61.10a \pm 12.45
Trigliceridi	mg/100 ml	150.37c \pm 15.72	126.74b \pm 18.70	120.11b \pm 17.11	100.80a \pm 16.33
Bilirubina tot.	mg/100 ml	1.72c \pm 0.20	1.45b \pm 0.18	1.41b \pm 0.16	1.16a \pm 0.19
Fosfolipidi	mg/100 ml	110.63c \pm 11.62	96.52b \pm 10.70	91.30b \pm 9.45	75.48a \pm 12.62
Fosfatasi alcalina	mU/ml	91.74c \pm 10.30	75.30b \pm 9.15	72.68b \pm 8.68	60.47a \pm 9.00

- a, b, c diversi per $P < 0,05$.

Tab. 11 – Parametri ematici (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Lipidi totali	mg/100 ml	490.60c \pm 12.20	470.34b \pm 13.11	460.10b \pm 11.60	443.38a \pm 12.36
Lipoproteine α	%	30.64a \pm 7.15	35.20a \pm 7.62	45.23b \pm 8.10	54.80c \pm 7.93
Lipoproteine β	%	65.36c \pm 7.15	64.80c \pm 7.62	54.77b \pm 8.10	45.20a \pm 7.93
Rapporto β/α		2.13c \pm 0.31	1.84c \pm 0.30	0.91b \pm 0.34	0.54a \pm 0.35
Insulina	μ U.I./ml	10.16a \pm 1.20	11.30a \pm 1.27	12.85b \pm 1.32	15.00c \pm 1.40

- a, b, c diversi per $P < 0,05$.

Su 20 conigli, scelti a caso nell'ambito di ciascun gruppo e sacrificati dopo un periodo di digiuno di 12 ore, sono state controllate le rese in carcassa, quarti anteriori e posteriori, regione lombare, carne, grasso di deposito, ossa, testa e collo, pelle, stinchi, zampe e coda, fegato, complesso "milza, cuore, polmoni, reni e testicoli", stomaco e intestino.

I risultati ottenuti, raccolti nella tabella n.12, pongono in evidenza che:

- la resa in carcassa a caldo, (priva di testa, collo, pelle, stinchi, zampe, coda e di tutti i visceri) ha fatto registrare valori compresi fra il 48,00% e il 55,00%.

Le rese più elevate sono state tuttavia registrate per i conigli razionati con mangimi addizionati di gelatina reale liofilizzata alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) sulla base di differenze, nei confronti dei controlli (gruppo 1), significative ($P<0,05$) e pari, rispettivamente, al 7,50% e al 13,00%.

Tab. 12 – Rilievi di macellazione a caldo (% p.v. - valori medi \pm D.S.).

Gruppi	1	2	3	4
Rese in:				
Carcassa	48.60a \pm 1.20	49.10a \pm 1.11	52.60b \pm 1.15	54.90c \pm 1.10
Quarti anteriori	13.70a \pm 0.42	13.85a \pm 0.38	14.90b \pm 0.47	15.50c \pm 0.51
Quarti posteriori	17.83a \pm 0.50	18.15a \pm 0.61	19.62b \pm 0.56	20.40c \pm 0.63
Lombo	17.10a \pm 0.61	17.00a \pm 0.68	18.10b \pm 0.64	19.00c \pm 0.72
Carne	32.70a \pm 1.00	33.15a \pm 0.89	36.68b \pm 0.96	39.50c \pm 1.10
Grasso	3.12c \pm 0.41	2.98c \pm 0.38	2.20b \pm 0.35	1.70a \pm 0.40
Ossa	12.78 \pm 1.25	12.97 \pm 1.30	13.72 \pm 1.16	13.70 \pm 1.15
Testa e collo	11.20 \pm 0.83	10.84 \pm 0.81	10.78 \pm 0.96	10.50 \pm 1.00
Pelle	12.38 \pm 0.76	12.00 \pm 0.75	11.74 \pm 0.81	11.81 \pm 0.84
Stinchi, zampe e coda	3.00 \pm 0.60	3.25 \pm 0.57	2.90 \pm 0.51	2.83 \pm 0.48
Fegato	3.10 \pm 0.31	3.00 \pm 0.36	2.87 \pm 0.30	2.96 \pm 0.27
Milza, cuore, polmoni, reni e testicoli	2.50 \pm 0.26	2.45 \pm 0.21	2.38 \pm 0.19	2.49 \pm 0.18
Stomaco pieno	4.80 \pm 0.50	4.72 \pm 0.46	4.56 \pm 0.53	4.42 \pm 0.55
Intestino pieno	12.70 \pm 1.10	13.00 \pm 1.20	12.10 \pm 1.28	12.00 \pm 1.19

- a, b, c diversi per $P<0,05$.

Pure significativa ($P<0,05$) la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Utilizzata alla dose di 10 p.p.m. (gruppo 2) la gelatina reale liofilizzata non ha rappresentato fonte di variazione ($P>0,05$) per la resa in carcassa;

- le rese in quarti anteriori, in quarti posteriori, in lombo e in carne sono risultate superiori nei conigli alimentati con mangimi contenenti la gelatina reale liofilizzata alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4). A paragone con i controlli (gruppo 1) sono emerse differenze significative ($P<0,05$) e pari, nell'ordine, al 9,00% e al 17,00% per la resa in quarti anteriori, al 10,00% e al 15,00% per la resa in quarti posteriori, al 6,00% e al 11,00% per la resa in lombo, al 12,00% e al 20,00% per la resa in carne.

Per tutti i parametri sono risultate significative ($P<0,05$) anche le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Differenze di massima entità ($P>0,05$) sono state invece registrate nel confronto fra i controlli e i soggetti trattati con gelatina reale liofilizzata alla dose di 10 p.p.m. di mangime (gruppo 2);

- la resa in grasso di deposito è risultata più bassa nei conigli che hanno ricevuto mangimi contenenti la gelatina reale liofilizzata alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4), sulla base di differenze, a paragone con i controlli (gruppo 1), significative ($P<0,05$) e pari, rispettivamente, al 30,00% e al 46,00%. Ha raggiunto la significatività statistica ($P<0,05$) anche la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Risultanze non diverse ($P>0,05$) da quelle dei controlli sono state invece osservate per i soggetti razionati con mangimi addizionati di gelatina reale liofilizzata alla dose di 10 p.p.m. (gruppo 2);

- le rese in ossa, testa e collo, pelle, stinchi, zampe e coda, fegato, complesso "milza, cuore, polmoni, reni e testicoli", stomaco e intestino non hanno denunciato modificazioni ($P>0,05$) comunque riferibili ai particolari regimi alimentari adottati.

E) - La composizione chimico-bromatologica della carne.

I campioni di carne sono stati sottoposti, previa omogeneizzazione, a disidratazione e successivamente ridotti in polvere prima di procedere alle varie indagini di ordine chimico. E' stata effettuata la determinazione del contenuto in acqua, in ceneri gregge, in proteina greggia e in grasso greggio.

I risultati ottenuti, compendati nella tabella n. 13, permettono di rilevare che per tutti i parametri i relativi valori sono compresi entro i limiti della normalità senza l'evidenza di differenze apprezzabili ($P>0,05$) nel confronto fra i controlli (gruppo 1) e i soggetti di esperimento (gruppi 2, 3, 4).

Tab. 13 - Composizione chimico-bromatologica della carne (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Acqua	%	73.42 \pm 0.34	73.50 \pm 0.41	73.36 \pm 0.38	73.41 \pm 0.35
Ceneri gregge	%	1.26 \pm 0.19	1.32 \pm 0.18	1.38 \pm 0.22	1.35 \pm 0.20
Proteina greggia	%	22.38 \pm 0.34	22.50 \pm 0.40	22.46 \pm 0.38	22.41 \pm 0.35
Sostanze grasse gregge	%	2.61 \pm 0.38	2.31 \pm 0.45	2.50 \pm 0.34	2.40 \pm 0.40

F) - La digeribilità pepsinica "in vitro" della carne.

Sulla carne, essiccata e sgrassata, è stata determinata la digeribilità, seguendo il metodo proposto da Sjollema-Wedemeyer.

I valori medi relativi alla proteina totale, digeribile, indigerita nonché al coefficiente di digeribilità sono raccolti nella tabella n. 14.

Tab.14 - Digeribilità pepsinica "in vitro" della carne (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Proteine totali	%	22.38 \pm 0.34	22.50 \pm 0.40	22.46 \pm 0.38	22.41 \pm 0.35
Proteine indigerite	%	2.63 ^c \pm 0.25	2.55 ^c \pm 0.28	1.90 ^b \pm 0.30	1.38 ^a \pm 0.32
Proteine digeribili	%	19.75 ^a \pm 0.36	19.95 ^a \pm 0.31	20.56 ^b \pm 0.29	21.03 ^c \pm 0.33
Coefficiente di digeribilità	%	88.25 ^a \pm 0.93	88.65 ^a \pm 1.00	91.50 ^b \pm 0.90	94.00 ^c \pm 1.12

- a, b, c diversi per $P<0,05$.

Gli stessi valori consentono di osservare che la carne dei conigli alimentati con mangimi addizionati di gelatina reale liofilizzata in ragione di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. (gruppo 4) è più digeribile rispetto a quella dei controlli (gruppo 1). Il coefficiente di digeribilità delle proteine ha infatti posto in evidenza differenze significative ($P<0,05$) e pari, nell'ordine, al 4,00% e al 6,50%.

Significativa ($P<0,05$) anche la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Impiegata alla dose di 10 p.p.m. di mangime (gruppo 2) la gelatina reale liofilizzata non ha determinato modificazioni ($P>0,05$) nella digeribilità della carne.

G. - La tenerezza della carne.

Per la valutazione della tenerezza della carne si è fatto ricorso al procedimento proposto da Schönberg e Lochmann, elaborato da Krüger, basato sull'impiego della tripsina. Con il medesimo procedimento si opera su carne essiccata e sgrassata che viene sottoposta a digestione enzimatica per 96 ore. Al termine di tale periodo la sostanza indigerita è rappresentata quasi totalmente dal tessuto connettivo.

Le risultanze ottenute sono riportate nella tabella n. 15. L'esame delle medesime risultanze mette in luce che la carne dei conigli trattati con gelatina reale liofilizzata alle dosi di 15 p.p.m. (gruppo 3) e di 20 p.p.m. di mangime (gruppo 4) è più tenera nei confronti di quella dei controlli (gruppo 1). Le differenze fra i contenuti di sostanza indigerita sono significative ($P < 0,05$) e pari, rispettivamente, al 26,00% e al 42,50%. Pure significativa la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Tab. 15 – Digestione tripsinica "in vitro" della carne.
Sostanza indigerita espressa in % sulla carne essiccata
e sgrassata (valori medi \pm D.S.).

Gruppi	Sostanza indigerita
1	2.71c \pm 0.30
2	2.53c \pm 0.26
3	2.00b \pm 0.32
4	1.56a \pm 0.35

- a, b, c diversi per $P < 0,05$.

La tenerezza della carne non ha subito modificazioni apprezzabili ($P > 0,05$) a seguito dell'impiego della gelatina reale liofilizzata alla dose di 10 p.p.m. di mangime (gruppo 2).

CONCLUSIONI

Sulla scorta dei rilievi effettuati e delle osservazioni tratte ci sembra di poter formulare le seguenti considerazioni e conclusioni:

- 1) – la gelatina reale liofilizzata, prevista nei mangimi alle dosi di 15 e di 20 p.p.m. ha condizionato favorevolmente l'accrescimento ponderale dei conigli con una efficienza maggiore in corrispondenza del dosaggio più elevato. Al termine del ciclo produttivo (90 giorni di età) i soggetti trattati si sono avvantaggiati, rispetto ai controlli, in virtù di differenze pari, nell'ordine, al 11,00% e al 15,00%, facendo nel contempo registrare un indice di conversione dell'alimento inferiore di circa l'8,50% e il 12,50%;
- 2) – la gelatina reale, agli stessi dosaggi, ha influenzato positivamente le rese in carcassa (risp. + 7,50% e + 13,00%), in quarti anteriori (risp. + 9,00% e + 17,00%), in quarti posteriori (risp. + 10,00% e + 15,00%), in lombo (risp. + 6,00% e + 11,00%), in carne (risp. + 12,00% e + 20,00%), in grasso di deposito (risp. – 30,00% e – 46,00%) e alcune caratteristiche qualitative della carne con riferimento al grado di digeribilità (risp. + 4,00% e + 6,50% per le prot. dig. dopo digestione pepsinica "in vitro") e al grado di tenerezza (risp. – 26,00% e – 42,50% per il tessuto connettivo dopo digestione tripsinica "in vitro"). Anche per questi parametri la migliore risposta è stata ottenuta utilizzando la gelatina reale alla dose più alta;
- 3) – effetti di scarso rilievo sulle caratteristiche quanti-qualitative della carne sono stati determinati dalla gelatina reale liofilizzata alla sua dose di impiego di 10 p.p.m. di mangime;
- 4) – la gelatina reale liofilizzata, a prescindere dal dosaggio, non ha interessato, positivamente o negativamente, lo stato di salute dei conigli.

Il complesso delle risultanze ottenute a seguito delle nostre indagini ci autorizza ad affermare che la gelatina reale liofilizzata si è dimostrata capace di migliorare l'azione trofica dei mangimi destinati ai conigli da carne.

Per quanto concerne il dosaggio della sostanza ci è stato dato di constatare che le risultanze ottimali sono conseguibili allorché si fa ricorso alla medesima in ragione di 20 p.p.m. di mangime.

Dal punto di vista biologico l'efficacia della gelatina reale sull'estrinsecazione delle attitudini produttive dei conigli pensiamo che possa essere interpretata alla luce dei reperti ottenuti a seguito delle indagini condotte a livello ematico.

E' stato infatti possibile accertare che la gelatina reale determina significativi aumenti dei tassi di glucosio, di insulina e di lipoproteine α e riduzioni dei tenori di colesterolo totale, di col. HDL, di col. LDL, di trigliceridi, di bilirubina totale, di fosfolipidi, di fosfatasi alcalina e di lipidi totali, reperti questi che pongono in chiara evidenza la possibilità della sostanza di svolgere un ruolo di primo ordine in seno ai metabolismi glucidico e lipidico e tale da favorire la normalizzazione delle condizioni biotrofiche degli animali.

Naturalmente le nostre ricerche verranno proseguite al fine di acquisire più ampie informazioni sulle funzioni metaboliche e sul meccanismo d'azione della gelatina reale.

Parole chiave: gelatina reale, conigli da carne, efficienza produttiva.

Key Words: royal jelly, rabbits, productive efficiency.

Mots-cléfs: gelée royale, lapins à viande, efficacité de production

RIASSUNTO - Gli Autori espongono i risultati ottenuti a seguito di un esperimento circa l'impiego della gelatina reale nell'alimentazione dei conigli da carne.

La gelatina reale liofilizzata, addizionata ai mangimi alle dosi di 15 e di 20 p.p.m. durante l'intero ciclo di allevamento (dal 30° al 90° giorno di età), ha determinato effetti positivi sulla velocità di crescita (risp. 11,00% e 15,00%), sull'utilizzazione dell'alimento (risp. 8,50% e 12,50%), sulle rese in carcassa (risp. + 7,50% e + 13,00%), in quarti anteriori (risp. + 9,00% e + 17,00%), in quarti posteriori (risp. + 10,00% e + 15,00%), in lombo (risp. + 6,00% e + 11,00%), in carne (risp. + 12,00% e + 20,00%) e in grasso di deposito (risp. - 30,00% e - 46,00%) e su alcune caratteristiche qualitative della carne con riferimento al grado di digeribilità (risp. + 4,00% e + 6,50% per le prot. dig. dopo digestione pepsinica "in vitro") e al grado di tenerezza (risp. - 26,00% e - 42,50% per il tessuto connettivo dopo digestione tripsinica "in vitro"). Impiegata ad un dosaggio più basso (10 p.p.m.) la gelatina reale è risultata meno efficace.

A prescindere dal dosaggio, la gelatina reale non ha influenzato, positivamente o negativamente, lo stato di salute degli animali.

SUMMARY - Royal jelly in the feeding of the rabbits.

The Authors refer the results of a research about the use of royal jelly in rabbits feeding. Added to rations at the doses of 15 and 20 p.p.m. (from 30 to 90 d of age), royal jelly has improved the weight gain (resp. 11,00% and 15,00%), the feed utilisation (resp. 8,50% and 12,50%), the carcass (resp. + 7,50% and + 13,00%), the fore quarters (resp. +9,00% and +17,00%), the rear quarters (resp. + 10,00% and + 15,00%), the loin (resp. + 6,00% and + 11,00%), the meat yield (resp. + 12,00% and + 20,00%), the fat yield (resp. -30,00% and -46,00%) and the meat digestibility (resp. + 4,00% and + 6,50% of digestible protein after "in vitro" pepsinic digestion) and the tenderness (resp. -26,00% and -42,50% of connective tissue after "in vitro" tripsinic digestion). At lower dose (10 p.p.m.) royal jelly doesn't seem to have any appreciable effect.

Regardless to the dose, royal jelly have not positive or negative effects on the health status.

RÉSUMÉ - La gelée royale dans l'alimentation du lapin à viande.

Les auteurs présentent les résultats obtenus suite à une expérimentation sur l'utilisation de la gelée royale dans l'alimentation du lapin à viande.

La gelée royale lyophilisée, ajoutée à l'aliment à des doses de 15 et 20 p.p.m. pendant tout le cycle d'engrais (du 30° au 90° jour), a eu des effets positifs sur la vitesse de croissance (resp. +11,00% et +15,00%), sur l'utilisation de l'aliment (resp. +8,50% et +12,50%), sur le rendement de la carcasse (resp. +7,50% et +13,00%), des quartiers antérieurs (resp. +9,00% et +17,00%), des quartiers postérieurs (resp. 10,00% et +15,00%), des lombaires (resp. +6,00% et +11,00%), en viande (resp. +12,00% et +20,00%), et sur le gras de déposition (resp. -30,00% et -46,00%), et sur certaines caractéristiques qualitatives se référant au degré de digérabilité (resp. +4,00% et +6,50% pour les protéines digestibles après digestion avec pepsine "in vitro") et au degré de tendreté (resp. -26,00% et -42,50% pour le tissu connectif après digestion avec trypsine "in vitro"). Utilisée à dose moins élevée (10 p.p.m.), la gelée résulte être moins efficace.

En faisant abstraction du dosage, la gelée royale n'a pas d'influence positive ni négative sur l'état de santé des animaux.

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

BIBLIOGRAFIA

1. - Bonomi A., Marletto F., Lucchelli L., Anghinetti A., Bonomi Antonella, Sabbioni A. - Composizione chimico-bromatologica della gelatina reale in rapporto alla flora nettarifera e pollinifera. Riv. Soc. It. Sci. Alim., 15, 1-2, 1986.
2. - Al-Muffarrej SI, El-Sarag MSA - Effects of royal jelly on the umoral antibody response and blood chemistry of chickens. Journal of Applied Animal Research, 12, 1, 41-47, 1997.
3. - Ferlat S., Bottex Gauthier C., Picot F., Potier P., Vidal D. - Etude des propriétés immunomodulatrices de l'acide hydroxy-10, decene transoïque et de ses dérivés couplés au glycérol, sur une lignée de macrophages - Travaux Scientifiques des Chercheurs de Service de Santé des Armées, 15, 161-162, 1994.
4. - Abou-Hozaiifa B.M., El-Din NKB - Royal jelly, a possible agent to reduce the nicotine induced atherogenic lipoprotein profile - Saudi Medical Journal, 16, 4, 337-342, 1995.

5. - Glinski Z., Kauko L. - Anti infectious protective mechanisms of the honey bee colony - Suomen - Elainlaakarilehti, 101, 7-8, 453-456, 1995.
6. - Woyke J. - Increased food supply to all larvae after dequeening honey bee colonies. Journal of Apicultural Research, 38, 3-4, 117-123, 1999.
7. - Perlin T.A. - Nutritional value of soybean meal, honey, milky meal and sugar at beehives (Apis mellifera) in the production of royal jelly. Ciencia Rural, 29, 2, 345-347, 1999.
8. - Albert S., Klaudivy J., Simuth J. - Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honey bee (Apis mellifera) royal jelly Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29, 5, 427-434, 1999.
9. - Schmitzova J., Klaudivy J., Albert S., Schroder W., Schreckengost W., Hanes J., Judova J., Simuth J. - A family of major royal jelly proteins of the honey bee Apis mellifera L. - Cellular and Molecular Life Sciences, 54, 9, 1020-1030, 1998.
10. - Lin-Hua Rong, Winston M.L., Lin H.R. - The role of nutrition and temperature in the ovarian development of the worker honey bee (Apis mellifera) - Canadian Entomologist, 130, 6, 883-891, 1998.
11. - Chang C.P., Hsieh F.K., Hsu L.R., Hsieh F.K. - Factors influencing 10-hydroxy-delta-2-decenoic acid and other major components of royal jelly in the honey bee - Chinese Journal of Entomology, 13, 2, 161-175, 1993.
12. - Radu - Tudorache G., Marcu E., Boisteanu A., Hagi N., Moisiu M. - Effects of royal jelly used as a growth promotant for calves on some blood values - Lucrari Stiintifice, Institutul Agronomic, Iasi-II, 23, 13-14, 1979.
13. - Tsao W. - Effects of dietary sugars on tissue lipid and carbohydrate in developing honey bee larvae - Canadian Journal of Zoology, 51, 10, 1101-1108, 1973.
14. - Bonomi A. - Osservazioni e rilievi sull'influenza della c.d. pappa reale sull'accrescimento ponderale, sul quadro ematologico, sullo sviluppo delle gonadi maschili e sulla composizione chimico-bromatologica delle carni in gallus gallus L. - Relazione presentata al VI Convegno della Salute, Ferrara, 23-24 maggio 1959.
15. - Bonomi A., Bonomi B.M., Formaggioni P., Quarantelli A. - La gelatina reale nell'alimentazione delle galline produttrici di uova da consumo. Riv. Sci. Alim., 29, 3, 117-130, 2000.
16. - Bonomi A., Bonomi B.M., Quarantelli A. - La gelatina reale nell'alimentazione del tacchino da carne. In corso di stampa.
17. - Bonomi A., Bonomi B.M. - La gelatina reale nell'alimentazione delle anatre da carne. In corso di stampa.
18. - Bonomi A., Bonomi B.M., Quarantelli A. - La gelatina reale nell'alimentazione delle faraone da carne. In corso di stampa.
19. - A.O.A.C. - Official Methods of Analysis, Washington D.C., Association of Official Analytical Chemists, 14th ed., 1984.
20. - Kruger H. - "Ein Beitrag zur Objektiven Bestimmung der Fleischqualität von Jungmastrindern". Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, 1965.
21. - Bonomi A. - "Caratteristiche chimico-biologiche della carne di selvaggina in allevamento industriale". Avicoltura, 44, 3, 67, 1975.

Le produzioni di qualità alla base di una alimentazione naturale in Val Taro e Val Ceno.

Aurelio Marusi°

*Istituto di Ostetricia e Ginecologia Veterinaria -
- Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di
Parma.*

Introduzione

Quando si parla della Val Taro, in particolare di Borgotaro, è ovvio che si pensi al fungo. Borgotaro richiama il fungo porcino e i funghi sono strettamente correlati ad una alimentazione di qualità nella Comunità Montana ValTaro e Val Ceno. Ma oltre al fungo altri prodotti commestibili entrano nel concetto di alimenti graditi nella tradizione gastronomica: il cinghiale, la trota ed i gamberetti di fiume. Per quanto riguarda il maiale, i salumi in particolare della tradizione parmense, ritengo sia opportuno fare alcune considerazioni sulle antiche culture di allevamento di questo animale nelle zone delle Val Taro e Ceno.

La riscoperta del suino nero

E' stato presentato 22 settembre 2000 un progetto di reintroduzione sperimentale di razze suine antiche finalizzate alla produzione dei salumi della tradizione nella provincia di Parma. In occasione di un convegno a Borgotaro sulle produzioni di qualità, si è poi proposto di recuperare e reintrodurre le razze suine antiche in forme di allevamento brado o semibrado, con la valorizzazione del territorio appenninico.

Come si legge dal censimento eseguito il 14 febbraio 1881 sulla produzione di bestiame nel Circondario Valtarese, che comprendeva i comuni di Albareto, Bedonia, Berceto, Borgotaro, Compiano, Tornolo e

Valmozzola , l'allevamento del maiale non era molto seguito dai montanari. In tutto il circondario sono stati censiti solo 1845 suini contro 13.086 bovini, 18.233 pecore e 7175 capre.

Fino alla fine dell'800 ed ancora nei primi anni del XX secolo, il maiale viveva gran parte dell'anno nei pascoli e dentro i boschi, nutrendosi con erbe, radici, cascami di frutti e ghiande. Solo nell'inverno veniva ritirato nel porcile, in genere piccoli locali, angusti, senz'aria e senza luce come scrive nel 1933 Lagasi , cittadino di Bedonia e senatore del Regno.

Erano 3 le razze allevate: la genovese, che era la più antica ed estesa nella Val Taro; la parmigiana, che è stata introdotta dalla pianura verso la montagna dalla metà dell' 1800; la lucchese introdotta nella Val Taro, precisamente a Valmozzola, attorno al 1870 da un certo sig. Agnetti Alessandro di Berceto.

La razza nera parmigiana era caratterizzata da animali rustici e robusti, con mantello grigio scurissimo, che venivano allevati la maggior parte dell'anno all'aperto. Ad un anno di età raggiungevano in media il peso di 80-100 Kg, davano carne e lardo assai ricercati per la squisitezza del gusto e la facile conservazione. Questa razza ha sostituito la razza genovese, più piccola con pelame nero e lunghissime setole, grosse e ruvide: una sorta di cinghiale semidomestico.

La lucchese, con pelame nero e la testa e parte delle spalle bianche, non dava risultati migliori rispetto alla parmigiana e presentava una prolificità più bassa, pertanto è stata in breve tempo sostituita dalla nera parmigiana.

I sistemi di allevamento usati nella zona montana della nostra provincia ancora fino ai primi decenni del '900, erano basati quindi dalla razza parmigiana. Questi maiali neri venivano commerciati sul mercato di Borgo Val di taro e, in gran parte finivano nelle province di

Genova e Spezia. Anche nella valle del Ceno, Varsi e Bardi, venivano allevati maiali di queste caratteristiche. Purtroppo nella razza suina Parmigiana nera per motivi ambientali ma, probabilmente, anche per problemi genetici legati alla stretta consanguineità, si riscontravano spesso alcuni capi, a volte intere figliate, che possedevano una insufficiente capacità ad ingrassare. Ma, soprattutto, il trasformarsi dell'agricoltura, con l'intensificazione delle coltivazioni e lo sviluppo dell'industria casearia, stimolò il bisogno di una razza suina che meglio si adattasse alle cambiate condizioni agricole e fornisse maggior profitto agli allevatori. Si iniziò pertanto ad introdurre i suini di razza Large White.

L'introduzione della razza suina Large White nella nostra provincia risale al 20 settembre 1873 giorno in cui il prof. Antonio Zanelli, direttore dell'Istituto Zootecnico di Reggio E. inviò una coppia di tali suini per l'istituzione di una stazione di monta suina a Parma con lo scopo di diffondere tale razza nella provincia.

Dopo una avversione dei "neri", così venivano chiamati gli allevatori della razza nera parmigiana,

alla introduzione del suino Large White da parte dei "bianchi", la vittoria arrise a questi ultimi se non altro per i vantaggi economici più che per i pregi gastronomici che il suino bianco portava agli allevatori. Con il Large White era possibile sottoporre all'ingrasso un maiale di 10 mesi anziché 16 ed ingrassarlo in modo ottimale per la macellazione in 2 mesi anziché in 4. Ma mentre le alte Valle del Parma e del Baganza, per più facili vie di comunicazione hanno visto una rapida penetrazione di questi maiali inglesi, i maiali Large White ed i meticci da loro derivati non hanno trovato in Val Taro e Val Ceno un clima adatto e soprattutto una alimentazione, basata sull'allevamento brado e semibrado, a loro adeguata. Pertanto dopo modestissimi risultati dal loro allevamento i montanari rinunciarono ai suini inglesi.

Una data importante per l'allevamento del suino in Val Taro e Val Ceno fu la nascita della prima latteria sociale. E' proprio a Varsi che nasce, per merito della Cattedra Ambulante di Agricoltura diretta dal prof. Bizzozero, nel 1896 la prima Latteria Sociale sull'Appennino. Questa prima latteria sociale servirà da modello alle successive. L'allevamento del maiale iniziò allora ad essere fatto prevalentemente dai casari, che così utilizzavano in miglior modo il siero di latte recuperato dalla produzione del formaggio. Per accontentare i montanari che privilegiavano l'allevamento del suino a manto nero il prof. Bizzozero indirizzò gli allevatori verso l'acquisto di suini di razza Large Black. La popolazione suina della montagna è risorta a nuova vita negli anni '30, specialmente nei comuni di Varsi e Bardi. Il miglioramento intrapreso con la razza Large Black ha agevolato poi la introduzione anche in montagna, negli allevamenti annessi ai caseifici sociali, della razza Large White, in modo da utilizzare sempre più il siero di latte la cui produzione andava sempre più aumentando.

Le nuove razze suine inglesi per la loro velocità di sviluppo e capacità di utilizzazione degli alimenti rappresentavano i suini ideali da allevare nei caseifici.

L'evoluzione nell'allevamento suino, soprattutto in montagna, è strettamente correlata al miglioramento dell'allevamento bovino. Una buona rotazione fra la coltivazione delle graminacee e delle leguminose, come aveva indicato il prof. Bizzozero alla fine dell' 800, avrebbe consentito nell'alta Val Taro e Ceno la diffusione di una nuova razza bovina con notevoli doti di produttività lattea rispetto alla tradizionale vacchetta detta bardigiana o valtarese, secondo la zona di allevamento. Fu merito di De Thierry, il promotore della strada del Bocco, aver importato e diffuso nella zona di S.Maria del Taro le prime vacche svizzere della razza Bruna Alpina. Il suo esempio fu seguito da un prete, piuttosto progressista per quei tempi in fatto di zootecnia: Don Antonio Corvi di S. Martino di

Borgotaro. Sulla strada dell'incrocio di sostituzione della valtaresese con la bruna alpina si mise poi il dott.

Gianbattista Marchini che, oltre a procedere ad una moderna coltura foraggera, diede inizio alla costruzione di moderne stalle, adatte all'allevamento della bruna, nei suoi possedimenti della Tolara, vicino a S. Martino, sempre nel comune di Borgotaro. Con l'incrocio di sostituzione della bruna sulla valtaresese si arrivò ad una bovina che produceva il doppio

di latte rispetto alle vacchette locali: 16 litri d'estate e 8 litri d'inverno. Una sorta di BLAP (bovina da latte ad alta produzione) dei nostri nonni che portò ad incrementare notevolmente l'industria casearia.

Da qui, con l'aumento della produzione lattea, anche l'aumento della popolazione suina in pianura ed in montagna della provincia parmense, come si deduce dai censimenti: 26.843 capi nel 1870; 69.661 capi nel 1933.

Con l'accrescersi dell'allevamento del maiale e della produzione di carne suina si ebbe un incremento dell'industria salumiera, particolarmente in pianura e collina parmense i cui prodotti tipici, come prosciutto e culatello, sono conosciuti ed apprezzati ovunque.

Dal punto di vista economico è valido, come è stato proposto, tornare all'allevamento brado o semibrado dell'antica razza suina nera parmigiana? Non credo che le cosce di un maialetto del peso di circa 100 Kg al momento della macellazione siano adatte per la produzione di salumi di qualità come il prosciutto di Langhirano ne tantomeno il culatello di Zibello. Il culatello migliore si ottiene non solo con la stagionatura a Zibello, patria di questo principe dei salumi, ma anche da un maiale, meglio se femmina che abbia partorito almeno una volta, dal peso non inferiore ai 200 Kg. Così mi diceva nei primi anni '60 il comm. Negrone, proprietario dell'omonima industria salumiera, quando veniva a Zibello a scegliere i maiali per i suoi culatelli.

Ricordiamoci che la cultura del prosciutto era sui monti, almeno in Val Taro, assai poco praticata, data la scarsità di suini allevati e le condizioni climatiche non adatte alla stagionatura di questi salumi. In alternativa al prosciutto di maiale i montanari dell'alta Val Taro erano soliti preparare per le loro feste il prosciutto di pecora, assai meno costoso, data l'abbondanza degli ovini, e più facile nella preparazione e stagionatura nell'ambiente e clima che caratterizzano l'Appennino ligure-parmense. Ma oltre le carni ovine erano apprezzate le carni dei cinghiali.

Il cinghiale.

Le aree montane e collinari della Val Taro e Val Ceno sono caratterizzate da condizioni climatiche e biologiche favorevoli alla riproduzione e crescita dei cinghiali, cugino selvatico del maiale, in particolare del suino nero cui assomiglia molto. Il cinghiale è un animale facilmente adattabile in recinti. In provincia di Genova sono presenti allevamenti ibridi con il suino. In Val Taro e Ceno attualmente non sono presenti allevamenti. Il cinghiale ama i boschi tranquilli e fitti di arbusti ed erbe e ricerca attivamente la vicinanza dell'acqua.

Fino alla fine del XIX secolo il cinghiale era abbastanza diffuso, ma l'incremento delle coltivazioni in montagna, la richiesta sempre più elevata di legname, con la presenza sempre più numerosa dell'uomo nel bosco e, non ultima, la caccia in gran parte illegale ha ridotto notevolmente la presenza di questi ungulati selvatici.

Uno degli ultimi cinghiali abbattuti nell'Appennino Parmense si trova conservato nel Museo di Storia Naturale dell'Università di Parma. Si tratta di un grosso esemplare di cinghiale maschio, dono del Podestà di Bardi il 17 dicembre 1926, ma che risulta in realtà essere stato abbattuto a Gravago di Bardi nel 1911.

Del cinghiale è ottima la carne che, oltre la particolare

finezza caratteristica del suino domestico, presenta un sapore tipico di selvaggina. La carne di cinghiale non solo è apprezzata dai cacciatori ma è molto richiesta nei ristoranti di montagna stimolando anche il flusso turistico autunno-invernale.

Con la fine della guerra nel 1945 e la ripresa dell'attività agricola ed industriale, a partire dagli anni '50, si è pensato al ripopolamento dei cinghiali nelle aree boschive delle Val Taro e Ceno.

Ma l'abbandono dei territori montani destinati ad attività agricolo-zootecniche con la migrazione della popolazione verso le zone più industrializzate di pianura, a partire dagli anni '80, ha favorito l'aumento notevole dei cinghiali. Al di fuori dei cacciatori sui nostri monti sono rari, per non dire assenti, i nemici naturali dei cinghiali come il lupo e la lince. Le condizioni climatiche, come le scarse nevicate degli ultimi anni, hanno favorito la riproduzione di questi ungulati selvatici. La diffusione allo stato libero è superiore a quanto si possa pensare a causa della elevata prolificità.

Questa numerosa popolazione di suini selvaggi molto spesso è costituita da branchi di devastatori che spesso escono dal bosco calpestando e distruggono vasti campi coltivati, poiché sono ghiotti di frumento, patate, rape e leguminose.

Solo la caccia quindi ben regolamentata può regolare il rapporto tra ambiente e ungulati selvatici. Difficile stabilire quanti cinghiali siano presenti nelle montagne parmensi, certamente sono molto più numerosi dei maiali domestici allevati nei 7 comuni (Bardi, Bedonia, Borgotaro, Compiano, Tornolo, Valmozzola e Varsi) che comprendono la zona N.6 di caccia nella Provincia di Parma.

In questo territorio risultano attualmente allevati 1200 suini, mentre i cinghiali abbattuti legalmente nella ultima

stagione venatoria dal 17 settembre al 16 dicembre
2000 sono poco meno di 1300.

La trota Valtarese

Un altro prodotto alimentare naturale è utilizzato ed apprezzato dai montanari della Val Taro: la trota.

Ancora alla fine dell '800, le acque del Taro e del Ceno erano ricchissime di pesci, trote, barbi, cavedani e, nei ruscelli confluenti, gamberi. Bastava frugare con le mani sotto le pietre e gli anfratti lungo le rive, per catturare in poche ore i pesci e i gamberi sufficienti per il pranzo della non piccola, allora, famiglia contadina. Ma la passione per la pesca non era solo dei poveri montanari, già nei primi decenni del XIX secolo era praticata l'itticoltura: vicino alla chiesa di Albareto si trova una antica casa detta "Casa Bianca" che era il luogo di villeggiatura dei Marchesi Manara di Borgotaro. Sopra a questa costruzione, circondata da ampi ed ameni prati esisteva una peschiera ove venivano allevate grosse tinche per il diletto della pesca e della cucina dei nobili signori.

Ma con i progressi dell'industria, della chimica e della viabilità, che tanti vantaggi hanno arrecato alle popolazioni dell'Appennino Ligure-Parmense, iniziò una fase di riduzione notevole dei pesci, in particolare la trota.

Con la segheria industriale sorta a S.Maria del Taro, seguita poi dalla fabbrica per l'estrazione dell'acido etilico dal faggio e l'inizio dei lavori per la ferrovia Parma-La Spezia 120 anni or sono, cominciarono ad essere immessi detriti e rifiuti tossici nel fiume Taro che rendevano le acque sempre meno adatte alla riproduzione dei pesci. Ma non solo la trota, ma anche i cavedani ed i barbi

divenivano sempre più rari in quanto le dighe costruite sul Taro ne ostacolavano la risalita verso le acque alte,

più limpide ed ossigenate, adatte alla riproduzione.

Inoltre anche la mancanza di leggi e di controllo sulla pesca favorirono l'uso di mezzi illegali, in primis gli esplosivi, usati per la pesca dai lavoratori, trasformati in pescatori senza scrupoli, che operavano alla costruzione delle strade e della ferrovia.

Questo stato di cose peggiorò di anno in anno e cominciò ad avere una ripercussione sulla economia domestica dei montanari rivieraschi del Taro. La situazione spinse gli amministratori ad una azione di recupero e ripopolamento dei pesci, in particolare della trota, nel Taro. Dal 1893 la Cattedra Ambulante di Borgotaro iniziò la ripopolazione delle trote nelle acque del Taro. La ripopolazione veniva effettuata mediante la immissione di avannotti di trota fario che arrivavano di anno in anno mediante ferrovia dal bacino ittiogenico di Brescia. I risultati però non furono incoraggianti perché per il lungo viaggio in treno da Brescia a Borgotaro e su carri da Borgotaro al luogo di immissione, gli avannotti arrivavano in gran parte morti. Si ricorse allora alla spedizione di uova embrionate che, in numero di 50.000 e più, erano spedite da Brescia e subito immesse in una incubatrice rudimentale consistente in due vaschette collocate nei sotterranei del Municipio di Bedonia.

L'acqua nelle vaschette veniva continuamente rinnovata facendola scorrere continuamente: dopo un mese le uova si schiudevano per dar vita a ottimi avannotti con una percentuale di perdita limitatissima. Una volta che gli avannotti avevano raggiunto le dimensioni adatte, venivano immessi nelle acque del Taro.

Questo metodo di ripopolamento ittico fu praticato dal 1894 fino allo scoppio della prima guerra mondiale. Purtroppo il periodo bellico e le situazioni economiche e sociali che ne seguirono non agevolarono queste nuove tecniche di ittiocoltura.

Fu nel 1924 che, sempre per iniziativa della Cattedra Ambulante di Agricoltura di Borgotaro, fu istituita una Società per la pesca e l'acquacoltura. Questa associazione non riscosse tuttavia molto successo: ben pochi erano i soci aderenti del comune di Bedonia, nonostante il presidente fosse un

bedoniese. I pescatori di frodo con mezzi anche illeciti, continuavano la loro opera devastatrice contro l'opera di ripopolamento ittico.

Si pensò pertanto di risolvere il problema di ripopolamento ittico con la costruzione, direttamente sulle rive del Taro, di un bacino per l'allevamento degli avannotti, che sostituisse quelle rudimentali bacinelle incubatrici poste nelle cantine del comune di Bedonia.

Nel 1926 finalmente, con il contributo dello Stato, della Provincia e della Cassa di Risparmio, si arrivò al collaudo di una diga con annesso un fabbricato, costruito su progetto del geometra Rapetti Carlo di Bedonia, nella zona di Carniglia. In questo stabilimento ittico si provvedeva alla produzione di avannotti di trota per assicurare il ripopolamento dei fiumi Taro e Ceno. Il Corpo Forestale mise anche a disposizione un milite specializzato in acquacoltura e pesca. Tutto questo non impedì, ma almeno limitò, i danni derivati dalla pesca di frodo con esplosivi e cloruri.

Un'altra data importante per l'allevamento della trota e la riproduzione di questo pesce è il 1964.

Fu in quell'anno che per iniziativa del dott. Ferrari, medico di Borgotaro, venne costituita una società per un centro di ittiocoltura ad Albareto. Questo stabilimento ittico, ancora in funzione, era composto da 40 vasche, una peschiera di 160 m. di circonferenza ed un laboratorio per la pratica della inseminazione artificiale. La produzione delle trote non solo era sufficiente per accontentare la richiesta degli abitanti e dei villeggianti nei periodi estivi e dell'annesso

ristorante, ma anche per fornire una buona quantità di avannotti per il ripopolamento nel Taro e nel Ceno. Dal 1968 si iniziò a praticare in un annesso laboratorio la inseminazione artificiale in modo che non fu più necessario importare le uova di trota dallo stabilimento ittico di Brescia.

Dal 1980 lo stabilimento ittico di Carniglia di Bedonia cominciò a funzionare sempre meno fino a cessare completamente la sua funzione di centro per il ripopolamento ittico. Anche la struttura privata di Albareto pochi anni dopo venne data in affitto e, attualmente, svolge una attività prevalentemente commerciale nella vendita delle trote e nel loro utilizzo nel ristorante annesso alla peschiera.

Il gambero di fiume.

Nelle acque del Taro e del Ceno ma, soprattutto, nei torrenti e nei ruscelli con fondo ciottoloso che in questi confluiscano, era presente fino a primi anni '70 una numerosa popolazione di gamberi.

L'*Austropotamobius pallipes italicus*, così viene chiamato scientificamente il nostro gamberetto di fiume, vive negli anfratti sotto le pietre, tra le radici degli alberi poste lungo le rive ed in gallerie, che lui stesso scava lungo le sponde.

La riproduzione in questa specie è piuttosto complessa e richiede periodi di tempo molto lungo rispetto ai mammiferi ed ai pesci. L'epoca riproduttiva coincide con l'abbassamento autunnale della temperatura dell'acqua e va dalla fine di settembre fino a fine novembre. In questo periodo i gamberi, pur essendo animali notturni, presentano una notevole motilità ed escono dai rifugi anche di giorno; i maschi soprattutto che diventano aggressivi e catturano le femmine, immobilizzandole.

Una volta che la femmina viene presa, viene rovesciata

sul dorso, quindi il maschio deposita il materiale seminale, costituito da una sorta di cilindretti contenenti gli spermatozoi, in prossimità dello sbocco degli ovidotti. La femmina, dopo l'accoppiamento, si isola in un sicuro nascondiglio e, in un periodo di tempo che va da 5 a 45 giorni, emette le uova. Assieme alle uova viene emesso un liquido che scioglie i cilindretti contenenti gli spermatozoi ed inizia la fecondazione.

Le uova fecondate, rimangono poi legate ai piedi (pleopodi) della madre grazie ad un secreto viscoso emesso dalle ghiandole tegumentali che, coagulando, le ricopre formando un involucro.

La femmina deve ossigenare e tenere pulite le uova fino al momento della schiusa, che avviene a fine primavera-inizio estate.

Le larvette del gambero rimangono ancora legate ai pleopodi materni per alcuni giorni nutrendosi del tuorlo e crescendo di dimensioni. Inizia quindi la fase delle mute. Le mute sono un fenomeno ricorrente nella vita del gambero: fino ad 8 nella vita larvale e con un ritmo annuale allo stadio adulto. La maturità sessuale viene raggiunta dopo 3-5 anni dalla nascita a seconda delle condizioni climatiche.

Considerata quindi la lunga e complessa funzione riproduttiva del gambero ecco come le modificazioni ambientali provocate dall'uomo, oltre la pesca di frodo, in quanto legalmente proibita essendo il gambero una specie protetta, hanno ridotto notevolmente la sua presenza nei torrenti e ruscelli in questi ultimi 30 anni.

Conclusioni

Se vogliamo riscoprire culture alimentari radicate nei secoli, alleviamo pure i maialetti neri dei nostri antenati, sempre che si riesca a risuscitarli, ma forse è meglio controllare la riproduzione del cinghiale sui nostri monti in alternativa all'allevamento suino, con la corretta

applicazione delle leggi venatorie; un miglior controllo sanitario delle carcasse degli animali abbattuti legalmente consente di congelare il prodotto, in modo da rendere disponibile la carne del cinghiale anche al di fuori del periodo della caccia, senza ricorrere all'importazione di carni di cinghiale congelate addirittura dall'Australia come scrive Salghetti(1998).

Per le trote ed i gamberi il ripopolamento in ambienti naturali diventa sempre più difficile, considerati i lavori di escavazioni e ristrutturazioni dei fiumi e dei torrenti montani.

La industrializzazione che interessa sempre più le aree a ridosso dei corsi di acqua rende difficile la fase riproduttiva della trota ma soprattutto del gambero, già lunga e complessa per natura.

Pertanto è indispensabile che gli Enti preposti alla salvaguardia degli ambienti naturali intensificano gli sforzi per la tutela delle popolazioni ittiche autoctone, soprattutto per le specie più minacciate.

Si potrebbe, a nostro parere, ricorrere alla ristrutturazione dello stabilimento ittico di Carniglia con la rimessa in funzione del laboratorio per la inseminazione artificiale e produzione di avannotti di trota, come è indicato da Gibertoni (1998).

Per i gamberi si potrebbero preparare appositi bacini, adatti alla riproduzione in questa specie in via di estinzione e consentire anche una produzione a fini commerciali, con un richiamo turistico per questo alimento così come si fa per le trote, il cinghiale e ovviamente il fungo porcino.

Parole chiave: maiale, cinghiale, trota, gambero, allevamento.

Key words: boar, pig, trout, crayfish, breeding.

Riassunto - In considerazione di una proposta di

reintrodurre una antica razza di suino nero nelle Valli del Taro e Ceno della montagna parmense, vengono descritte le varie razze e l'allevamento del suino in questi territori, dalla metà del XIX secolo ai tempi attuali. Oltre il maiale, viene descritto anche l'allevamento del cinghiale, soprattutto gli aspetti legati al ripopolamento di questo ungulato selvatico a partire dal 1950. Le scarse nevicate e le condizioni climatiche hanno favorito nell'ultimo decennio una elevata prolificità dei cinghiali che spesso escono dal bosco e distruggono i campi coltivati.

Ma anche i pesci, la trota in particolare, ed i gamberi di fiume sono stati presi in considerazione in quanto si sono ridotti notevolmente: in particolare il gambero che rischia la estinzione. Ciò a causa delle modificazioni ambientali indotte dai lavori di escavazione e ristrutturazione degli alvei dei fiumi e dei torrenti e l'industrializzazione che interessa sempre più le aree a ridosso dei corsi di acqua.

Più che la reintroduzione delle antiche razze suine l'Autore ritiene che sia meglio controllare la crescita numerica dei cinghiali non in equilibrio con il territorio e questo lo si può fare solo con una corretta applicazione della caccia.

Per le trote si potrebbe riattivare lo stabilimento ittico di Carniglia sul fiume Taro con la rimessa in funzione del laboratorio per la inseminazione artificiale e la produzione di avannotti. Infine per i gamberi si potrebbero attuare appositi bacini adatti alla riproduzione di questa specie non solo per evitare la estinzione, ma anche per consentire una tradizionale produzione di qualità a fini commerciali.

Summary - In consideration of proposal of reintroducing an old breed of black swine in the Parma mountains and the valleys of the Taro and Ceno rivers, there are descriptions of the various kinds and breeding of swine in these territories, since the middle of the 19th century to the present time.

Besides the pig, there is also a description of boar breeding, above all the legal aspects of the repopulating of this wild animal, since 1950. The rare snowfalls and the climatic conditions in the last ten years have favoured a high proliferation of the boar which often comes out of the woodland and destroys the cultivated fields.

Also fish, trout in particular, and river crayfish have been taken in consideration because of the fact that they have been greatly reduced in number: in particular the crayfish which is on the risk of extinction.

This because of changes in the surrounding ambient brought by the excavation and works on the river-beds and streams and the general industrialisation which

very often interest the areas very near the course of rivers.

Apart from reintroducing the old breed of pig, the Author thinks it is best in controlling the numeric increase of the boar not in an equilibrium with the surrounding territory, and this is only possible by applying correct hunting laws.

As for the trout, the fishery works at Carniglia, on the Taro river, could be re-established with the restarting of the laboratory for artificial insemination and the production of small fishes.

Lastly, for crayfish, special basins or reservoirs could be built, suitable for the reproduction of this species, not only to avoid extinction, but also to consent a production of traditional quality for the ends of commercial needs.

Bibliografia

- Ghittino P. Tecnologia e patologia in acquacoltura. Parma 1983.
- Gibertoni P.P. Jelli F. Bracchi P.G. Allevamento, riproduzione e reintroduzione in ambiente naturale di trote fario di "ceppo mediterraneo". Annali Facoltà di Medicina Veterinaria. Università di Parma. 1998.
- Grilli T. Cenni Storici di Albareto di Borgotaro. (Diocesi di Pontremoli) 1893.
- Lagasi P. Il mio paese dal 1806 al 1933. Bedonia 1933.
- Massera B. Caratterizzazione molecolare preliminare del gambero di fiume. Tesi di Laurea 1995.
- Spigardi P. Studi sulle razze degli animali domestici della valle del Taro. Borgotaro 1887.
- Salghetti A. Aspetti economici dell'allevamento del cinghiale. Annali Facoltà di Medicina Veterinaria. Università di Parma. 1998.

OBSERVATIONS ON PERCENTAGE DISTRIBUTION OF THE MAIN MARE MILK CASEINS SEPARATED BY REVERSED-PHASE HPLC

M. Malacarne, A. Summer, P. Formaggioni, P. Mariani⁽¹⁾

Introduction

The pH 4.6 soluble fractions of mare milk proteins were investigated [1-5] and sufficiently characterised [6-14]. The study concerning casein was principally focused towards the concentration variations and the main properties of the *in toto* protein [1, 15-20], as well as towards its aminoacid composition [4, 15], rather than towards the characterisation of the individual fractions. It was, probably, due to the difficulty encountered in the separation and identification of the casein components by means of conventional separative methods.

The most utilised criterion to identify mare caseins was to compare electrophoretic patterns and/or chromatographic profiles of mare casein with that of cow; this supposing that mare casein fractions retain physico-chemical characteristics similar to the corresponding caseins of cow. In such a way, Kudryashov *et al.* [21], by means of paper electrophoresis, identified α_s -Cn, β -Cn, k-Cn e α -Cn fractions of mare milk. Similarly, O'Connor and Fox [18], by starch-gel electrophoresis (SGE), individuated the bands corresponding to α_s -Cn e β -Cn fractions. Frequently the electrophoresis on polyacrylamide-urea (Urea-PAGE) was also utilised [4, 22]; the proteins were always identified by the comparison with cow casein profiles.

Recently, the separation power of denaturant gels, for instance PAGE in presence of sodium-dodecyl-sulphate (SDS-PAGE), was investigated [19, 23-25]; but such method, very useful to separate whey proteins, at this time was not successful to obtain an adequate separation of mare casein fractions. Sometimes, in addition to conventional electrophoretic methods, capillary-zone-electrophoresis (CZE) [24, 25], isoelectric focusing (IEF) [24, 26] and reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) [27] techniques were applied. The patterns obtained confirmed the good separative ability of such methods also towards mare caseins, but the biochemical characterisation of the casein fractions was never tried.

Up to the present, the only researches that report the isolation and characterisation of some casein fractions of mare milk were those of Visser *et al.* [28] and Ochirkhuyag *et al.* [29]. In both cases, in addition to the use of electrophoretic and chromatographic methods, as preliminary approach the Authors utilised the temperature-dependent solubility of some casein fractions; this latter property was already used by O'Connor and Fox [18] to evidence a fraction that the Authors identified as the corresponding to β -Cn by comparison on SGE with the cow caseins.

In particular, Visser *et al.* [28] used the ion-exchange chromatography, whereas Ochirkhuyag *et al.* [29], besides this technique, also applied the RP-HPLC. Basing on the aminoacid sequence, the caseins purified by Visser *et al.* [28] were identified as the corresponding to β -Cn and γ -Cn of the cow. **Recently, Ochirkhuyag *et al.* [29] isolated and identified two casein fractions that, in the sequenced region, show an high degree of homology towards the caseins α_{s1} and α_{s2} of cow milk.**

Moreover, particularly interesting are the researches involved in the identification and characterisation of the mare casein fraction corresponding to the cow k-casein. In some works, this fraction was individuated by comparison of electrophoretic patterns [4, 21]. In other cases it was tried to evidence it in a most specific way, assuming that the fraction of mare milk retains some of the physico-chemical properties that are peculiar of the cow k-casein, as the sensitivity to chymosin, the presence of carbohydrate groups and the stabilising function played at micellar level towards α_s and β caseins; to this aim were applied appropriate biochemical methods [22, 28-30]. From these researches emerged the difficulty to evidence the presence of such fraction in mare milk.

According to Ono *et al.* [22], for instance, the k-casein wouldn't represent a component of the micellar system in mare milk.

The aim of this work was to study, in a preliminary way, the distribution of the main mare milk caseins separated by reversed-phase HPLC.

Materials and methods

The research was carried out on 10 individual milk samples from nursing mares of Italian Saddle Horse breed. Milk was obtained by hand milking from a single mammary gland, milked as deep as possible. The casein was prepared from skim milk by precipitation at pH 4.6 according to Aschaffenburg and Drewry [31], and then washed, freeze dried and stored at -20°C. Starch-gel electrophoresis (SGE) of casein in presence of urea at pH 8.6 was performed as described by Aschaffenburg and Michalak [32].

Fractionation of casein by reversed-phase HPLC was carried out according to Visser *et al.* [33] with Spectra Physic equipment: pump mod. 8800; Spectra Focus detector; loop 10 μ l; Vydac TP silica C₁₈ column 25 cm per 4.6 mm (particle size 5 μ m, pore size 300 E); operative conditions: column temperature 40°C, 10 μ g of protein were loaded on the column. To identify cow casein fractions, commercial standards controlled by SGE (α_s , β , k e γ) were utilised. The mare casein RP-HPLC profiles were compared with cow casein profiles, to the aim of a direct comparison of the retention times (RT). The values of individual casein peaks were expressed as a percent of the developed area at 220 nm [34]. Attempts to identify chromatographic peaks of mare milk, comparing some properties (deduced from the aminoacid composition [29], e.g. hydrophobicity) of mare and cow α_{s1} , α_{s2} and β caseins, were performed.

Results and discussion

The RP-HPLC profile of casein, from a 6th parity mare at the 32 lactation day, is compared in figure 1 with the casein profile of a 3th parity cow at the 150 lactation day. The chromatogram of mare milk results characterised by the presence, as reported by Urbanke *et al.* [35], of two principal peaks, I and II, whose retention times show a good correspondence, respectively, with those of the α_{s2} and β cow caseins; in addition, a lot of several peaks of minor entity are evidenced.

The peak I, apparently related to α_{s2} cow casein (" α_{s2} zone"), results formed by a clearly major peak and a small shoulder. The peak II is inclined to show a retention time almost intermediate with respect to those of the α_{s1} and β caseins of cow [35], precisely to the B/C and A² variants, respectively. Actually, the retention times analysis of cow casein variants [36] allows to point out that peak II falls in the " β zone", manifesting a retention time intermediate with respect to the variants B and A¹/C of cow β -casein. The mare profile doesn't present any specific peak in correspondence of the " α_{s1} zone" of cow casein.

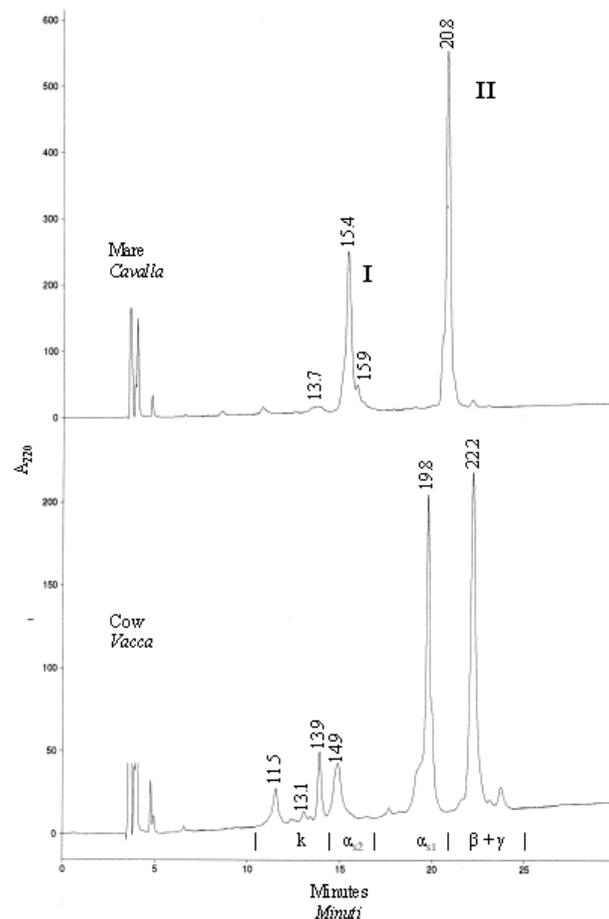


Figure 1. RP-HPLC profiles of mare (above) and cow (below) isoelectric caseins: analysis according to Visser *et al.* [33]. Cow genotype: α_{s1} -Cn BC, α_{s2} -Cn AA, β -Cn A² A² and k-Cn BB (RT of k-Cn = 13.9 min).

Figura 1. Profili RP-HPLC di caseine isoelettiche di latte di cavalla (sopra) e di latte di vacca (sotto): analisi secondo Visser *et al.* [33]. Tipo genetico della vacca: α_{s1} -Cn BC, α_{s2} -Cn AA, β -Cn A² A² e k-Cn BB (TR della k-Cn = 13,9 min).

β -Cn A²A² and k-Cn BB (RT of k-Cn = 13.9 min).
 Figura 1. Profili RP-HPLC di caseine isoelettiche di latte di cavalla (sopra) e di latte di vacca (sotto): analisi secondo Visser et al. [33]. Tipo genetico della vacca: α_1 -Cn BC, α_2 -Cn AA, β -Cn A²A² e k-Cn BB (TR della k-Cn = 13,9 min).

According to such information, a quantitative distribution of the two principal mare casein fractions, indicated as peak I and peak II (that must be considered probably corresponding to the fractions " α_{s2} " and β of cow casein, respectively) was tried (Table 1). The 45.4% of the total chromatogram area corresponds to the β -Cn, already identified in the peak II; the individual values vary between a *minimum* of 40.9% and a *maximum* of 52.0%. The peak I, originally identified as " α_{s2} -Cn", represents the 40.2% of the total area (*min.* 35.7%, *max.* 47.1%).

Table 1. Percentage distribution of the main mare milk casein fractions (peak I and peak II), separated by RP-HPLC according to Visser et al. [33]. Individual values of 10 mares of Italian Saddle Horse breed.

Tabella 1. Ripartizione percentuale delle principali frazioni caseiniche (picco I e picco II) del latte di cavalla, separate mediante RP-HPLC secondo Visser et al. [33]. Dati individuali di 10 giumente di razza Cavallo Sella Italiano.

Mare Cavalla	Parities Parti	Lactation stage Stadio di lattazione	Peak I (cow α_{s2} zone) Picco I (zona α_{s2} di vacca)	Peak II (cow β zone) Picco II (zona β di vacca)	Minor peaks Picchi minori
No.	No.	d	%	%	%
1	2	35	41.64 ⁽¹⁾	43.89	14.47
2	3	73	38.32	40.85	20.83
3	14	53	45.08	42.13	12.79
4	3	42	37.51	47.60	19.89
5	5	30	47.05	42.61	10.34
6	2	70	40.78	48.00	11.22
7	1	186	38.46	44.63	16.91
8	1	36	40.84	46.60	12.56
9	7	25	35.70	45.86	18.44
10	15	50	36.28	52.04	11.68
Mean Media			40.17	45.42	14.91
Standard deviation Deviazione standard			3.70	3.32	3.82

⁽¹⁾ Individual peak areas as % of total area (A_{s20}).

⁽¹⁾ Aree dei singoli picchi come percentuale dell'area totale (A_{s20}).

Ochirkhuyag et al. [29], by means of densitometric analysis of acrylamide gel, found a distribution close to that observed in this research, precisely with values equal to 51.4% for the casein that they identify as β and to 40.8% for the total amount of α_{s1} and α_{s2} fractions. From the RP-HPLC chromatograms it can be deduced that the ratio between β -Cn and the fractions indicated as " α_{s2} -Cn" results equal to 1.13 (Table 1); this value is almost similar to that, equal to 1.26, obtained from data reported by Ochirkhuyag et al. [29], calculated between β -Cn and the total amount of the two α_s fractions. It leads to suppose that the quantitative value initially associated to the mare " α_{s2} -Cn" is actually due to the contribute of both α_s casein fractions.

The analysis of the RP-HPLC profiles of mare casein reported by Ochirkhuyag et al. [29], with reference to the methods utilised by the Authors, permits to point out useful information for a better interpretation of the chromatogram obtained in the present research. The profiles evidence that the β fraction results characterised by a higher RT in comparison with those of both α_s fractions, that present retention times very similar, being just slightly higher the α_{s1} RT respect to the α_{s2} one.

The combined study of charge data and polarity characteristics (Table 2) as well as retention times (Figure1) permits to further clarify the general outline. In the three aminoacid classes, the mare

α_{s1} and α_{s2} casein fractions show a very similar distribution, but such to indicate an hydrophobic degree slightly higher for the α_{s1} . The β -Cn and α_{s2} -Cn mare fractions present an aminoacid distribution rather similar compared with those of the corresponding cow casein fractions. From these elements it's possible to point out the indication that the β -Cn and α_{s2} -Cn mare fractions are really detectable in the same chromatographic zones of the corresponding cow fractions (to support the initially attribution made on the basis of the comparison of the profiles) and that the α_{s1} mare fraction, not detectable by comparison at a chromatographic level, probably falls within the elution zone of the α_{s2} casein.

Table 2. Polarity and charge characteristics of mare and cow α_{s1} , α_{s2} - and β - casein fractions; values reconstructed according to the aminoacid composition of single fractions reported by Ochirkhuyag *et al.* [29].

Tabella 2. Caratteristiche di polarità e di carica delle caseine α_{s1} , α_{s2} e β di cavalla e di vacca: valori ricostruiti utilizzando i dati di composizione aminoacidica riportati da Ochirkhuyag *et al.* [29].

Classes Classi	α_{s1} -Cn		α_{s2} -Cn		β -Cn	
	Mare Cavalla	Cow Vacca	Mare Cavalla	Cow Vacca	Mare Cavalla	Cow Vacca
Polar aminoacids (%) <i>Aminoacidi polari</i>	35.30	43.50	34.20	32.90	51.60	53.10
Apolar aminoacids (%) ⁽¹⁾⁽²⁾ <i>Aminoacidi apolari</i>	31.35	29.05	31.60	36.20	24.85	21.10
Charged aminoacids (%) ⁽¹⁾ <i>Aminoacidi carichi</i>	33.35	27.45	34.20	30.90	23.55	25.40

⁽¹⁾ In the original tables, the percentage values regarding ASX and GLX were assigned for an half to the apolar aminoacid class and for an half to the charged one.

⁽²⁾ Nelle tabelle originali le percentuali riguardanti ASX e GLX sono state assegnate per metà agli aminoacidi apolari e per metà a quelli carichi.

⁽³⁾ The TRY percent value was not investigated by the Authors.

⁽⁴⁾ Il valore percentuale di TRY non è stato rilevato dagli Autori.

It results that mare peak I, originally indicated as " α_{s2} -Cn" by direct comparison with cow profiles, is actually constituted by both fractions, namely α_{s2} -Cn and α_{s1} -Cn. The structure of the peak I (Figure 1), at the light of the analysis made in the course of this research, suggests that the major fraction, equal to 30-32 percent units of the total area, corresponds to the α_{s2} -Cn, whereas the remaining area (8-10 units), corresponding to the small shoulder, is identifiable with the α_{s1} -Cn fraction.

This assumption seems to find confirm in the numerous electrophoretic patterns made in this study (Figure 2). In fact, the faster migrating casein group in the SGE pattern, corresponding to the α_s -casein, consisted of two subgroups characterised by different mobility and intensity: the faster one seems to be corresponding to the α_{s1} (Figure 2; °), whereas the slower and most marked one, is attributable to the α_{s2} (Figure 2; °°), as clearly deduced from Ochirkhuyag *et al.* [29]. The different distribution of the two α_s casein fractions, assumed on the basis of the RP-HPLC patterns, finds confirmation in the different intensity of the relative electrophoretic bands (Figure 2).

Moreover, from the comparative RP-HPLC analysis, it's possible to achieve that one of the minor mare peaks (RT = 13.7), which represents about the 3 % of the total area, is directly reportable to the peak (RT = 13.9) corresponding to the cow k-casein (Figure 1); however, at the moment, it wasn't possible to individuate the nature of such casein fraction in the mare milk.

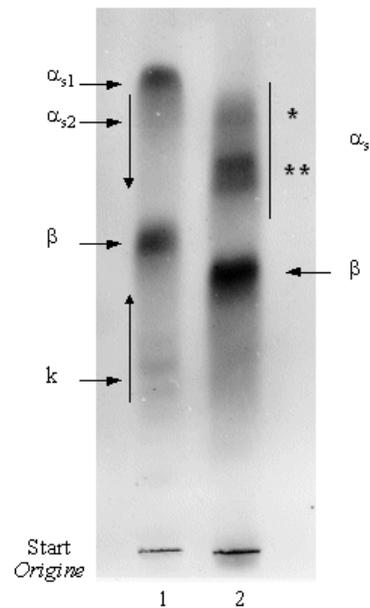


Figure 2. Electrophoretic patterns of (1) cow casein and (2) mare casein. SGE at pH 8.6 was performed as described by Aschaffenburg and Michalak [32]. On the left the cow casein fractions are reported. On the right the probable mare casein fractions are reported: with * and ** are indicated the small shoulder and the major fraction of the peak I, respectively (see Figure 1).

Figura 2. Patterni elettroforetici di (1) caseina di vacca e (2) caseina di cavalla. SGE a pH 8.6 secondo Aschaffenburg e Michalak [32]. A sinistra sono riportate le caseine della vacca. A destra sono indicate le probabili caseine di cavalla: con * e ** si indicano rispettivamente le "porzioni" minore e maggiore del picco I di cui alla Figura 1.

Conclusions

The RP-HPLC profile of mare milk casein results primarily formed by two quantitatively relevant fractions. The casein most represented, characterised by the highest retention time, is almost certainly identifiable with the β -casein fraction of cow milk; whereas the other fraction, that elutes in correspondence of the " α_{s2} zone" of cow profile, seems heterogeneous. In fact, it would result constituted by a major peak, probably corresponding to α_{s2} -casein properly said, and by a minor fraction (small shoulder peak), characterised by a slightly higher hydrophobicity, probably corresponding to the cow α_{s1} -casein, but showing a clearly lower retention time towards it.

Key words: Italian Saddle Horse, mare milk, casein fractions, RP-HPLC, SGE.

Parole chiave: Cavallo Sella Italiano, latte di giumenta, frazioni caseiniche, RP-HPLC, SGE.

SUMMARY - The distribution of the principal mare milk caseins by means of RP-HPLC was studied. The fractionation of the casein was made according to Visser *et al.*, 1986, *Michwissenschaft*, 41, 559. The retention times were compared with those of cow milk, taking into account the different aminoacid composition of the respective casein fractions, according to Ochirkhuyag *et al.*, 2000, *Lait*, 80, 223. The profiles were characterised primarily by two principal peaks and a lot of several peaks of very small entity. The peak II area, characterised by the highest retention time, almost certainly attributable to β -casein, presented a development corresponding to the 45.4% of the total area. The peak I, equal to 40.2% of the total area, resulted formed by a major fraction (about 30 units) and a minor one or small shoulder (about 10 units), characterised by a retention time slightly higher, probably corresponding to the α_{s2} and α_{s1} caseins, respectively.

RIASSUNTO - Osservazioni sulla ripartizione percentuale delle principali caseine del latte di cavalla separate mediante HPLC in fase inversa. È stata studiata la ripartizione delle principali caseine del latte di cavalla mediante HPLC in fase inversa. Il frazionamento della caseina è stato effettuato utilizzando la tecnica di Visser *et al.*, 1986, *Michwissenschaft*, 41, 559. I tempi di ritenzione sono stati confrontati con quelli delle caseine di vacca, tenendo in considerazione la differente composizione aminoacidica delle rispettive frazioni caseiniche secondo Ochirkhuyag *et al.*, 2000, *Lait*, 80, 223. I tracciati sono risultati caratterizzati essenzialmente da due picchi principali e da un certo numero di picchi minori. L'area del picco II, caratterizzato dal più elevato tempo di ritenzione, quasi sicuramente attribuibile alla frazione β -caseina, ha presentato uno sviluppo pari al 45.4% dell'area totale. Il picco I, pari al 40.2% dell'area totale, è risultato a sua volta formato da una porzione nettamente maggiore (circa 30 parti) e da una porzione minore o spalla (circa 10 parti), contraddistinta da un tempo di ritenzione leggermente superiore, probabilmente corrispondenti, rispettivamente, alle caseine α_{s2} e α_{s1} .

References

- 1) Minieri L., Intrieri F. (1970) - Ricerche elettroforetiche sulle frazioni proteiche del colostro e del latte di cavalle di razza Avelignese, in rapporto alla distanza dal parto. *Acta Medica Vet.*, 16, 73-88.
- 2) Kingsbury E.T., Gaunt S.N. (1977) - Heterogeneity in whey proteins of mare's milk. *J. Dairy Sci.*, 60, 274-277.
- 3) Chiofalo L., Micari P., Sturmiolo G. (1983) - Polimorfismo delle proteine del latte in popolazioni cavalline allevate in Sicilia. *Zoot. Nutr. Anim.*, 9, 311-318.
- 4) Abd El-Salam M.H., Farag Seham I., El-Dein Hala F., Mahfouz M.B., El-Etriby H.M. (1992) - A comparative study in milk proteins of some mammals. *Proc. 5th Egyptian Conf. Dairy Sci. & Techn.*, 281-287.
- 5) Urbanke W., Luf W. (1993) - "Identification of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey from ewes, goats and mares by a combination of reverse-phase HPLC and derivation spectroscopy". *DMZ, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, 114, 403-407.
- 6) Bell K., Mc Kenzie H.A., Muller V., Rogers C., Shaw D.C. (1981) - Equine whey proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 225-236.
- 7) Conti A., Godovac-Zimmerman J., Liberatori J., Braunitzer G. (1984) - The primary structure of monomeric β -lactoglobulin I from horse colostrum (*Equus caballus*, *Perissodactyla*). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 365, 1393-1401.
- 8) Jollès J., Donda A., Amiguet P., Jollès P. (1984) - Mare lactotransferrin: purification, analysis and N-terminal sequence determination. *FEBS Lett.*, 176, 185-188.
- 9) Kaminogawa S., Mc Kenzie H.A., Shaw D. (1984) - The amino acid sequence of equine α -lactalbumin. *Biochem. Int.*, 9, 539-546.
- 10) Godovac-Zimmerman J., Conti A., Liberatori J., Braunitzer G. (1985) - The amino acid sequence of β -lactoglobulin II from horse colostrum (*Equus caballus*, *Perissodactyla*): β -lactoglobulin are retinol-binding proteins. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 366, 601-608.
- 11) Godovac-Zimmerman J., Shaw D., Conti A., Mc Kenzie H.A. (1987) - Identification and the primary structure of equine α -lactalbumin B and C (*Equus caballus*, *Perissodactyla*). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 368, 427-433.
- 12) Bonomi F., Iametti S., Pagliarini E., Solaroli G. (1994) - Thermal sensitivity of mares' milk proteins. *J. Dairy Res.*, 61, 419-422.
- 13) Ikeguchi M., Kato S., Shimizu A., Sugai S. (1997) - Molten globule state of equine β -lactoglobulin. *Proteins*, 27, 567-575.
- 14) Sugai S., Ikeguchi M., Shimizu A. (1999) - Characteristic properties of equine milk proteins. *Inter. J. Food Sci. Techn.*, 34, 437-443.
- 15) Antila V., Kylä-Sturola A.L., Uusi-Rauva E., Antila M. (1971) - "Investigation of Finnish mares' milk". *Suomen Kemistilehti*, B44, 193-196.
- 16) Lauer B.H., Baker B.E. (1972) - Polyacrylamide-gel disc electrophoresis of caseins isolated from milks of different species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 42B, 323-328.
- 17) Jenness R. (1973) - Caseins and caseinate micelles of various species. *Neth. Milk Dairy J.*, 27, 251-257.
- 18) O'Connor P., Fox P.F. (1973) - Temperature-dependent dissociation of casein micelles from the milk of various species. *Neth. Milk Dairy J.*, 27, 199-217.
- 19) Cairoli S., Nola R., Pasquini M., Casini L., Orlandi M., Greppi G.F. (1993) - Electrophoretic studies on the protein fractions in mare's colostrum. *Atti Soc. Ital. Progr. Zoot.*, 28, 197-207.
- 20) Csapó-Kiss Zs., Stefler J., Martin T.G., Makray S., Csapó 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.
- 21) Kudryashov A.G., Sergeeva A.V., Krylova O.N. (1964) - "Chemical composition of milk from Orlov Trotter mares". *Dokl. mosk. sel'.-khov. Akad. K. A. Timiryazeva (Zootekhniya)*. 1964(104), 135-137 (from DSA, 1967, 29, 114).
- 22) Ono T., Kohno H., Odagiri S., Takagi T. (1989) - Subunit components of casein micelles from bovine, ovine, caprine and equine milks. *J. Dairy Res.*, 56, 61-68.
- 23) Pagliarini E., Solaroli G., Peri C. (1993) - Chemical and physical characteristics of mare's milk. *Ital. J. Food Sci.*, 5, 323-332.
- 24) Curadi M.C., Cattaneo T.M.P., Casini L., Greppi G.F., Orlandi M. (1995) - Electrophoretic characteristics of protein fractions in mare's colostrum and milk. *Atti S. I. S. Vet.*, 49, 937-938.
- 25) Curadi M.C., Orlandi M., Greppi G.F., Toppino P.M., Barzaghi S., Cattaneo T.M.P. (2000) - Identification of proteins fractions in mare's colostrum and milk. *Milchwissenschaft*, 55, 446-449.
- 26) Vörös O., Csapó J., Baranyi M., Csapóné Kiss Zs., Stefler J. (1999) - Examination of milk proteins from mare's milk by polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 3(1), 1-10.
- 27) Iametti S., Sessa F., Bonomi F., Greppi G.F., Feligini M., Enne G. (1997) - Biochemical methods for the characterization of mare and donkey caseins. *Proc. Inter. Dairy Federation Seminar*, s.i. 9702, 268-274. IDF, Brussels, B.
- 28) Visser S., Jenness R., Mullin R.J. (1982) - Isolation and characterization of β - and γ -caseins from horse milk. *Biochem. J.*, 203, 131-139.
- 29) Ochirkhuyag B., Chobert J.M., Dalgalarrondo M., Haertlé T. (2000) - Characterization of mare caseins. Identification of α_{s1} - and α_{s2} -caseins. *Lait*, 80, 223-235.
- 30) Kotts C., Jenness R. (1976) - Isolation of k-casein-like proteins from milks of various species. *J. Dairy Sci.*, 59, 816-822.
- 31) Aschaffenburg R., Drewry J. (1959) - New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. *15th Int. Dairy Congr.*, 3, 1631-1637.
- 32) Aschaffenburg R., Michalak W. (1968) - Simultaneous phenotyping procedure for milk proteins: improved resolution of the β -lactoglobulins. *J. Dairy Sci.*, 58, 1849.
- 33) Visser S., Slangen K.J., Rollema H.S. (1986) - High-performance liquid chromatography of bovine caseins with the application of various stationary phases. *Milchwissenschaft*, 41, 559-562.
- 34) Van Den Berg G., Escher J.T.M., De Koning P.J., Bovenhuis H. (1992) - Genetic polymorphism of k-casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Neth. Milk Dairy J.*, 46, 145-168.
- 35) Urbanke W., Luf W., Brandl E. (1992) - "Use of HPLC for control of the adulteration of milk and milk products of different species". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 195, 137-142.
- 36) Visser S., Slangen C.J., Rollema H.S. (1991) - Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 548, 361-370.

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND ENERGY VALUE OF HAFLINGER NURSING MARE MILK DURING 6 LACTATION MONTHS^{1, 2}

A. Summer, P. Formaggioni, S. Filippini, F. Martuzzi, A.L. Catalano, P. Mariani ³

¹ Research program co-financed by "Università degli Studi di Parma" and "Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica", 1998.

²Communication presented at the 2nd congress "Nuove acquisizioni in materia di alimentazione, allevamento e allenamento del cavallo sportivo", Campobasso, 13-14 October 2000.

³ *Istituto di Zootecnica Alimentazione e Nutrizione, Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma.*

Introduction

The foal, in the various phases of the suckling period, has at its disposal milk amounts that are sufficiently defined [1, 2], but rather variable [3], usually increasing during the first weeks of life. The availability of the nutrients varies considerably also in relation to the evolution of milk quality during the lactation cycle [4-6]. The knowledges, under this profile, with particular reference to the variables characterising the "plastic" and energy value of milk, are not well defined yet. There are several contrasting indications, for example, about the trend of fat content, as well as about the degree of protein and salt impoverishment in the milk, also in correspondence of the most tricky phases of development for the foal [4, 7-11].

Aim of this work was to give a contribution to the knowledge of the main properties of Haflinger nursing mare milk, with particular reference to their trend during 6 lactation months.

Materials and methods

The study was carried out on individual milk samples of 5 nursing mares of Haflinger Horse breed, reared in a stud in Brescia province (Northern Italy). The mares, from 7 to 14 years of age (4 + 11 parities), live weight between 400 and 490 kg, were fed hay and perennial rye-grass, in prevalence, and lucerne, *ad libitum*. Concentrate was given occasionally, in moderate quantity (*max.* 3 kg), only to some mares during the 1st and 4th/5th lactation month. Deliveries, all regular, happened in March (2), April (2) and May (1). Milk samplings (8 per mare) were collected at d 4, 20, 40, 60, 80, 120, 150 and 180 *post-partum*, for a total collection of 40 individual samples. Milk was taken by hand-milking from a single mammary gland, milked as deep as possible, in presence of the foal, that was previously prevented from suckling for 1 - 2 hours by a muzzle.

On the single milk samples the following analyses were carried out: pH by a potentiometer; titratable acidity (°SH) with 0.25N NaOH according to Soxhlet-Henkel method [12]; density at 15°C by means of Quevenne lactometer; freezing point by a thermistor cryoscope; total solids on 20 g milk at 102°C for 6 hours; fat and lactose by means of mid infrared lectures [13] with Milko-Scan 134A/B; total N and non protein N (NPN) by Kjeldahl [14]; ash on 20 g milk at 530 °C. Gross energy (kcal/kg) was calculated by coefficients reported by Oftedal *et al.* [15], in particular 9.11 for fat, 5.86 for true protein, 7.40 for non protein N and 3.95 for lactose. Data were analysed by two way ANOVA (fixed effect: lactation stage; random effect: mare) and least significant difference test application.

Results and discussion

a) *Physico-chemical properties.* - The values of density and freezing point have a specular trend (Table1). The density, starting from the 4th day *post-partum* to the 60th lactation day, decreases significantly (from 1.038 to 1.035). In the same period, the freezing point varies considerably (from - 0.536 to - 0.520 °C), going towards the water freezing point. In the following phases, until the 180th lactation day, the values of these two properties tend to maintain a rather constant trend, precisely about 1.035 for the density and - 0.524 °C for the freezing point.

Milk produced near the *partum* has a low pH (6.60) and a fairly high titratable acidity (6.08 °SH at the 4th day). During the following 2-3 weeks the values of both properties vary deeply in a specular way: pH markedly increases (6.93) and titratable acidity drastically decreases (3.40 °SH at 20th day) (Fig. 1). In the following phases of the lactation the variations are moderate, but sufficient to indicate the tendency of a pH increase (7.11) and a titratable acidity decrease (2.01 °SH at 180th day). Variations relative to the pH are in rather good agreement with those observed by Johnston *et al.* [16] during the first two weeks of lactation. Regarding titratable acidity values there is a substantial agreement with Storch [17], but not with the observations of Kulisa [18], that reports a quite peculiar trend, characterised by a considerable increase of the titratable acidity values from the 60th (2.83 °SH) to the 150th lactation day (3.61 °SH).

Table 1. Physico-chemical properties and energy value of Haflinger mare milk in relation to the lactation stage (5 mares; 8 samplings per mare). Mean \pm sd

Tabella 1. Proprietà chimico-fisiche e valore energetico del latte di cavalle di razza Avelignese in rapporto allo stadio di lattazione (5 cavalle; 8 prelievi per cavalla). Media \pm ds

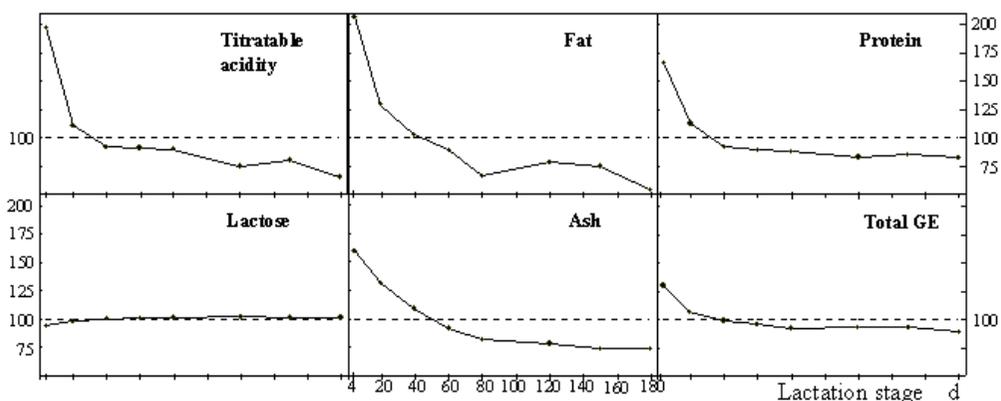
Lactation stage	Density at 15°C	Freezing point	pH	Titrateable acidity	Total solids	Fat	Protein	Lactose	Ash	
d		Δ °C		°SH	g/100g					
4	1.0377 ^c 0.0014	0.536 0.013	6.60 ^a 0.11	6.08 ^d 0.68	11.88 ^d 0.47	1.66 ^c 0.45	3.29 ^c 0.24	6.36 ^a 0.02	0.57 ^a 0.04	
20	1.0361 ^b 0.0008	0.530 0.008	6.93 ^{bc} 0.12	3.40 ^c 0.45	10.39 ^c 0.70	1.04 ^b 0.59	2.23 ^b 0.23	6.65 ^b 0.08	0.47 ^d 0.04	
40	1.0353 ^{ab} 0.0011	0.528 0.006	7.01 ^{bc} 0.19	2.82 ^{bc} 0.63	9.81 ^{bc} 0.30	0.82 ^{ab} 0.36	1.82 ^a 0.17	6.78 ^{bc} 0.16	0.39 ^c 0.02	
60	1.0346 ^a 0.0010	0.520 0.018	6.88 ^b 0.05	2.82 ^{bc} 0.39	9.62 ^{ab} 0.26	0.72 ^{ab} 0.22	1.77 ^a 0.14	6.80 ^{bc} 0.20	0.33 ^b 0.03	
80	1.0352 ^{ab} 0.0007	0.525 0.010	6.92 ^b 0.14	2.76 ^b 0.49	9.43 ^{ab} 0.26	0.53 ^a 0.17	1.74 ^a 0.13	6.86 ^c 0.08	0.29 ^{ab} 0.02	
120	1.0346 ^a 0.0007	0.524 0.008	7.03 ^{bc} 0.15	2.31 ^{ab} 0.41	9.43 ^{ab} 0.68	0.62 ^{ab} 0.45	1.64 ^a 0.16	6.88 ^c 0.21	0.28 ^{ab} 0.01	
150	1.0346 ^a 0.0011	0.525 0.011	7.02 ^{bc} 0.17	2.48 ^{ab} 0.51	9.41 ^{ab} 0.34	0.60 ^{ab} 0.07	1.69 ^a 0.41	6.85 ^c 0.13	0.27 ^a 0.08	
180	1.0345 ^a 0.0009	0.523 0.016	7.11 ^c 0.18	2.01 ^a 0.16	9.21 ^a 0.36	0.44 ^a 0.10	1.63 ^a 0.28	6.88 ^c 0.14	0.27 ^a 0.06	
	***		***	****	****	***	****	****	****	
	GE fat	GE true prot.	GE lactose	GE NPN	GE total	GE lact. / GE tot.				
	kcal / kg						%			
4	151.2 ^c	177.7 ^c	251.2 ^a	2.9 ^c	583.1 ^c	43.31 ^a				
20	94.7 ^b	117.5 ^b	262.8 ^b	2.6 ^b	477.6 ^b	55.65 ^b				
40	75.1 ^{ab}	96.3 ^a	267.7 ^{bc}	2.1 ^a	441.1 ^{ab}	60.95 ^{bc}				
60	65.4 ^{ab}	92.4 ^a	268.8 ^{bc}	2.2 ^{ab}	428.8 ^a	62.77 ^{cd}				
80	48.5 ^a	91.4 ^a	271.0 ^c	2.1 ^{ab}	413.0 ^a	65.70 ^{cd}				
120	56.9 ^{ab}	84.4 ^a	272.0 ^c	2.3 ^{ab}	415.5 ^a	66.08 ^{cd}				
150	55.0 ^{ab}	87.6 ^a	270.6 ^c	2.3 ^{ab}	415.5 ^a	65.22 ^{cd}				
180	39.9 ^a	83.8 ^a	271.8 ^c	2.3 ^{ab}	397.7 ^a	68.49 ^d				
	***	****	****	*	****	****				

a, b, c, d, e: different for P<0.05 * P<0.05; *** P<0.001; **** P<0.0001

b) *Chemical constituents.* - Also for the chemical components, the most important variations are registered between the 4th and the 20th/40th lactation day (Table 1; Fig. 1). All the main constituents decrease, except lactose, that, on the contrary, increases. In correspondence of the 20th lactation day more significant variations are registered both for fat (- 37%), and for protein (- 32%), as well as for ash (- 18%) and for lactose (+5%). Crude protein and ash further decrease significantly, also in correspondence of the 40th lactation day (- 18% and - 17%, with respect to 20th day).

Figure 1. Variations of some milk characteristics of Haflinger mares in relation to the lactation stage (5 mares; 8 samplings per mare). Means of lactation = 100. GE = Gross energy.

Figura 1. Variazioni di alcune caratteristiche del latte di cavalle di razza Avelignese in rapporto allo stadio di lattazione (5 cavalle; 8 prelievi per cavalla). Media della lattazione = 100. GE = Energia grezza.



Fat content rather rapidly decreases during the first 60/80 days; subsequently there is a little increase of the values that, however, in correspondence of the 180th day reaches the *minimum* value of the entire lactation (from 1.66 to 0.44 g per 100 g; decrease 73%). Such variations agree enough with data reported in literature [1, 8, 19-21] for lactations with a duration of at least 4 - 5 months. In other cases, instead, more moderate variations, or rather irregular trends [2, 17], were observed. The fat content increase, registered at the 4th/5th month, agrees with the observations of Kulisa [22] and Brzeski and Kulisa [23].

Protein content, instead, progressively decreases during the entire lactation (from 3.29 to 1.63 g per 100 g; decrease 50%). The protein impoverishment of the milk is confirmed by several Authors [2, 8, 19, 20, 24, 25], while in other ones the variations appear more gradual [1, 11, 22, 26, 27], or rather irregular [17]. Rather analogous is the trend of ash content, that, however, in the first phases of the lactation shows a less accentuated decrease (from 0.57 to 0.27 g per 100 g; decrease 53%) than the protein content. This trend is substantially confirmed by other observations [1, 8, 19-21, 28].

Lactose content, on the contrary, increases progressively until the 180th day (from 6.36 to 6.88 g per 100 g; increase 8%), in particular during the first lactation weeks, to partially counterbalance the losses of total solids. Several studies tend to confirm that mare milk during lactation becomes rich of carbohydrates [1, 8, 11, 19-21, 29], also if there are some contrasting indications [22, 30]. Kulisa [29], at the end of the lactation (5th month), registers a decrease of lactose that confirms the observations of Krasnova [30] for the 4th/6th month; this fact, however, is in contrast with Sonntag *et al.* [11], that at the end of the lactation found markedly increasing lactose values.

c) *Gross energy*. - The variations of energy value of milk reflect those relative to organic components, precisely true protein and fat that decrease and lactose that increases (Table 1; Fig. 1). Total energy significantly decreases between 4th and 20th day (- 18%), but registers a further decrease also in correspondence of the 40th day (- 8%). From 4th to 180th lactation day, milk energy value, despite of the higher contribution of lactose, decreases progressively and in a significant way (from 583 to 398 kcal per kg; decrease 32%). Such variations are in agreement with the observations of Ullrey *et al.* [20], Burns *et al.* [31] and Mariani *et al.* [8]. Analogous indications, but relative only to the first 2 months of lactation, are reported also by Oftedal *et al.* [15], Doreau *et al.* [5] and Martin *et al.* [32], while Doreau *et al.* [33], in the same period, don't find any considerable variation.

Conclusions

Physico-chemical properties, chemical composition and energy value of Haflinger nursing mare milk significantly modify during 6 lactation months. The most important variations concern the initial phases of the lactation, such as to deeply affect the plastic and energetic value of the milk, the only nutritional source for the young foal in full development. In little more than 1 month, fat (- 51%), protein (- 45%) and ash (- 32%) contents decrease drastically. Consequently, also energy value of the milk decreases (- 24%), despite of the increase of lactose content. Protein supply, equal to 33 g per kg milk at the 4th day, in correspondence of the 40th day is reduced to 18 g; fat supply, likewise, varies from 17 to 8 grams.

Parole chiave: Cavallo Avelignese, giumenta, stadio lattazione, caratteristiche latte.

Mots clés: Cheval Avelignais, jument, stade de la lactation, caractéristiques du lait.

SUMMARY - The trend of the main characteristics of the milk of Haflinger nursing mares in the course of the entire lactation was studied. Density, pH, titratable acidity, total solids, fat, protein, lactose and ash varied significantly, while the freezing point showed modifications statistically not significant. The contents of protein, fat and ash diminished; also the gross energy value tended to reduce, despite of the lactose content increase. The individual differences and the variations of the composition of milk in relation to the lactation stage appeared important for the effects on the ability to development of the foal, in special way in the first weeks of life, when the feeding is exclusively or mostly milk.

RIASSUNTO - *Caratteristiche chimico-fisiche e valore energetico del latte di cavalle di razza Avelignese nel corso di 6 mesi di lattazione.*

È stato studiato l'andamento delle principali caratteristiche del latte di cavalle nutrice di razza Avelignese nel corso dell'intera lattazione. Densità, pH, acidità titolabile, sostanza secca, grasso, proteina, lattosio e ceneri variano significativamente. Diminuiscono i contenuti di proteina, grasso e ceneri; anche l'energia grezza tende a diminuire, nonostante l'aumento di contenuto in lattosio. Le differenze individuali e le variazioni della composizione del latte in rapporto allo stadio di lattazione appaiono importanti per gli effetti sulle capacità di sviluppo del puledro, in special modo nelle prime settimane di vita, quando l'alimentazione è esclusivamente o prevalentemente latte.

RÉSUMÉ - *Caractéristiques chimico-physiques et valeur énergétique du lait de jument de race Avelignaise pendant 6 mois de lactation.*

On a étudié l'évolution des principales caractéristiques du lait de jument de race Avelignaise pendant une entière lactation. Densité, pH, acidité de titration, matière sèche, matière grasse, matière azotée, lactose et cendres montrent une significative variation. Se réduisent les teneurs de matière azotée, matière grasse et cendres; la valeur énergétique, aussi, tend à décroître, malgré l'augmenter du lactose. Les différences individuelles et les variations de la composition du lait in relation au stade de la lactation semblent importantes pour les effets sur les capacités de développement du poulain, surtout pendant les premières semaines de vie, quand l'alimentation est exclusivement ou pour la plupart constituée de lait.

References

- 1) Bouwman H., van der Schee W. (1978) - Composition and production of milk from Dutch warmblooded saddle horse mares. Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkde, 40, 39-53.
- 2) 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.
- 3) Doreau M. (1994) - Le lait de jument et sa production: particularités et facteurs de variation. Lait, 74, 401-418.
- 4) Doreau M., Boulot S. (1989) - Recent knowledge on mare milk production: a review. Livest. Prod. Sci., 22, 213-235.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Enbergs H., Willich J., Failing K. (1999) - Eiweiss-, Glucose- und Lipidgehalt in der Milch von Zuchtstuten im Verlauf der Laktation. Zuchtungskunde, 71, 245-266.
- 10) Mariani P., Martuzzi F., Formaggioni P., Sabbioni A., Sumner A. (2000) - Nitrogen distribution in Haflinger mare milk throughout six lactation months. Proc. 51 Ann. Meet. EAAP, The Hague, The Netherlands, 6, 374 (Abstr.).
- 11) Sonntag A.C., Enbergs H., Ahlsweide L., Elze K. (1996) - Inhaltsstoffe in der Stutenmilch in Abhängigkeit vom Laktationsstadium und verschiedenen Umweltfaktoren. Pferdeheilkunde, 12, 220-222.
- 12) Anon. (1963) - Determinazione del grado di acidità del latte secondo Soxhlet-Henkel. Milchwissenschaft, 18, 520.
- 13) Biggs D.A. (1978) - Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 1015-1034.
- 14) 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.
- 15) Oftedal O.T., Hintz H.F., Schryver H.F. (1983) - Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. J. Nutr., 113, 2096-2106.
- 16) Johnston R.H., Kamstra L.D., Kohler P.H. (1970) - Mare's milk composition as related to "foal heat" scours. J. Anim. Sci., 31, 549-553.
- 17) 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.
- 18) Kulisa M. (1970) - The effects of some non-inheritable factors on the composition of the milk of mares in the course of lactation. Zesz. Nauk. WSR, ser.B, 61, 17-28.
- 19) Nesení 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.
- 20) Ullrey D.E., Struthers R.D., Hendricks D.G., Brent B.E. (1966) - Composition of mare's milk. J. Anim. Sci., 25, 217-222.
- 21) Intrieri F., Minieri L. (1969) - Sulla composizione chimica del latte di cavalla: indagini su soggetti di razza Avelignese. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 23, 558-561.
- 22) 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.
- 23) Brzeski E., Kulisa M. (1979) - Levels of N-acetylneuraminic acid and fat in milk of Arab mares. Roczniki Naukowe Zootechniki, 6, 29-35.
- 24) Minieri L., Intrieri F. (1970) - Ricerche elettroforetiche sulle frazioni proteiche del colostro e del latte di cavalle di razza Avelignese in rapporto alla distanza dal parto. Acta Medica Vet. 16, 73-88.
- 25) Ashcraft A., Tyznik W.J. (1976) - Effect of diet on volume and composition in mare's milk. J. Anim. Sci., 43, 248 (Abstr.).
- 26) Deskur S., Leonhard-Kluz I., Grochowalski K., Rychowska-Nahlik M. (1978) - Occurrence of scours in foals during post-partum oestrus in their dams, and composition of milk whey proteins. Roczniki Naukowe Zootechniki, 5, 115-127.
- 27) Lukas V.K., Albert W.W., Owens F.N., Peters A. (1972) - Lactation of Shetland mares. J. Anim. Sci., 34, 350 (Abstr.).
- 28) 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.
- 29) Kulisa M. (1980) - Lactose, free glucose and galactose levels in the milk of Arab mares. Roczniki Naukowe Zootechniki, 7, 31-36.
- 30) Krasnova O. (1962) - Chemical composition of milk from mares foaling at different seasons. Konevodstvo i Konnyi Sport, 2, 27-28.
- 31) Burns HD., Gibbs P.G., Potter G.D. (1992) - Milk-energy production by lactating mares. Journal of Equine Veterinary Science, 12, 118-120.
- 32) 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.
- 33) 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.

RILIEVI SUI PRINCIPALI REQUISITI TECNOLOGICO-CASEARI DEL LATTE PER LA PRODUZIONE DI FORMAGGIO GRANA¹

P. Mariani², A. Summer², P. Formaggioni², M. Malacarne², B. Battistotti³

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

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

³Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84, 29100 Piacenza.

Introduzione

Nel corso degli ultimi anni il patrimonio nazionale di vacche da latte ha subito una sensibile contrazione, attestandosi sui 2.100.000 capi circa; mentre la consistenza totale delle pecore, dopo la flessione accusata per qualche anno, appare in lieve ripresa (ca. 6.900.000 capi). Per contro, migliorano sia la consistenza delle capre (ca. 1.100.000 capi) sia quella delle bufale (ca. 100.000 capi) [1]. Il patrimonio vacche rappresenta circa il 10% di quello dell'Unione Europea dei 15; l'Italia si colloca al quarto posto della graduatoria, dopo Germania, Francia e Regno Unito. La politica comunitaria, volta al contenimento delle eccedenze di latte bovino, di burro e di latte in polvere, ha contribuito a determinare, oltre che un forte ridimensionamento della zootecnia bovina da latte, anche profonde trasformazioni a livello delle strutture produttive. Il numero delle aziende si è drasticamente ridotto, mentre è aumentata la produzione media di latte per azienda. Ciononostante il nostro paese figura tra gli ultimi, sia come dimensione media degli allevamenti, che come produzione media di latte per azienda. Da ciò deriva che il costo di produzione del latte in Italia è tra i più elevati dell'Unione Europea.

Oltre il 65% del patrimonio vacche da latte e i 3/4 della produzione di latte sono appannaggio di Lombardia, Emilia Romagna, Veneto e Piemonte. In Lombardia si ha una vera e propria concentrazione della zootecnia da latte, sia in termini di dimensioni delle unità produttive che di produzione. Il 40% del latte di pecora si produce in Sardegna, che insieme a Sicilia, Lazio e Toscana forniscono i 3/4 circa della produzione nazionale; altre regioni meridionali, principalmente Puglia e Abruzzo, contribuiscono per il 20% circa. L'allevamento della capra è concentrato in Sardegna (ca. 25%), Calabria, Basilicata, Sicilia, Puglia e Campania, che in tutto rappresentano il 70% del latte prodotto [2].

Produzione di latte e sua utilizzazione

La produzione nazionale di latte vaccino è di circa 10 milioni di tonnellate. La disponibilità complessiva di latte di tutte le specie, compreso un consistente quantitativo di latte bovino di importazione, è di circa 13 milioni di tonnellate. Discreto è il contributo del latte di pecora (ca. 600 mila t), mentre inferiori sono le produzioni di latte di capra (ca. 110 mila t) e di latte di bufala (ca. 110 mila t). La percentuale di latte vaccino destinato alla trasformazione è aumentata progressivamente, passando dal 60-65% (epoca di entrata in vigore quote latte) al 74% circa, per oltre i 9/10 destinato alla produzione di formaggi, soprattutto di tipo grana e a pasta fresca. Il latte delle specie cosiddette minori viene da sempre destinato alla trasformazione casearia per la quasi totalità. Quello di pecora è per lo più (3/4) utilizzato nella produzione di Pecorino Romano (+ Toscano) e Fiore Sardo; il latte di capra viene impiegato nella produzione di caprini (4/5) e di altri formaggi freschi misti; la produzione di Mozzarella assorbe la totalità del latte di bufala.

La produzione quanti-qualitativa di formaggio

La produzione nazionale complessiva di formaggio, dell'ordine di 800 mila tonnellate, rappresenta una quota importante (14%) nell'ambito dell'Unione Europea; l'Italia si colloca al terzo posto, dopo Germania e Francia, anche se a netta distanza, mentre figura al quinto posto per le consegne di latte, dietro Germania, Francia, Regno Unito e Olanda [1]. Nel corso degli anni si è avuto un notevole incremento della produzione di Pecorino e dei formaggi vaccini a pasta dura, tipo grana. Un quantitativo di latte di oltre 4,5 milioni di tonnellate viene annualmente trasformato in formaggi tipici e a denominazione d'origine, che rappresentano circa la metà dell'intera produzione casearia nazionale.

La qualità tecnologica del latte, propria delle differenti realtà, situazioni e condizioni ambientali e agro-zootecniche, trova la sua piena valorizzazione in numerose produzioni casearie tutelate dalla legislazione nazionale e comunitaria. In aggiunta a formaggi, quali il Pecorino Romano e la Mozzarella di Bufala Campana, si annoverano numerose produzioni di latte vaccino di notevole pregio e di rilevanza economica: Grana Padano, Parmigiano-Reggiano, Gorgonzola, Provolone Valpadana, Asiago, Montasio, Taleggio, Caciocavallo, Fontina, etc., indicate in ordine decrescente di quantità prodotte [3]. Si avvalgono della denominazione di origine i formaggi prodotti in zone geograficamente delimitate, osservando usi leali e costanti, le cui peculiari caratteristiche merceologiche ed organolettiche derivano dalla qualità del latte e dalle particolari tecnologie di produzione. Il latte rappresenta non soltanto la materia prima da trasformare, ma soprattutto il depositario delle caratteristiche commerciali delle singole varietà di formaggio, in quanto riassume in sé una vasta serie di condizioni genetiche e ambientali che costituiscono l'essenza della sua caratterizzazione e della sua qualità [4]. Una caratteristica differenziale delle produzioni casearie nazionali è quella di essere prevalentemente rappresentate da prodotti a base di latte crudo, a lavorazione di tipo tradizionale e artigianale e a lungo periodo di maturazione [5]. Il Grana Padano ed il Parmigiano-Reggiano assorbono oltre 3 milioni di tonnellate di latte, per un quantitativo di prodotto stagionato dell'ordine di 200 mila tonnellate, che rappresentano il 25% circa della produzione formaggera nazionale [1]. Una trentina di formaggi di produzione nazionale ha ottenuto il preliminare riconoscimento comunitario della "Denominazione di Origine Protetta" (DOP).

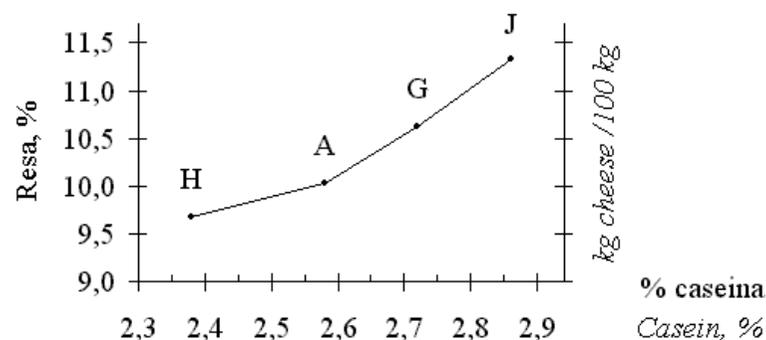
Principali requisiti tecnologico-caseari del latte

La quasi totalità delle produzioni casearie nazionali si basa su una coagulazione di tipo misto [6]. La qualità tecnologico-casearia del latte assume significati diversi a seconda del tipo di trasformazione in rapporto alla notevole varietà dei formaggi, con particolare riferimento alle condizioni di formazione della cagliata, al grado di acidificazione della massa caseosa sottosiero e ai tempi di stagionatura [7-11]. La qualità del latte svolge un ruolo di fondamentale importanza nella produzione dei formaggi a pasta cotta, dura, a lungo periodo di maturazione. Nella coagulazione ad accentuato carattere presamico il complesso micellare tende a mantenere inalterate le sue proprietà, da cui dipendono buona parte delle caratteristiche reologiche della cagliata, la sua contrattilità in fase di cottura e quella della massa caseosa, nonché il rendimento della trasformazione casearia [12].

Nella produzione dei formaggi tipo grana, 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 presamica. Il latte deve essere dotato di peculiari caratteristiche chimico-fisiche e strutturali, perfettamente collimanti con quelle pregevoli ed uniche che contraddistinguono il formaggio [13]. In linea generale il latte deve possedere determinati requisiti di ordine tecnologico-caseario, quali un contenuto di caseina mediamente elevato; caseine di tipo genetico potenzialmente favorevole; un buon contenuto di fosfato di calcio colloidale; un giusto grado di acidità titolabile; un moderato contenuto di cellule somatiche ed, appunto, una ottimale attitudine specifica alla coagulazione, intesa come buona reattività con il caglio, elevata capacità di rassodamento della cagliata e conseguente idonea capacità di contrazione e di eliminazione del siero [14]. Ciò al fine di ottenere una massa caseosa strutturalmente omogenea, adeguatamente ed uniformemente disidratata in tutte le sue parti, condizione fondamentale per il normale avvio dei processi fermentativi e per l'equilibrato andamento maturativo del formaggio [6]. L'attitudine alla coagulazione presamica, per i suoi riflessi sulle proprietà reologiche della cagliata e su resa e qualità del formaggio, ed il contenuto di caseina e le peculiarità genetiche e strutturali del sistema micellare, per i riflessi sulla qualità tecnologica del latte nel suo complesso e su resa e caratteristiche funzionali del formaggio, rappresentano i cardini della qualità casearia del latte.

Proteina, grasso e resa in formaggio

La caseina costituisce la vera e propria materia prima del formaggio da cui dipendono gran parte delle caratteristiche reologiche della cagliata, la capacità di contrazione della massa caseosa ed il rendimento della trasformazione casearia, nonché le proprietà fisico-chimiche e funzionali del prodotto finito. Il contenuto di caseina svolge un ruolo fondamentale, con il grasso, nella determinazione della resa della trasformazione casearia [15-22]. I dati relativi alla produzione di formaggio Cheddar - a partire da latti aventi un rapporto grasso:caseina di 1,46 - dimostrano ampiamente la stretta relazione che intercorre tra contenuto di caseina e resa industriale del latte [23] (Fig. 1). Queste osservazioni mettono in evidenza anche le notevoli differenze che caratterizzano i latti di diverse razze bovine. La resa percentuale varia da un minimo di 9,67 kg di formaggio, corrispondente al latte con 2,38 % di caseina (Holstein), ad un massimo di 11,33 kg per il latte con 2,86 % di caseina (Jersey); lo scarto, di 1,66 kg di formaggio, è a favore della Jersey: una differenza rilevante. I latti con il 2,57 % (Ayrshire) e il 2,72 % (Guernsey) di caseina si collocano in posizione intermedia.

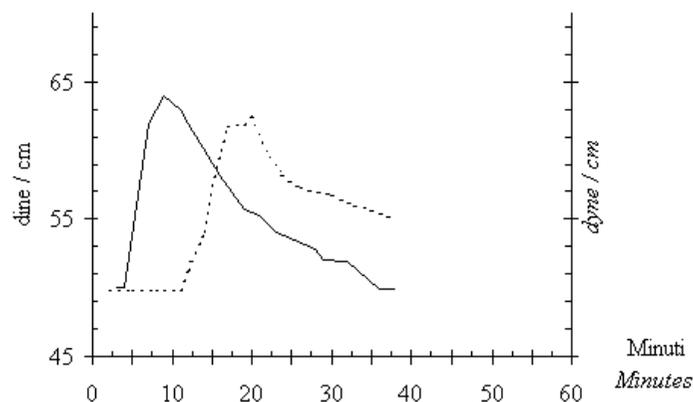


La quantità di formaggio varia quindi in relazione diretta con la caseina e in misura tanto più stretta quanto più basso è il rapporto grasso:caseina del latte in caldaia, come si verifica, ad esempio, nella produzione di Parmigiano-Reggiano e, in misura ancora maggiore, di Grana Padano, entrambi prodotti con latte parzialmente scremato [24-28]. Per quanto riguarda il Parmigiano-Reggiano le osservazioni disponibili [13] indicano chiaramente che la resa in formaggio è fortemente associata al contenuto in caseina del latte. I valori medi mensili di resa a 24 h, rilevati nell'arco di 5 anni presso un singolo caseificio, risultano strettamente correlati ($r=0,82$; $P<0,001$) a quelli medi ponderati del contenuto in caseina del latte conferito da 9 diversi produttori. Il latte mediamente più povero di caseina (2,27 %) fornisce una resa in formaggio nettamente inferiore (7,38 kg) rispetto al latte che ne è maggiormente provvisto (caseina = 2,48 %; resa = 7,94 kg formaggio per 100 kg latte). Il rapporto grasso:caseina del latte in caldaia rappresenta una variabile importante della resa industriale della trasformazione casearia [29], come dimostrano i pochi dati illustrati, anche se, entro certi limiti, tale rapporto risulta strettamente vincolato alla varietà e alla tipicità del formaggio.

Attitudine alla coagulazione: sineresi del coagulo

Tutte le variabili fisico-chimiche, chimiche, biochimiche e strutturali del latte concorrono - in misura più o meno importante, singolarmente prese o attraverso interazioni più o meno complesse - alla definizione della sua attitudine alla coagulazione presamica intesa in senso lato, come tempo di coagulazione, velocità di formazione del coagulo, nonché consistenza, permeabilità e contrattilità della cagliata e, di conseguenza, capacità e velocità di sineresi della stessa e dell'intera massa caseosa. Sotto questo profilo, i contenuti di caseina, calcio e fosforo, e di riflesso l'acidità, svolgono un ruolo fondamentale. Non meno importanti sono le variabili riguardanti i tipi genetici e le proporzioni delle singole caseine, nonché il contenuto e le proporzioni di fosfato di calcio colloidale, variabili che tutte insieme partecipano alla definizione della struttura micellare, con riflessi significativi sulla dimensione delle micelle. La concentrazione idrogenionica, la dispersione delle micelle ed il calcio ionico influenzano marcatamente la velocità della reazione enzimatica, nonché l'andamento della fase secondaria della coagulazione propriamente detta.

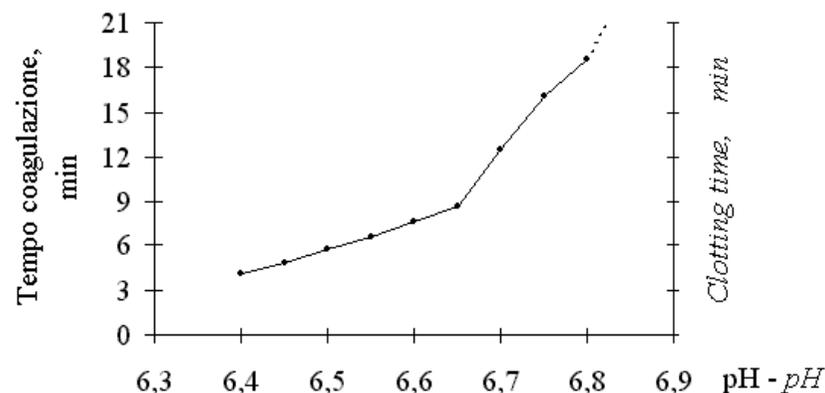
L'attitudine alla coagulazione [30] rappresenta il requisito basilare per il latte destinato alla produzione di formaggi di notevole pregio. Essa è la risultante delle specifiche qualità tecnologico-casearie del latte, viste in relazione alle peculiari esigenze tecniche della trasformazione ed alle caratteristiche del prodotto finito [31]. Le condizioni favorevoli di reattività del latte con il caglio, la velocità di rassodamento e la forza del coagulo, così come la capacità e la velocità di sineresi della cagliata [32] (Fig. 2) si riflettono positivamente sull'andamento dell'intero processo di caseificazione e sullo sviluppo maturativo del formaggio. Tali condizioni consentono un regolare ed equilibrato dosaggio del caglio e del sieroinnesto, una maggiore presa di forza del coagulo, un giusto rapporto tra acidità lattica e grado di presamicità della cagliata, una spinatura più facile ed una frantumazione più regolare; la formazione di granuli più uniformi, maggiore elasticità contrattilità e coesione, minore friabilità; una giusta acidificazione della massa caseosa e, conseguentemente, una migliore sineresi. Il latte che presenta una ottimale attitudine alla coagulazione presamica è in grado di assicurare il raggiungimento degli obiettivi primari del processo di coagulazione: la massimizzazione della resa industriale della trasformazione casearia e l'ottenimento di una massa caseosa adeguatamente ed uniformemente disidratata.



I latti a coagulazione anomala, lenta, danno origine a cagliate deboli, poco elastiche, che mal sopportano le sollecitazioni fisico-meccaniche [33-38]. Le scadenti caratteristiche reologiche della cagliata e le alterate condizioni tecnologiche di lavorazione possono determinare perdite di resa in formaggio, a causa di un minore recupero di grasso e di caseina, anche sotto forma di particelle di cagliata ("polvere") che restano nel siero [21, 39-45]. La massa caseosa risulta strutturalmente difettosa, eccessivamente umida e spesso non uniformemente disidratata, tutte condizioni che nei formaggi a medio-lungo periodo di maturazione favoriscono l'instaurarsi di fermentazioni anomale, precoci o tardive, localizzate o diffuse, la formazione di colorazioni anomale e, in quelli a pasta dura, la comparsa di difetti di struttura (strappi, fessurazioni, distacchi di pasta, sfoglia, etc.), diversamente localizzati nella forma [13, 21, 46-49].

pH, acidità titolabile e tempo di coagulazione

L'acidità è la proprietà che esercita la maggiore influenza sulla attitudine del latte alla coagulazione presamica. Il ruolo primario spetta al pH [50, 51]. La concentrazione idrogenionica assume un significato molto importante in tutte le fasi della coagulazione: reattività tra caseina e caglio, velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina (tempo di rassodamento del coagulo), consistenza e capacità di sineresi della cagliata. Il pH influenza in maniera pressoché totale l'andamento della fase primaria, in quanto di natura prettamente enzimatica: la chimosina rompe il legame peptidico 105-106 della k-caseina che, di conseguenza, perde la sua porzione C-terminale fortemente idrofila, ricca di acido sialico (glicomacropeptide) e, quindi, anche la proprietà di proteggere le caseine α_{S1} , α_{S2} e β dall'azione precipitante degli ioni calcio. Il pH normale del latte è molto al di sopra (6,66-6,72) di quello ritenuto ottimale per la stabilità e l'attività dell'enzima (5,5-6,0); la concentrazione degli ioni idrogeno a pH 6,5 è più che doppia rispetto a quella di pH 6,7; ciò spiega l'effetto rimarchevole che sue variazioni, anche piccole, sono in grado di esercitare sulla velocità della reazione primaria [52-54], specie a valori di pH mediamente elevati. Nel passaggio da pH 6,75 a pH 6,65, ad esempio, la reattività tra latte e caglio aumenta in misura notevole, per cui il tempo di coagulazione diminuisce sensibilmente, dimezzandosi [53] (Fig. 3).



L'acidificazione in generale favorisce anche lo sviluppo della fase secondaria, sia direttamente, in conseguenza della diminuzione di stabilità delle micelle di paracaseina (processo di neutralizzazione delle cariche), sia indirettamente attraverso la liberazione degli ioni calcio dai relativi composti solubili e colloidali. La fase di coagulazione vera e propria risulta addirittura più sensibile rispetto a quella enzimatica (circa 4 volte). Quando il pH si abbassa da 6,6 a 5,6 il tempo di coagulazione - quasi esclusivamente per l'effetto complessivo del pH sulla fase secondaria - diminuisce di circa 30 volte [55, 56]. L'aumento della velocità di coagulazione per effetto dell'abbassamento del pH accelera la capacità di aggregazione delle micelle, quindi la velocità di rassodamento del coagulo, condizione che si riflette favorevolmente anche sul grado di consistenza massima della cagliata. Intorno a pH 6,0-6,2, però, a causa della demineralizzazione delle micelle, l'effetto viene completamente meno [54, 57] e la forza del coagulo diminuisce in misura considerevole. Un buon grado di acidificazione influisce favorevolmente anche sulla sineresi [58-61]. Quando il coagulo si ottiene per via "prevalentemente" enzimatica, l'abbassamento del pH rende più incisiva l'azione del caglio e provoca una parziale solubilizzazione dei sali di calcio; ciò, entro limiti ben determinati, favorisce la formazione di legami secondari tra le micelle di paracaseina e i filamenti del reticolo, migliorando la capacità di contrazione, la permeabilità e, in definitiva, la eliminazione del siero.

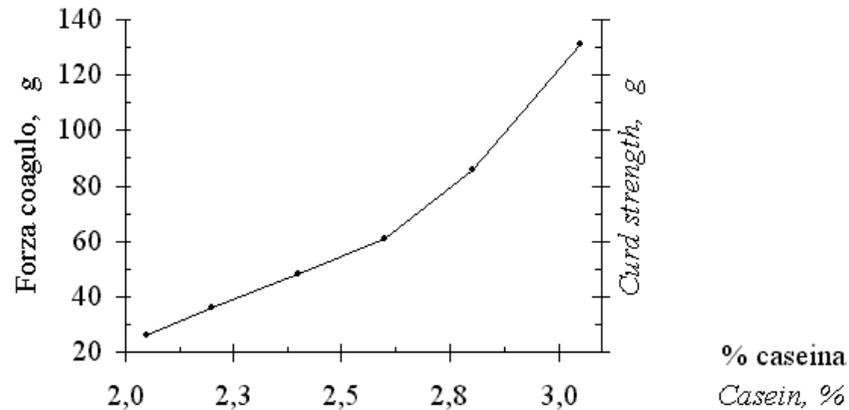
Dato il rapporto molto stretto che esiste tra i valori di pH e quelli dell'acidità titolabile [62-64], anche quest'ultima caratteristica rappresenta un requisito importante nella valutazione della qualità tecnologica del latte, spesso misurata in alternativa al pH, proprio in quanto in grado di esercitare un'influenza determinante e particolarmente significativa nei riguardi di quasi tutti i principali parametri di coagulazione presamica. Il tempo di coagulazione, ad esempio, risulta ben correlato con l'acidità titolabile [63, 65-69]. In questo caso, però, la correlazione, di segno negativo ($r = -0,60 / -0,30$), risulta di entità mediamente inferiore rispetto a quella di segno positivo ($r = 0,70 / 0,50$) che intercorre tra pH e tempo di coagulazione del latte [63].

Il ruolo dell'acidità naturale del latte è di basilare importanza nella caseificazione a Parmigiano-Reggiano: il pH di coagulazione è intorno a 6,40 e quello della massa caseosa in fase di giacenza in caldaia si mantiene inizialmente elevato, prossimo a 6,20, poi non dovrebbe diminuire più di circa 0,15 unità. Date le peculiari condizioni di lavorazione, in presenza di latte ipoacido (povero di caseina e di fosforo), un eccessivo incremento dell'azione lattica, per aggiunta di forti dosi di sieroinnesto, finisce per influire negativamente sulla capacità di contrazione del coagulo [33]. Tale azione, oltre certi limiti, può determinare un ulteriore peggioramento della capacità di sineresi della massa caseosa [61]. Le micelle subiscono meno intensamente e meno a lungo l'azione del caglio e, per effetto della più incisiva azione lattica, tendono a demineralizzarsi, con pregiudizio per l'integrità funzionale del reticolo caseinico e quindi per la reologia della cagliata [37], che risulta meno elastica, poco contrattile, fragile ed eccessivamente umida. Il ricorso ad un abbondante impiego di sieroinnesto, allo scopo di rettificare la scarsa attitudine alla coagulazione del latte ipoacido, comporta una alterazione del giusto equilibrio tra azione enzimatica ed azione acida, equilibrio che è di basilare importanza per ottenere un formaggio adeguatamente disidratato. In tal modo, il latte tende a coagulare in tempi maggiormente compatibili con quelli previsti da questa peculiare tecnologia, ma a causa dell'eccessiva azione lattica le micelle subiscono un intervento enzimatico meno incisivo, nonché un certo grado di demineralizzazione, con conseguente perdita di elasticità, di contrattilità e di capacità di sineresi.

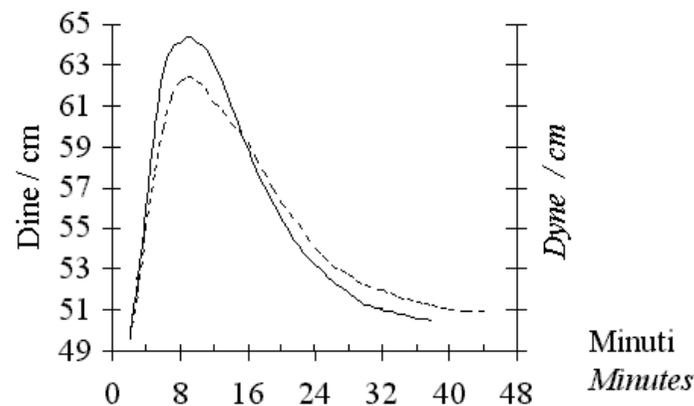
Contenuto di caseina e consistenza del coagulo

Il contenuto di caseina concorre in misura importante alla determinazione delle caratteristiche reologiche del latte con particolare riferimento alla consistenza del coagulo [58, 70, 71] ed alle proprietà funzionali del reticolo caseinico, cui si rapportano i requisiti di elasticità, permeabilità, omogeneità e compattezza della massa caseosa [72]. Il fenomeno trova ampio riscontro, sia a livello di lattini individuali e di massa, sia nel confronto tra lattini di differenti razze bovine [37, 72-80]. In effetti, la diluizione del latte, con siero o con ultrafiltrato, comporta una diminuzione significativa della consistenza del coagulo; mentre il suo arricchimento in caseina, mediante ultrafiltrazione o aggiunta di sedimento da ultracentrifugazione, determina un incremento notevole dei valori di tale caratteristica [70, 71, 81, 82]. L'influenza della concentrazione della caseina nei riguardi della forza del coagulo viene considerata addirittura più importante rispetto agli effetti dovuti all'incremento di ioni calcio o all'abbassamento dei valori di pH [57]. Si è visto che un aumento del 10% del livello di caseina è in grado di determinare un incremento di circa il 15% della consistenza massima del coagulo [83]. Più in generale, con contenuti di caseina inferiori a 0,7% non si ha formazione del coagulo; al di sopra di tali valori la correlazione positiva tra caseina e forza del coagulo risulta inizialmente discreta e a concentrazioni sempre più elevate corrispondono incrementi di consistenza via via maggiori [57].

È noto, comunque, che i latti più ricchi di caseina danno normalmente origine a cagliate dotate di maggiore consistenza. In particolare, dal 2% fino al 2,5% circa di caseina la forza del coagulo aumenta in misura meno che proporzionale, ma in modo considerevole, raddoppiando i suoi valori (Fig. 4); mentre a concentrazioni più elevate di caseina l'incremento di forza del coagulo risulta più che proporzionale, fino a raggiungere valori di notevole entità [76]. La correlazione positiva tra contenuto in caseina del latte e consistenza del coagulo, misurata a parità di tempo di coagulazione, si manifesta più compiutamente [84, 85] e risulta particolarmente elevata a livello di latti individuali ($r = 0,75$; $P < 0,001$). Maggiori concentrazioni di caseina, in effetti, determinano in primo luogo un netto miglioramento della velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina [38, 57, 79, 86], con riflessi decisamente positivi sulla consistenza finale del coagulo [72, 86], entrambe condizioni favorevoli nei riguardi della capacità di contrazione del reticolo caseinico [58]; tuttavia, oltre certi livelli di caseina si ha un peggioramento della velocità di sineresi [82].



Questo peculiare ruolo della caseina risulta cruciale nelle specifiche condizioni tecnologiche di produzione dei formaggi Grana Padano e Parmigiano-Reggiano [13, 37, 38, 72, 86-88]. Il latte con più caseina fornisce un coagulo dotato di maggiore consistenza e di migliore attitudine alla sineresi [86] (Fig. 5). Esso manifesta una maggiore forza di contrazione, cui corrisponde una più elevata capacità di spurgo per unità di tempo, condizione importante per ottenere un formaggio con idoneo gradiente di umidità. Nella produzione del Parmigiano-Reggiano la cagliata ottenuta da un latte ricco di caseina raggiunge un buon grado di rassodamento; i granuli caseosi sono dotati di maggiore consistenza ed elasticità e manifestano una buona capacità di coesione e di spurgo; il siero risulta meno torbido (indice di minori perdite di grasso e di caseina); la massa caseosa all'estrazione dalla caldaia presenta migliore impasto e maggiore uniformità e la forma sul banco risulta giustamente elastica, consistente e permeabile [72]. Un'indagine dell'Institut Technique du Gruyère, riguardante la produzione di Emmental, ha messo in evidenza [16] che alla trasformazione di un latte avente un contenuto medio-alto di caseina (>2,58%) fa riscontro una percentuale di formaggio "scelto" significativamente più elevata (10-15%) rispetto al valore mediano; mentre il formaggio prodotto con latte scarsamente provvisto di caseina tende ad essere più frequentemente di qualità inferiore: con il 2,25% circa di caseina, ad esempio, si ha una produzione casearia che si contraddistingue per avere il 20% in meno di formaggio "scelto" [16]. Queste osservazioni indicano chiaramente che il contenuto di caseina rappresenta non soltanto il più importante criterio nella valutazione della qualità del latte da un punto di vista del suo rendimento caseario (resa industriale), ma anche un parametro indubbiamente significativo ai fini della determinazione della qualità del formaggio (resa commerciale) [12, 16, 28, 37, 47, 89].

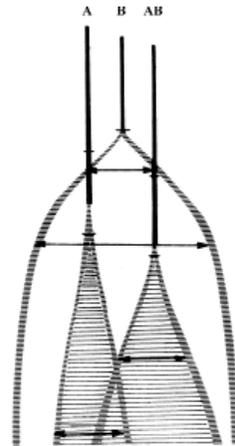


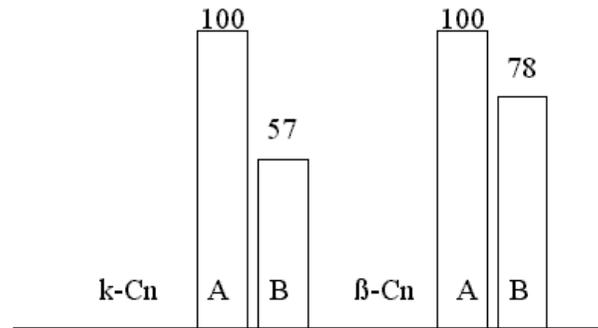
Varianti genetiche, dimensioni micelle e tempo di rassodamento del coagulo

La caseina allo stato nativo, strutturata in micelle che si originano dalla aggregazione di subunità costituite dalle frazioni α_{s1} , α_{s2} , β e k con il concorso del fosfato di calcio colloidale, è interamente destinata a formare la massa caseosa, il formaggio. Le variazioni quanti-qualitative della caseina, vero e proprio fulcro dell'intero processo di caseificazione, si ripercuotono, oltre che sulla resa della trasformazione, su tutte le caratteristiche reologiche della cagliata, con riflessi diretti sulla tessitura della pasta e sulla qualità del formaggio. La composizione, le proprietà fisico-chimiche, nonché la struttura intima del sistema micellare del latte rappresentano la risultante di complesse interazioni tra le numerose componenti in gioco (concentrazione ripartizione e tipo genetico delle caseine, fosfato di calcio colloidale, calcio caseinato, *etc.*), viste in stretto rapporto dinamico con la fase solubile del latte [90, 91]. Anche piccole variazioni possono esercitare un'influenza importante sullo stato di aggregazione delle submicelle e quindi sul grado di dispersione dell'intero sistema micellare.

Sotto questo profilo, il polimorfismo delle caseine svolge un ruolo del tutto particolare nel complesso quadro della qualità del latte [92], in conseguenza, sia delle variazioni qualitative legate alla natura della singola mutazione genetica, sia di quelle quantitative legate alla diversa capacità di espressione degli alleli che controllano la sintesi delle singole caseine [93, 94]. Gli effetti risultano complicati a causa delle interazioni che si stabiliscono a livello dei *loci*, tra loro strettamente associati [95-98]. Pertanto, le diverse entità caseiniche, pur entrando nella formazione delle micelle in un rapporto piuttosto costante, possono subire variazioni tali che si ripercuotono significativamente sul grado di dispersione del sistema micellare e, di conseguenza, sulle proprietà dell'intero complesso caseinico nativo, con riflessi importanti sull'andamento sia della fase enzimatica sia di quella fisico-chimica della coagulazione presamica del latte [99, 100]. Il sistema è particolarmente sensibile alle variazioni proporzionali della k -caseina [101], elemento portante della struttura micellare: più k -caseina = micelle più piccole.

I sistemi micellari più uniformi, comunque contraddistinti da maggiori proporzioni di micelle di piccole dimensioni, come, ad esempio, quelli caratterizzati dalla presenza della k -caseina B [102], tendono a coagulare in minor tempo [103] (Fig. 6). Le varianti delle caseine k e β esercitano un ruolo fondamentale in tutte le fasi della coagulazione presamica del latte [100]. Il latte k -caseina B manifesta una maggiore reattività con il caglio e presenta una migliore attitudine alla formazione del coagulo, il cui reticolo tende ad essere più compatto e più elastico rispetto a quello di tipo k -caseina A [104-106]. In tali condizioni le perdite di caseina e di grasso risultano inferiori [107-109], con ripercussioni favorevoli sulla resa [110, 111] e sulla qualità del formaggio. Anche il latte β -caseina B tende a coagulare in tempi sensibilmente inferiori rispetto a quello di tipo β -caseina A, con effetti importanti sulla velocità di formazione del coagulo e di riflesso anche sulla sua consistenza [112]. Un carattere distintivo importante, comune alle varianti B di k -caseina e di β -caseina, è quello di determinare condizioni fisico-chimiche particolarmente favorevoli alla velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina, in misura tale da rendere sensibilmente più breve il tempo di rassodamento del coagulo (Fig. 7), caratteristica di preminente interesse tecnologico-caseario.



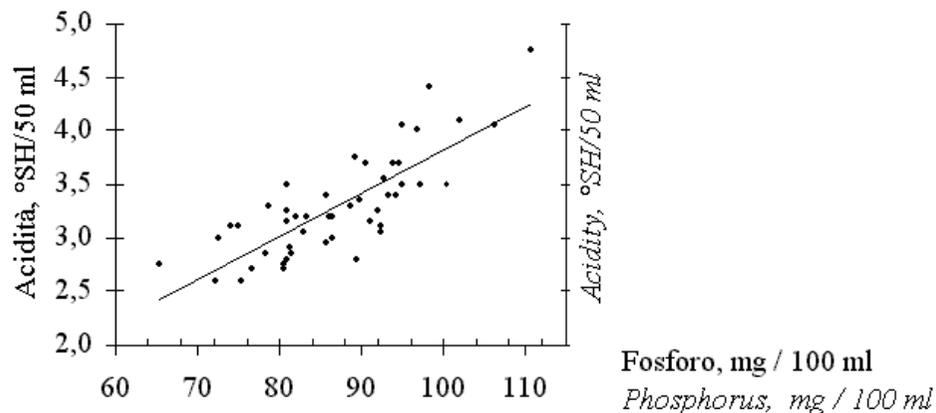


Tra le varianti rare alcune manifestano comportamenti peculiari [113], anche se ancora non completamente definiti. Il latte k-caseina BC, ad esempio, presenta un tempo di coagulazione piuttosto lungo [106], a causa dell'influenza negativa della variante C [114-116], la cui struttura (e conformazione) risulta modificata in misura tale da rallentare l'attacco idrolitico ad opera della chimosina [117-119], senza, però, influire, almeno pare, sull'andamento dello sviluppo del coagulo, cioè sulla fase secondaria della coagulazione. E' noto che il tipo genetico della k-caseina è in grado di esercitare un'influenza significativa sulla quantità con cui questa proteina entra nella composizione della caseina totale [120], con riflessi importanti sulla dimensione delle micelle: k-caseina B = maggiore proporzione di k-caseina = micelle più piccole = micelle più reattive = coagulo più compatto. Anche alla variazione di tipo α_{s1} -caseina G corrisponde una profonda modificazione del sistema micellare, che si caratterizza per una bassa proporzione di α_{s1} -caseina, controbilanciata da maggiori proporzioni di k-caseina e di α_{s2} -caseina [121].

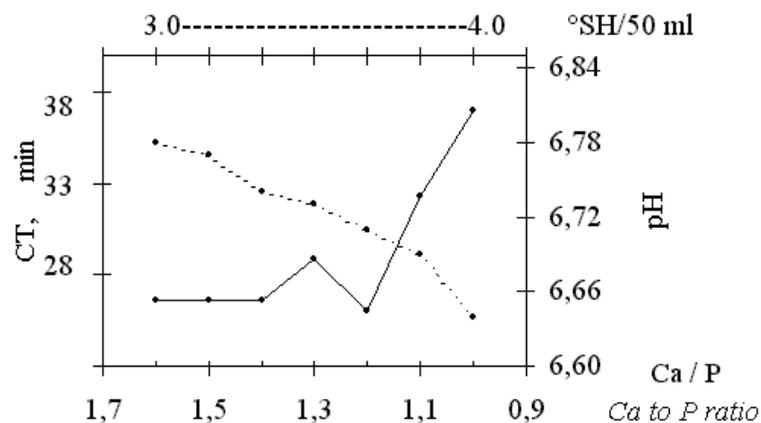
Le variazioni genetiche possono modificare le proprietà delle singole proteine e/o influenzare lo stato di aggregazione del sistema micellare in misura tale da interferire con l'azione degli enzimi proteolitici, sia nel corso del processo di coagulazione, sia durante la maturazione del formaggio. I sistemi maggiormente aggregati sono meno facilmente degradabili (vedi rassegne 12, 100). La β -caseina B e in particolare la C, ad esempio, manifestano una maggiore resistenza all'attacco proteolitico, anche nel corso della maturazione del formaggio [122, 123]. La α_{s1} -caseina A risulta più resistente nei confronti della chimosina e della pepsina [124-126], rispetto alle comuni varianti del sistema α_{s1} . In questo caso, però, il motivo è diverso: la perdita di un segmento di 13 amminoacidi e con esso del legame peptidico che rappresenta il punto di attacco enzimatico che porta alla formazione della α_{s1-l} e che dà l'avvio al processo maturativo del formaggio, probabilmente con riflessi importanti anche sulle proprietà reologiche della pasta [127-130].

Calcio, fosforo ed equilibri salini

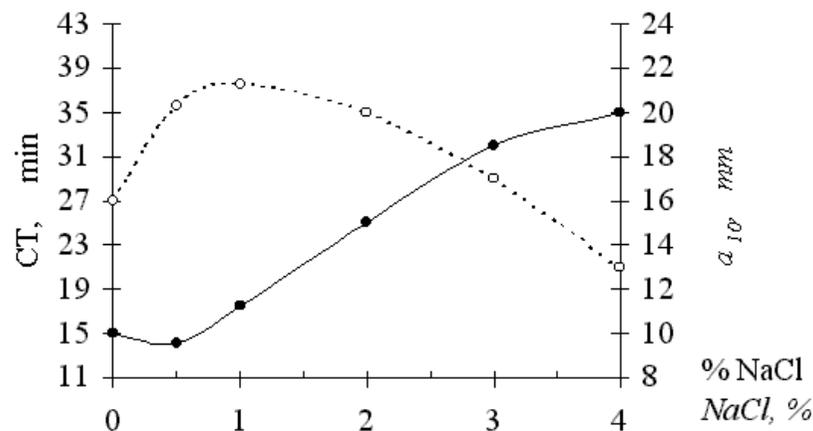
Il fosforo rappresenta un pilastro dell'acidità naturale del latte. La caseina ed il fosforo solubile insieme concorrono a determinarne oltre i 4/5 del valore titolabile con idrossido di sodio. I valori dell'acidità, in effetti, risultano sempre positivamente correlati con il contenuto in fosforo del latte (Fig. 8) a livello, sia di latti individuali di vacche di una stessa razza ($r = 0,72$; $P < 0,001$) o di diverse razze bovine ($r = 0,57/0,81$; $P < 0,001$), sia di latti di massa di singoli allevamenti ($r = 0,71$; $P < 0,001$) [63, 131, 132]. Particolarmente elevata risulta la correlazione ($r = 0,85$; $P < 0,001$) tra acidità e contenuto di fosforo solubile [133]. In condizioni normali (ad esempio, latte con il 2,5-2,6% di caseina e lo 0,045-0,047% di fosforo solubile) il loro contributo risulta pressoché di pari entità. Nei latti a vario grado anomali, siano essi ipoacidi o iperacidi, invece, l'equilibrio si altera più o meno profondamente a carico di uno o di entrambi i costituenti [131, 134-138]. I latti ipoacidi nel 43% circa dei casi risultano poveri di caseina e di fosforo, nel 37% di solo fosforo e nel 20% di sola caseina [135]. Nella maggior parte dei casi, il ruolo del fosforo appare determinante nella definizione dell'anomalia [131, 132, 139]. I valori del rapporto Ca/P e del rapporto Ca/PxN caseina [135] risultano alterati ed entrambi significativamente più elevati rispetto a quelli che contraddistinguono il latte ad acidità normale [131]. Si modificano, inoltre, i rapporti a livello della fase solubile, che, in aggiunta a calcio e fosforo, coinvolgono anche l'acido citrico [140], con importanti ripercussioni di interesse tecnologico. I latti tendono a manifestare peculiari caratteristiche, che appaiono tali da configurare diverse tipologie acidimetriche. La principale caratteristica differenziale dei latti ipoacidi è quasi sempre rappresentata da una carenza di fosforo solubile, cui si correlano strettamente i valori di pH ($r = -0,61$; $P < 0,001$); alla diminuzione della concentrazione idrogenionica corrisponde un decisivo allungamento del tempo di coagulazione del latte [133]. Anche l'iperacidità è in gran parte legata al fosforo, il cui contenuto, in questo caso, risulta però nettamente più elevato della norma [141].



Le conoscenze sui latti acidi e iperacidi sono scarse e non ben definite [131, 138, 142], soprattutto per quanto riguarda il loro comportamento con il caglio [46, 143, 144]. Il latte genericamente definito ad "elevata" acidità titolabile tende a coagulare in minor tempo [142, 143]; ma non mancano indicazioni contrastanti [46, 144], molto probabilmente dovute alla definizione (acidità naturale o di fermentazione?) e al grado (latte acido o iperacido?) dell'anomalia stessa. Il latte propriamente iperacido manifesta una lenta reattività presamica [141]. Mentre la scarsa reattività del latte ipoacido è essenzialmente legata alla natura stessa dell'anomalia (elevati valori di pH) [145], quella del latte propriamente iperacido, per acidità naturale, appare di non facile spiegazione. La tendenza di questi latti a coagulare lentamente è probabilmente dovuta al loro basso contenuto di calcio e soprattutto al bassissimo valore del rapporto Ca/P, fattori che concorrono entrambi a determinare una significativa carenza di ioni calcio, con riflessi negativi sulla formazione del coagulo [141] (Fig. 9). In questo contesto, un caso particolare è rappresentato dal latte delle vacche di razza Modenese, ricco di fosforo, caratterizzato da un basso valore del rapporto Ca/P, anche se in misura moderata [146, 147], che tende a manifestare una minore reattività presamica, contraddistinta da una lenta velocità di rassodamento del coagulo [148], anche in questo caso probabilmente dovuta ad una scarsa disponibilità di calcio sotto forma ionica (Ca^{++}), che svolge un ruolo fondamentale nella aggregazione delle micelle di paracaseina [57, 149-152].



In effetti, le alterazioni del rapporto Ca/P, sia pure di segno diverso, probabilmente riconducibili in gran parte a disordini metabolici, tendono ad essere sempre più frequenti. E' il caso, ad esempio, dei latti propriamente carenti di calcio - senza altre peculiari anomalie - che manifestano una scarsa attitudine alla coagulazione presamica, contraddistinta da un eccessivo allungamento dei tempi di rassodamento del coagulo. In questo quadro, infine, si inserisce un'altra condizione anomala, caratterizzata da una elevata concentrazione di cloruri, legata alle variazioni del fosforo e molto probabilmente originata dalle stesse cause di natura dismetabolica [153, 154]. In questi latti, infatti, al calo del contenuto in fosforo fa quasi sempre riscontro un significativo aumento dei cloruri [132, 155]. Particolarmente elevata risulta la correlazione tra contenuto di cloruri e contenuto di fosforo solubile ($r = -0,78$; $P < 0,001$) [133]. Questa relazione acquista un significato tecnologico del tutto particolare, in quanto lo ione cloro, al pari di altri anioni, esercita un'influenza negativa sul processo di coagulazione presamica del latte: rallenta lo sviluppo della reazione primaria tra chimosina e k-caseina [50, 149, 156, 157] (Fig. 10), riduce la velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina [149, 158] e, più in generale, interferisce sulla costruzione del reticolo caseinico diminuendo la capacità di sineresi del coagulo [159-161].

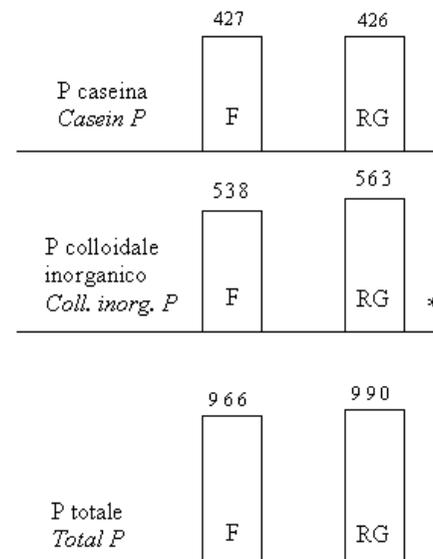
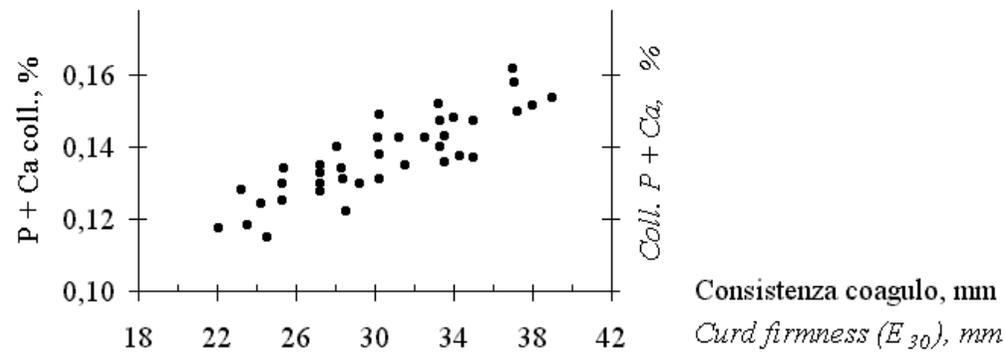


Fosfato di calcio colloidale e proprietà tecnologiche della caseina nativa

Circa i 2/3 del calcio e la metà del fosforo contenuti nel latte sono parte integrante del complesso micellare, che rappresenta la matrice stessa del formaggio. Una quota importante è costituita dal fosfato di calcio colloidale, intimamente associato alla caseina [162-164], come componente che svolge un ruolo essenziale nella costruzione delle micelle [165-167] e determinante ai fini dell'integrità e delle proprietà dell'intero sistema micellare [168-172]. Il fosfato di calcio colloidale, probabilmente attraverso un legame di natura elettrostatica con il fosforo esterificato alle caseine, determina l'aggregazione delle submicelle [165], condizionando, entro certi limiti, anche la dimensione degli aggregati micellari [173, 174]; in ogni caso, al di sotto di una certa soglia di fosfato colloidale non si ha formazione di micelle [165].

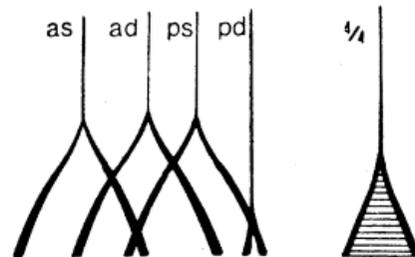
Le quote colloidali di calcio e di fosforo variano in un rapporto abbastanza stretto con i rispettivi livelli di contenuto totale [74, 175]. Si osservano variazioni in rapporto a razza, stadio di lattazione, stagione di produzione, allevamento, etc. [147, 176, 177], anche per quanto riguarda in maniera specifica il fosfato di calcio colloidale ed il grado di "mineralizzazione" della micella [177]. Nell'ambito della zona di produzione del Parmigiano-Reggiano, ad esempio, il latte delle vacche di razza Modenese si distingue dagli altri perché contiene meno calcio colloidale per unità di fosforo colloidale [147]. In effetti, i latti delle vacche di razza Frisona, Bruna, Reggiana e Modenese contengono quantità variabili di fosfato di calcio colloidale. Così, quello di Modenese si differenzia per avere meno fosfato di calcio colloidale per unità di caseina: le sue micelle, quindi, presentano un minor grado di "mineralizzazione", anche a paragone di quelle del latte delle vacche di razza Frisona [147]. Tali differenze appaiono importanti, in quanto il fosfato di calcio colloidale svolge, sia direttamente che indirettamente, un'azione significativa in tutte le fasi del processo di coagulazione [55, 82, 151, 160, 178-184], con particolare riguardo allo sviluppo della fase secondaria, di natura fisico-chimica, influenzando la velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina e le proprietà del reticolo caseinico: più fosfato = maggiore aggregazione = coagulo più consistente. In effetti, il coagulo, a parità di altre condizioni, in presenza di maggiori quantità di fosfato di calcio colloidale tende a formarsi più velocemente [178] e a quantità via via crescenti di fosfato colloidale corrispondono coaguli sempre più compatti, dotati di maggiore forza; al contrario, in assenza di fosfato colloidale non si forma un vero e proprio gel, ma soltanto un precipitato fioccoso [160]. In condizioni normali, la correlazione positiva tra contenuto di fosfato di calcio colloidale del latte e consistenza del coagulo risulta abbastanza buona [74] (Fig. 11); talvolta anche migliore rispetto a quella che si stabilisce tra consistenza del coagulo e contenuto di caseina.

Il latte delle vacche di razza Modenese dà origine ad un coagulo la cui resistenza al taglio - simile a quella del latte di Frisona - risulta nettamente inferiore rispetto a quella delle razze Reggiana e Bruna, i cui coaguli presentano le migliori caratteristiche reologiche in termini di consistenza e di elasticità [148]. In realtà, il latte delle vacche di razza Modenese, benché sia il più ricco di caseina, tende a formare un coagulo dotato di minore forza e di scarsa elasticità (coagulo "farinoso"), in netto contrasto con quelli di Reggiana e di Bruna (coaguli prettamente "gelatinosi"). Le particolari caratteristiche reologiche di questo latte sono, appunto, molto probabilmente da attribuire al minor grado di "mineralizzazione" delle micelle [147], oltreché al diverso tipo genetico delle caseine. Gli equilibri minerali, peculiari delle micelle, si riflettono sulla composizione del formaggio, con possibili ripercussioni sulla tessitura della pasta e sulle caratteristiche reologiche del prodotto finito [185, 186]. Il sistema micellare del latte delle vacche di razza Reggiana, ad esempio, proporzionalmente più ricco di fosfato colloidale inorganico rispetto a quello di Frisona, dà origine ad un formaggio che, a parità di caseina e di fosforo caseinico, risulta maggiormente provvisto di fosforo colloidale inorganico [187] (Fig. 12), probabilmente non senza effetti sulle proprietà fisico-chimiche e strutturali della pasta del Parmigiano-Reggiano.



Cellule somatiche e produzione di formaggi a lunga maturazione

Il latte prodotto da bovine affette da mastiti cliniche e subcliniche e da gravi disordini secretori presenta alterazioni fisico-chimiche, chimiche, microbiologiche ed enzimatiche tali da risultare più o meno inadatto per qualsiasi produzione casearia [188-194]. Le modificazioni dipendono dal maggiore passaggio nel latte di alcune componenti del sangue, dalla minore capacità di sintesi dell'epitelio secernente, dalla presenza di elevati carichi di cellule somatiche (leucociti) e di germi delle mastiti, *etc.* Il latte mastitico, principalmente a causa di elevati valori di pH, coagula molto lentamente e talvolta non coagula affatto [195] (Fig. 13). Il coagulo risulta particolarmente difettoso: dotato di scarsa elasticità, esso durante la cottura manifesta una ridottissima capacità di coartazione (scarsa contrattilità), cui fa riscontro una minore sineresi [58, 189, 195-206]. I granuli caseosi risultano di dimensioni molto eterogenee. Quelli più piccoli manifestano una eccessiva "sensibilità" al "fuoco", non si disidratano in misura adeguata e perdono la capacità di coesione. Essi, per lo più restano nel siero (sotto forma di "polvere") e concorrono a determinare una minore efficienza di resa della trasformazione casearia. Aumentano le perdite di grasso, nonché quelle di caseina, conseguenti, rispettivamente, ai difetti di struttura del reticolo caseinico e ad una più intensa attività proteolitica aspecifica [206-210]. Le perdite contribuiscono ad abbassare la resa in formaggio del latte mastitico, già di per sé inferiore rispetto a quella di un latte normale a causa del suo minore contenuto di caseina [21, 192, 209, 211-213].



Le masse caseose, poco contrattili, risultano molto più ricche di siero [199, 206] e, soprattutto, caratterizzate da una pasta non omogenea, con zone o parti a diverso grado di umidità [200]. Quest'ultima condizione, marcatamente anomala, specie nel caso di formaggi a pasta cotta, dura e a lunga maturazione (es. Parmigiano-Reggiano), rappresenta l'origine di numerosi difetti e alterazioni che si manifestano a breve, medio e lungo periodo, difetti in grado di penalizzare in misura notevole la resa commerciale della trasformazione casearia [200, 201, 214, 215]. I ristagni di siero, localizzati sia nelle porzioni interne della forma sia sottocrosta, danno origine alla formazione dei cosiddetti "bianchi" o "smorbi", che si manifestano precocemente come macchie o chiazze biancastre [199, 200, 216] (Fig. 14). Nel corso della stagionatura la pasta di queste zone anomale perde progressivamente di elasticità diventando "gessosa", difetto da cui deriva la "correzione" della forma, con conseguente notevole deprezzamento commerciale del formaggio [215]. La scarsa attitudine alla fermentazione lattica favorisce - durante le fasi di cottura e di giacenza in caldaia e, soprattutto, nelle prime 24 h, quando le fermentazioni sono accentuate - lo sviluppo di microflora gasogene inquinanti non sporigene (es. coliformi) e, in parte, anche di quelle gasogene sporigene, in grado di determinare a medio termine la formazione di "occhiate" più o meno diffuse, di "vescicotti", oppure di "alveolature" molto minute distribuite su tutta la forma [215]. Il sensibile abbassamento del potenziale di ossido-riduzione - proprio del latte ricco di leucociti e conseguentemente del formaggio - e i ristagni di siero, in presenza di valori elevati di pH, favoriscono la crescita dei batteri anaerobi sporigeni, che provocano la fermentazione butirrica, accompagnata dalla produzione di forti quantità di gas (gonfiore) [200, 214]. Il formaggio subisce profonde alterazioni strutturali ("pasta spugnosa"), generalmente tardive (*Clostridium tyrobutyricum*), ma sempre più frequentemente anche molto precoci (*Cl. butyricum*).

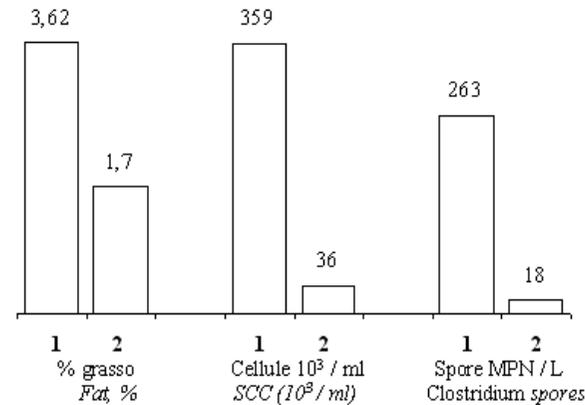


Nel lungo periodo i difetti di struttura si evidenziano maggiormente anche attraverso la formazione localizzata di distacchi di pasta, in genere insieme a pronunciata alveolatura, frequentemente in prossimità dello scalzo e talvolta con disposizione anulare [214]. La stessa "polvere", che entra nella costituzione della massa caseosa, può concorrere a determinare un peggioramento delle proprietà reologiche della pasta, che risulta sin dall'inizio "slegata" e che in seguito tenderà a manifestare sempre maggiori caratteristiche di "fragilità". Più in generale, il formaggio risulta soggetto ad un andamento maturativo decisamente anomalo, con comparsa di sapore amaro e di gusto piccante, nonché di colorazioni accentuate e spesso non uniformi e di altri difetti, che nel lungo periodo possono determinare un sensibile aumento degli scarti. Tali alterazioni sono in parte dovute anche alla eccessiva presenza nel latte di sostanze biologicamente attive provenienti direttamente dal sangue e dalla autolisi dei leucociti, quali, ad esempio, plasminogeno/plasmina, alfa-2-macroglobulina, inibitori della tripsina, etc. [21, 207, 213, 217-225].

Affioramento naturale e "debatterizzazione" del latte

La pratica dell'affioramento naturale del grasso durante la sosta del latte nelle bacinelle o vasche, in attesa della trasformazione in formaggio grana, è nata con il formaggio stesso [226-228]. Tale tecnica, definita "primitiva", viene tuttavia riguardata ancora oggi in modo interessante [229]. La risalita del grasso risulta inversamente proporzionale all'altezza dello strato ed è correlata negativamente con la temperatura del latte; essa viene influenzata sfavorevolmente dallo sbattimento che il latte subisce durante la mungitura e le operazioni di trasporto [230]. Nel determinismo del fenomeno giocano un ruolo importante le proteine agglutinanti presenti nel latte [231], nonché la durata, le condizioni di riposo e della camera del latte [232]. La capacità di affioramento varia in rapporto alla influenza di numerosi fattori, quali alimentazione e stato metabolico delle vacche, parametri produttivi e fase fisiologica della lattazione, caratteristiche del latte, etc. [233, 234]. Da tale proprietà dipendono l'entità e la quantità dello strato della panna, aspetti di indubbio interesse caseario, in quanto al fenomeno sono legati, da un lato, il tenore in grasso e la quantità di latte lavorabile e, dall'altro, il titolo della crema da burrificare [230, 232, 235, 236].

L'affioramento del grasso in quanto tale è fondamentale non soltanto per la standardizzazione del rapporto grasso:caseina, ma anche ai fini del conseguimento di una certa "debatterizzazione" del latte in caldaia, fenomeno legato sia ai processi di agglutinazione dei batteri sia alla stessa aggregazione e risalita dei globuli di grasso [230, 231, 237-239]. In particolare, la capacità di affioramento può esercitare un'influenza significativa sul grado di "depurazione" microbica del latte che passa in caldaia [226, 227, 240-242] e che interessa soprattutto i batteri "anticaseari" [238, 239, 243-245]. Nella produzione di Parmigiano-Reggiano la sosta di 10-12 ore del latte nelle vasche di affioramento viene considerata un vero e proprio banco di prova della materia prima da sottoporre alla lavorazione [242, 244]. Tra le molteplici variazioni, quelle di maggiore rilievo interessano il grasso, le cellule somatiche e le spore. In particolare, affiora più della metà del grasso, le cellule somatiche diminuiscono in misura ragguardevole, così come le spore dei clostridi di tipo butirrico [245] (Fig. 15).



La sosta nelle vasche di affioramento gioca un ruolo importante anche ai fini della cosiddetta "maturazione" tecnologica del latte, frutto di un complesso di fenomeni chimico-fisici, microbiologici e enzimatici che interagiscono ed intervengono a carico delle diverse componenti in misura variabile in rapporto alle condizioni di sosta del latte [242]. Il latte subisce un certo incremento di acidità titolabile [236, 242] in conseguenza dell'attività degli enzimi nativi e/o liberati dalla microflora, probabilmente una parziale solubilizzazione del calcio micellare [232], un miglioramento nei tempi di rassodamento del coagulo [241], un aumento di consistenza del coagulo [239, 244] e della sua capacità di sineresi; mentre il tempo di coagulazione tenderebbe ad aumentare [244] a causa di un lieve innalzamento dei valori di pH.

Qualità microbiologica e fermentazioni del formaggio

La qualità microbiologica rispecchia lo stato sanitario delle bovine, l'igiene della mungitura e delle condizioni di raccolta e di conservazione del latte. Il DPR 54/97 [246], di recepimento della direttiva CEE 92/46, prescrive che il latte destinato alle trasformazioni casearie, sia crudo che pastorizzato, deve avere un tenore massimo di 100.000 ufc/ml; sono previste deroghe per i formaggi con stagionatura superiore a 60 giorni e per il latte ovicaprino e bufalino. La scrupolosa osservanza delle pratiche igieniche consente di rispettare i valori previsti dalla normativa comunitaria, ma non permette di selezionare la microflora "filocasearia" e di escludere quella dannosa, che è causa di fermentazioni anomale e di alterazioni dei prodotti finiti. Tutte le innovazioni che interessano le tecniche di allevamento (alimenti e modalità di somministrazione, mungitura, stabulazione, etc.) hanno avuto un significativo riflesso anche sul contenuto di microrganismi del latte e sulla loro distribuzione tra i vari gruppi, nonché sulla entità della presenza di quelli di tipo "anticaseario". Motivi di ordine igienico sono alla base dei limiti microbiologici previsti dal DPR 54 per il latte destinato alla trasformazione (previa pastorizzazione) in formaggi non tipici, per i quali l'attività biologica è delegata all'impiego di starters selezionati in laboratorio.

La riduzione della contaminazione del latte può essere utile anche al fine di salvaguardare la qualità dei derivati caseari, compresi quelli stagionati a lungo e tipici. In effetti, un latte più pulito contiene meno batteri indesiderati (*Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Alcaligenes*) e meno batteri "anticaseari" (clostridi e propionici) [230]. Così, nelle aree in cui le innovazioni tecnologiche a livello zootecnico sono state più incisive, ad es. quelle del Grana Padano e del Provolone Valpadana, l'osservanza di scrupolose norme igieniche è finalizzata anche a ridurre la presenza di microrganismi anticaseari, quali propionici, clostridi ed enterobatteri; ciò, però, comporta anche la contemporanea riduzione dei batteri lattici, cui si attribuisce un grande significato nella determinazione della tipicità del prodotto per il legame con il territorio [247]. In questi casi, la tecnologia di caseificazione, che prevede l'utilizzazione di innesti naturali di preparazione aziendale, sostituisce la microflora nativa di contaminazione di stalla. Il caseificio diventa l'ambiente di mantenimento del legame biologico con il territorio, determinante fattore di tipicità. Laddove le innovazioni zootecniche sono state meno significative (ad esempio, divieto foraggi insilati) la presenza di germi "anticaseari" nel latte risulta più ridotta, mentre rimane importante il contenuto di batteri lattici. In questi casi, la microflora del latte raccolto dopo ogni mungitura e destinato alla produzione di formaggi con stagionatura superiore ai 60 giorni, può raggiungere valori di 200-400.000 ufc/ml.

Operazioni tecnologiche, quali la scrematura per affioramento, la pastorizzazione e la microfiltrazione possono ridurre il grado di contaminazione e migliorare le condizioni igieniche del latte. La temperatura di cottura e di conservazione della cagliata, la riduzione dell'attività dell'acqua e l'aumento di acidità nel corso della lavorazione selezionano i ceppi, indirizzano il processo

fermentativo e condizionano lo sviluppo di enterobatteri, propionici e clostridi. Questi gruppi microbici, che generalmente costituiscono una piccola quota della microflora del latte, assumono particolare significato nel determinare la qualità di formaggi stagionati, quali Parmigiano-Reggiano, Grana Padano, Provolone Valpadana, etc.

Clostridium butyricum, *Cl. tyrobutyricum* e *Cl. sporogenes* sono le specie più spesso coinvolte nei processi di alterazione dei caratteri strutturali ed organolettici dei formaggi per formazione di occhi e distacchi di pasta e comparsa di odori e sapori sgradevoli. *Cl. butyricum* si sviluppa nei primi giorni successivi alla caseificazione ed utilizza il lattosio come fonte energetica; *Cl. tyrobutyricum* utilizza l'acido lattico; entrambi per fermentazione producono acido butirrico, acido acetico, anidride carbonica ed idrogeno. *Cl. sporogenes* è in grado di deaminare gli amminoacidi con produzione di ammoniaca, acido caproico e acido caprilico, mentre per decarbossilazione degli amminoacidi produce ammine ed anidride carbonica. Le spore di clostridi dal terreno passano al foraggio e si ritrovano, concentrate, nel materiale fecale. La presenza di 30-40 spore per litro di latte in caldaia può essere sufficiente a causare alterazioni che si manifestano per *Cl. tyrobutyricum* e *Cl. sporogenes* anche a distanza di un anno dalla caseificazione. I batteri propionici si riscontrano normalmente (10-100 ufc/ml) nel latte crudo, svolgono un ruolo determinante nel formaggio Emmentaler e similari, ma la loro presenza può diventare dannosa per altre tipologie casearie derivate da latte crudo, specie se le condizioni di stagionatura o la scarsa attitudine fermentativa della cagliata ne consentono uno sviluppo anomalo.

I leucociti presenti nel latte in numero elevato attestano, tra l'altro, anche una composizione biologica anomala, che si riflette negativamente sull'attitudine del latte a costituire un idoneo substrato di sviluppo per i batteri lattici; ciò porta all'ottenimento di un innesto naturale con batteri lattici scarsi per numero e poco vitali e, conseguentemente, alla comparsa di difetti nei formaggi a lungo periodo di maturazione. La scarsa attitudine fermentativa del latte può essere dovuta anche a cause diverse, non sempre del tutto manifeste: generalmente essa porta a rallentata sineresi, a lenta acidificazione della cagliata con sviluppo di fermentazioni, attività microbiche e reazioni fisico-chimiche ed enzimatiche indesiderate e, quindi, alla comparsa di difetti di sapore, di odore e di struttura nel formaggio stagionato.

In definitiva, il contenuto microbico del latte deve essere visto in funzione della sua utilizzazione: l'inquinamento deve essere il più basso possibile quando il latte è destinato al consumo diretto o alla produzione di derivati caseari freschi o molli ottenuti previa pastorizzazione. Per contro, un adeguato contenuto microbico può costituire un motivo di specificità quando il latte viene destinato alla produzione di formaggi a lunga stagionatura ottenuti da latte crudo, specie se a "Denominazione di Origine Protetta". In questo caso, infatti, la microflora "filocasearia", che caratterizza l'ambiente produttivo e riflette il legame con il territorio, costituisce l'inoculo iniziale in grado di indirizzare e condizionare i processi fisico-chimici e biologici della caseificazione del latte e della maturazione del formaggio.

Conclusioni

Il latte di produzione nazionale è in gran parte destinato alla trasformazione in formaggio. La sua qualità viene valorizzata in numerose produzioni casearie a "Denominazione di Origine Protetta". Le produzioni di Grana Padano e Parmigiano-Reggiano utilizzano oltre 3 milioni di tonnellate di latte l'anno. La qualità del latte svolge un ruolo importante nella produzione di tutti i formaggi e in particolare di quelli a lungo periodo di maturazione. La caseina assume un ruolo fondamentale nella determinazione della resa in formaggio. L'attitudine alla coagulazione presamica, importante anche ai fini della efficienza di resa della trasformazione, rappresenta il requisito *sine qua non* per tutte le produzioni casearie ed in particolare per quelle intrinsecamente pregevoli riguardanti i formaggi a pasta cotta, dura e a lungo periodo di maturazione, ottenuti dalla formazione e dalla sineresi di una cagliata acido-presamica. Sotto questo profilo svolgono un ruolo significativo anche i sali minerali, l'acidità e le combinazioni delle varianti genetiche delle caseine che caratterizzano il sistema micellare. La qualità microbiologica del latte assume un ruolo determinante ai fini dell'andamento delle fermentazioni, che caratterizzano i processi di maturazione e le proprietà organolettiche del formaggio, con particolare riferimento alle singole varietà, segnatamente nel caso delle produzioni a "Denominazione di Origine Protetta".

Parole chiave: Caratteristiche del latte, trasformazione casearia, resa in formaggio, coagulazione presamica, varianti genetiche, sineresi, qualità microbiologica.

Key words: Milk characteristics, cheesemaking, cheese yield, rennet-coagulation, genetic variants, curd syneresis, microbiological quality.

RIASSUNTO – Gli Autori passano in rassegna i principali requisiti tecnologico-caseari del latte destinato alla trasformazione casearia, con particolare riferimento alla produzione dei formaggi a "Denominazione di Origine Protetta". L'analisi riguarda i seguenti aspetti: proteina, grasso e resa in formaggio; attitudine alla coagulazione presamica e sineresi della cagliata; pH, acidità titolabile e tempo di coagulazione; contenuto di caseina e consistenza della cagliata; varianti genetiche, dimensione delle micelle e tempo di rassodamento del coagulo; calcio, fosforo ed equilibri salini; fosfato di calcio colloidale e proprietà tecnologiche della caseina nativa; cellule somatiche del latte e produzione di formaggi a lunga maturazione; affioramento naturale e "debutterizzazione" del latte; qualità microbiologica e fermentazioni.

SUMMARY – *Remarks about the main dairy-technological requisites of milk for grana cheese production.* Authors review the main dairy-technological requisites of milk destined to cheesemaking, with particular regards to the production of "Protected Designation of Origin" cheeses. The study examines the following aspects: protein, fat and cheese yield; rennet-coagulation aptitude and curd syneresis; pH, titratable acidity and clotting time; casein content and curd firmness; genetic variants, micelle size and curd firming time; calcium, phosphorus and salt equilibria; colloidal calcium phosphate and technological properties of native casein; milk somatic cells and long ripening cheese production; natural creaming ability; microbiological quality and fermentations.

Ringraziamenti: Gli Autori ringraziano M. Pecorari (Consorzio Formaggio Parmigiano-Reggiano), S. Sandri (Centro Lattiero Caseario di Parma) ed il Centro Ricerche Produzioni Animali (CRPA spa) di Reggio Emilia

Bibliografia

1. AA. VV. (1998) – Osservatorio sul mercato dei prodotti lattiero-caseari. "Annuario del latte". (Coord. R. Pieri). Ed. Franco Angeli, Milano.
2. Brandano P., Pulina G., Rassu S.P.G. (1992) – Quantity and quality aspects of goat production in Italy. "Medit.", 3(4), 16-25.
3. Pieri R., Mambriani D. (1994) – Localizzazione della produzione del latte per i formaggi D.O. Atti Conv. "Il latte per i formaggi DOC", Cremona, 30 settembre 1994.
4. Annibaldi S. (1981) – Qualità del latte e produzioni casearie a denominazione d'origine. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 32, 407-417.
5. Battistotti B. (1994) – Il latte per i formaggi a denominazione di origine protetta. Atti Conv. "Un alimento antico in viaggio verso il futuro", 65-70, Ed. MAF Servizi, Torino.
6. Battistotti B., Corradini C. (1993) – Italian cheese. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology". vol. II. Major Cheese Groups, 221-243, (Ed. P. F. Fox). Chapman & Hall, London, UK.
7. Borchers K.B. (1985) – Cheddar cheese manufacture. I. The importance of the chemical composition and microbiological quality of milk. In "Sevarac Annual Cheesemakers Symp.", South Africa, 11-27.
8. Colin O., Laurent F. (1991) – Qualité du lait et transformation fromagère. Colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", 159-164, Nancy (France), 2-3 Octobre 1991.
9. Remeuf F., Cossin V., Dervin C., Lenoir J., Tomassone R. (1991) – Relations entre les paramètres physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. "Lait", 71, 397-421.
10. Colin O., Laurent F., Vignon B. (1992) – Variations du rendement fromager en pâte molle: relation avec la composition chimique du lait et les paramètres de la coagulation. "Lait", 72, 307-319.
11. Martin B., Coulon J.B. (1995) – Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. II. Influence des caractéristiques des laits de troupeaux et des pratiques fromagères sur les caractéristiques du Reblochon de Savoie fermier. "Lait", 75, 133-149.
12. Mariani P., Pecorari M. (1987) – Fattori genetici, attitudine alla caseificazione e resa del latte in formaggio. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 38, 286-326.
13. Pecorari M., Mariani P. (1990) – Caseina, attitudine alla coagulazione del latte, resa e qualità del formaggio. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 41, 225-244.
14. Mariani P., Serventi P., Fossa E. (1997) – Contenuto di caseina, varianti genetiche ed attitudine tecnologico-casearia del latte delle vacche di razza Bruna nella produzione del formaggio grana. "La Razza Bruna Italiana", 37 (2), (Suppl. 1), 8-14.
15. Barbano D.M., Sherbon J.W. (1984) – Cheddar cheese yields in New York. "J. Dairy Sci.", 67, 1873-1883.
16. Kerjean J.R. (1984) – Conséquences fromagères des variations de composition du lait: qualité chimique du lait de fromagerie. Colloque INRA-ENSAR-INAPG "La composition chimique du lait et ses incidences technologiques", 1-15, Rennes (France), 28 septembre 1984.
17. Vandeweghe J. (1984) – Le rendement en fromage: prédétermination et mesure. In "Le Fromage", 467-475, (Coord. A. Eck). Technique et Documentation (Lavoisier), Paris.
18. Gilles J., Lawrence R.C. (1985) – The yield of cheese. "N. Z. J. Dairy Sci. Technol.", 20, 205-214.
19. Banks J.M., Clapperton J.L., Muir D.D., Girdler A.K. (1986) – The influence of diet and breed of cow on the efficiency of conversion of milk constituents to curd in cheese manufacture. "J. Sci. Food Agric.", 37, 461-468.
20. Lawrence R.C. (1988) – Les facteurs du rendement fromager des laits. "Revue Laitière Française", 478, 85-91.
21. Lucey J., Kelly J. (1994) – Cheese yield. "J. Soc. Dairy Technol.", 47(1), 1-14.
22. van den Berg M.G. (1994) – The transformation of casein in milk into the paracasein structure of cheese and its relation to non-casein milk components. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.i. no. 9402, 35-47.
23. Custer E.W. (1979) – The effect of milk composition on the yield and quality of cheese. II. The effects of breeds. "J. Dairy Sci.", 62(suppl.1), 48-49.
24. Cusmano I., Russo F. (1962) – Sul procedimento per determinare la resa in formaggio e burro nella trasformazione del latte a Parmigiano-Reggiano. "Il Latte", 36, 852-858.
25. Cusmano I., Russo F., Tromellini P. (1963) – Sul rapporto grasso-caseina del latte in caldaia da trasformare in formaggio Parmigiano-Reggiano. "Il Latte", 37, 456-464.
26. Galaverni R. (1972) – I problemi tecnici ed economici della caseificazione e della maturazione dei formaggi. Atti "Giornate Studio Problemi Lattiero-caseari", 159-164, Ente Aut. Mostra Cons. Alim., Parma, 26-27 aprile 1972.
27. Aleandri R., Schneider J.C., Buttazzoni L.G. (1989) – Evaluation of milk for cheese production based on milk characteristics and Formagraph measures. "J. Dairy Sci.", 72, 1967-1975.
28. Pecorari M., Fossa E., Sandri S., Tedeschi G., Pellegrino L., Mariani P. (1995) – Il ruolo del contenuto in caseina del latte nella produzione del Parmigiano-Reggiano: resa, composizione chimica, proteolisi, lipolisi e caratteristiche organolettiche del formaggio stagionato. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 46, 211-232.
29. Labuschagne J.H. (1982) – Influenza della composizione chimica del latte sulla qualità del formaggio. "Il Latte", 7, 294-298.
30. Carlson A., Hill C.G. Jr, Olson N.F. (1987) – The kinetics of milk coagulation: IV. The kinetics of the gel-firming process. "Biotech. Bioeng.", 29, 612-624.
31. Annibaldi S., Nanni M. (1979) – Osservazioni preliminari sulla microstruttura del formaggio Parmigiano-Reggiano. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 30, 191-198.
32. Pecorari M., Mariani P. (1999) – Dati non pubblicati.
33. Annibaldi S. (1961) – Valutazione e importanza della contrattilità del coagulo del latte. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 11, 17-19.
34. Flüeler O., Puhon Z. (1978) – [Research on slow-renneting milk. II. Technological aspects]. "Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung", 7(4), 61-68.
35. Losi G., Castagnetti G.B. (1981) – Problemi legati alla trasformazione del latte prodotto nei grandi allevamenti. Atti Conv. "Gestione tecnico-economica grandi allevamenti vacche da latte.", 18-27, Reggio Emilia, 8-9 ottobre 1981.
36. Bynum D.G., Olson N.F. (1982) – Influence of curd firmness at cutting on Cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. "J. Dairy Sci.", 65, 2281-2290.
37. 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.
38. Mora R., Zannoni M. (1986) – L'importanza della caseina nella produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano. "Il Parmigiano-Reggiano", 16(2), 23-25.
39. Antila V., Hakkarainen H., Lappalainen R. (1982) – The transfer of milk components to Finnish Edam and Emmental cheeses. "Milchwissenschaft", 37, 321-324.
40. Banks J.M., Muir D.D. (1984) – Coagulum strength and cheese yield. "Dairy Industries Int.", 49(9), 17, 19, 21, 36.
41. Banks J.M., Tamime A.Y. (1987) – Seasonal trends in the efficiency of recovery of milk fat and casein in cheese manufacture. "J. Soc. Dairy Technol.", 40, 64-66.
42. Mayes J.J., Sutherland B.J. (1989) – Further notes on coagulum firmness and yield in Cheddar cheese manufacture. "Aust. J. Dairy Technol.", 44, 47-48.
43. Ng-Kway-Hang K.F., Pöliiti I., Cue R.I., Marziali A.S. (1989) – Correlations between coagulation properties of milk and cheese yielding capacity and cheese composition. "Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.", 22, 291-294.
44. McCarron S.B., Strugnell C.J. (1990) – An evaluation of fat recovery into Cheddar cheese in a modern creamery. "Irish J. Food Sci. Technol.", 14, 25-33.
45. Strand A.H., Hulbækdal A. (1993) – [Effect of varying curd firmness at cutting on Norwegian cheese]. "Meieriposten", 82(13;14), 372-379; 415-417.
46. Dieci E. (1960) – I lattii lenti e la genesi degli smorbi del formaggio Parmigiano-Reggiano. "Il Latte", 34, 243-258.
47. Carini S. (1980) – Requisiti fisico-chimici e batteriologici del latte destinato alla caseificazione. Atti Conv. "Latte alimentare e latte per la caseificazione", Parma, 10 aprile 1980.
48. Pecorari M., Fossa E., Avanzini G., Mariani P. (1988) – Il latte a coagulazione anomala: comportamento tecnologico nella caseificazione a Parmigiano-Reggiano. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 39, 319-337.
49. Castagnetti G.B. (1993) – Mezzi e strategie rivolte al contenimento dei difetti ed al miglioramento della qualità del Parmigiano-Reggiano. Atti Conv. Progeo "Origine dei principali difetti del formaggio Parmigiano-Reggiano e possibili rimedi.", 27-50, Reggio Emilia, 28 gennaio 1993.
50. White J.C.D., Davies D.T. (1958) – The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. III. Coagulation by rennet. "J. Dairy Res.", 25, 267-280.
51. van Hooydonk A.C.M., Boerrigter I.J., Hagedoorn H.G. (1986) – pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. II. Effect of pH on renneting of milk. "Neth. Milk Dairy J.", 40, 297-313.
52. Garnier J., Mocquot G., Ribadeau-Dumas B., Maubois J.L. (1968) – Coagulation du lait par la présure: aspects scientifiques et technologiques. "Ann. Nutr. Alim.", 22, B495-B552.
53. Fox P.F. (1969) – Milk-clotting and proteolytic activities of rennet, and of bovine pepsin and porcine pepsin. "J. Dairy Res.", 36, 427-433.
54. Ramet J.P., Weber F. (1980) – Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. "Le Lait", 60, 1-13.

55. Mehaia M.A., Cheryan M. (1983) – The secondary phase of milk coagulation: effect of calcium, pH, and temperature on clotting activity. "Milchwissenschaft", 38, 137-140.
56. Green M.L., Grandison A.S. (1993) – Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology", vol. I, General Aspects, 101-140 (Ed. P. F. Fox). Chapman & Hall, London, UK.
57. Storry J.E., Ford G.D. (1982) – Some factors affecting the post-clotting development of coagulum strength in renneted milk. "J. Dairy Res.", 49, 469-477.
58. Annibaldi S. (1959) – Studio della dinamica della coagulazione presamica del latte. "Il Latte", 33, 395-400.
59. Kiermeier F., von Wüllerstorff B. (1963) – [Factors affecting the drainage of whey from cheese curd]. "Milchwissenschaft", 18, 75-79.
60. Patel M.C., Lund D.B., Olson N.F. (1972) – Factors affecting syneresis of renneted milk gels. "J. Dairy Sci.", 55, 913-918.
61. Weber F. (1984) – L'égouttage du coagulum. In "Le Fromage", 22-36, (Coord. A. Eck). Technique et Documentation (Lavoisier), Paris.
62. White J.C.D., Davies D.T. (1958) – The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. I. General introduction, description of samples, methods and chemical composition of samples. "J. Dairy Res.", 25, 236-255.
63. Mariani P. (1982) – Rapporti tra acidimetria e tempo di coagulazione del latte in quattro razze bovine. "Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma", 2, 197-208.
64. Mariani P., Artoni A. (1982) – Il latte ad acidità anomala. I. Diffusione nella bassa pianura reggiana. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 33, 369-387.
65. Mariani P., Pecorari M., Fossa E., Fieni S. (1981) – Diffusione del latte a coagulazione anomala e rapporti con il contenuto cellulare e l'acidità titolabile. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 32, 222-236.
66. Mariani P., Zanzucchi G., Pecorari M., Fossa E. (1991) – Variazioni dell'acidità e del tempo di coagulazione del latte in rapporto all'allevamento e alla stagione di produzione. "Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma", 11, 277-289.
67. Mariani P., Bonatti P., Sandri S. (1992) – Contenuto di urea, pH, acidità titolabile e caratteristiche di coagulazione del latte di singoli allevamenti. "Ind. Latte", 28(3), 3-17.
68. 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. Veter., Univ. Parma", 14, 133-148.
69. Calamari L., Maianti M.G., Bertoni G., Chiarini A. (1995) – Acidità e attitudine alla coagulazione del latte in funzione della fermentescibilità degli alimenti. "Progetto Finalizzato Moderne Strategie Lattiero-Casearie. Relazione terzo anno di attività, 45-48. Ed. Tecniche Nuove, Milano.
70. Alais Ch. (1965) – Influence de divers traitements sur l'aptitude du lait à la coagulation par la présure. "Ind. Laitière", 218, 90-93.
71. Dalgleish D.G. (1980) – Effect of milk concentration on the rennet coagulation time. "J. Dairy Res.", 47, 231-235.
72. Mora R. (1985) – Contenuto proteico del latte in rapporto alla tecnologia di fabbricazione del formaggio Parmigiano-Reggiano. Incontro Studio "Importanza del contenuto proteico del latte per la produzione dei formaggi tipici", 35-49, Ed. C.R.P.A., Reggio Emilia, 19 novembre 1985.
73. Annibaldi S. (1959) – Ricerche sulla coagulazione del latte nella lavorazione del formaggio grana. "Il Latte", 33, 781-783.
74. Resmini P., Volonterio G., Annibaldi S. (1971) – Alcune caratteristiche chimiche e chimico-fisiche di lattini destinati alla produzione di formaggio Parmigiano-Reggiano. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 22, 63-90.
75. Morini D., Castagnetti G.B., Grazia L., Losi G., Mariani P. (1983) – Il latte della Reggiana nella produzione del Parmigiano-Reggiano. I. Caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche. "Ind. Latte", 19(4), 19-40.
76. Robertson N.H. (1983) – The effect of certain characteristics of milk on its rennetability and on the rate of syneresis. "Proc. Miles Ann. Cheesemakers Symp.", 18 pp. Capetown, South Africa.
77. Storry J.E., Grandison A.S., Millard D., Oven A.J., Ford G.D. (1983) – Chemical composition and coagulation properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. "J. Dairy Res.", 50, 215-299.
78. Grandison A. (1986) – Causes of variation in milk composition and their effects on coagulation and cheese making. "Dairy Industries Int.", 51(3), 21, 23-24.
79. Marziali A.S., Ng-Kwai-Hang K.F. (1986) – Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. "J. Dairy Sci.", 69, 1793-1798.
80. Mariani P. (1987) – Rapporti tra variazioni della caseina e proprietà tecnologico-casearie del latte. "Atti Soc. It. Buiatria", 19, 65-69.
81. Fox P.F., Morrissey P.A. (1972) – Casein micelle structure: location of k-casein. "J. Dairy Res.", 39, 387-394.
82. Lenoir J., Schneid N. (1984) – L'aptitude du lait à la coagulation par la présure. In "Le Fromage", 139-149 (Coord. A. Eck). Technique et Documentation (Lavoisier), Paris.
83. Amram Y., Delespaul G., Vandeweghe J., Schneid N., Lenoir J. (1982) – Le refroidissement du lait et son comportement en fromagerie. II. Efficacité de divers traitements de correction. "Revue Laitière Française.", 404, 53-57.
84. Mariani P., Summer A., Zanzucchi G., Fieni S. (1997) – Relazione tra la consistenza del coagulo - valutata con differenti criteri mediante Formagraph - e il contenuto in caseina del latte. "Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma", 17, 195-204.
85. Martuzzi F., Summer A., Catalano A.L., Sandri S., Mariani P. (2000) – Rennet-curd firmness variability among Italian Friesian herds and its relations with the casein content of milk. Proc. Int. Symp. "Prospects for a sustainable dairy sector in the Mediterranean", Hammamet (Tunisia), 25-31 October 2000 (in press).
86. Fossa E., Pecorari M., Sandri S., Tosi F., Mariani P. (1994) – Il ruolo del contenuto in caseina del latte nella produzione del Parmigiano-Reggiano: composizione chimica, caratteristiche di coagulazione e comportamento tecnologico-caseario del latte. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 45, 519-535.
87. Tromellini P. (1960) – Latti carenti e loro trasformazione in Parmigiano-Reggiano. "Il Latte", 34, 357-359.
88. Quadri P. (1961) – Lavorazione del latte previamente diviso secondo il contenuto proteico. "Il Latte", 35, 195-203.
89. Mocquot G. (1980) – Citato da Carini (1980) [47].
90. Dalgleish D.G. (1998) – Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. "J. Dairy Sci.", 81, 3013-3018.
91. De Kruijff C.G. (1998) – Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. "J. Dairy Sci.", 81, 3019-3028.
92. Losi G., Mariani P. (1984) – Significato tecnologico del polimorfismo delle proteine del latte nella caseificazione a formaggio grana. "Ind. Latte", 20(1), 23-53.
93. Grosclaude F. (1988) – Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. "INRA Prod. Anim.", 1, 5-17.
94. Masina P., Ramunno L., Di Gregorio P., Rando A. (1996) – La genetica molecolare nel miglioramento della produzione del latte. Atti Conv. "Biotecnologie Avanzate per Agricoltura Alimentazione e Ambiente", 108-109, Ferrara, 8-11 ottobre 1996.
95. Braunschweig M., Puhán Z. (1997) - Influence of casein haplotypes on quantitative traits in milk of Braunvieh and Fleckvieh in Switzerland. "Proc. IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand", 60-70. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
96. Ikonen T., Ojala M., Syväoja E.L. (1997) – Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. "Agric. Food Sci. Fin.", 6, 283-294.
97. Mayer H.K., Ortner M., Tschager E., Ginzinger W. (1997) – Composite milk protein phenotypes in relation to composition and cheesemaking properties of milk. "Int. Dairy Journal", 7, 305-310.
98. Nuyts-Petit V., Delacroix-Buchet A., Vassal L. (1997) – Influence de trois haplotypes des caséines α_{s1} , β et k fréquents en race bovine Normande sur la composition du lait et l'aptitude à la fabrication fromagère. "Lait", 77, 625-639.
99. Puhán Z., Jakob E. (1994) – Genetic variants of milk proteins and cheese yield. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.i. no. 9402, 111-122.
100. Mariani P., Summer A. (1999) – Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 50, 197-230.
101. Donnelly W.J., McNeill G.P., Buchheim W., McGann T.C.A. (1984) – A comprehensive study of the relationships between size and protein composition in natural bovine casein micelles. "Biochim. Biophys. Acta", 789, 136-143.

102. Morini D., Losi G., Castagnetti G.B., Benevelli M., Resmini P., Volontero G. (1975) – L'influenza delle varianti genetiche della k-caseina sulla dimensione delle micelle caseiniche. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 26, 437-444.
103. Losi G., Capella P., Castagnetti G.B., Grazia L., Zambonelli C., Mariani P., Russo V. (1973) – Influenza delle varianti genetiche della caseina k sulla formazione e sulle caratteristiche della cagliata. "Sci. Tecnol. Alim.", 3, 373-374.
104. Niki R., Arima S. (1984) – Effects of size of casein micelles on firmness of rennet curd. "Jpn. J. Zotech. Sci.", 55, 409-415.
105. Mariani P., Pecorari M. (1991) – Il ruolo delle varianti genetiche della k-caseina nella produzione del formaggio. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 42, 255-285.
106. Lodes A., Krause I., Buchberger J., Aumann J., Klostermeyer H. (1996) – The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. II. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. "Milchwissenschaft", 51, 543-548.
107. Rahali V., Ménard J.L. (1991) – Influence des variants génétiques de la β -lactoglobuline et de la k-caseine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. "Lait", 71, 275-297.
108. Horne D.S., Banks J.M., Muir D.D. (1997) – Genetic polymorphism of bovine k-casein: effects on renneting and cheese yield. "Proc. IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand", 162-171. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
109. Pabst K. (1998) – [The significance of different types of milk protein (particularly k-casein) for cheesemaking]. "Archiv. Für Tierzucht", 41, 269-276.
110. Hartung H., Gernand E. (1997) – [Investigation about cheese yielding capacity in relation to casein-polymorphism]. "Arch. für Tierzucht", 40, 305-308.
111. Walsh C.D., Guinee T.P., Harrington D., Mehra R., Murphy J., Fitzgerald R.J. (1998) – Cheesemaking, compositional and functional characteristics of low-moisture part-skim Mozzarella cheese from bovine milks containing k-casein AA, AB, or BB genetic variants. "J. Dairy Res.", 65, 307-315.
112. Mariani P., Zanzucchi G., Bonatti P., Fossa E., Pecorari M. (1992) – Caratteristiche di coagulazione del latte in rapporto al tipo genetico della β -caseina in vacche di razza Bruna. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 43, 7-17.
113. Lodes A., Buchberger J., Krause I., Klostermeyer H. (1997) – The influence of rare genetic variants of milk proteins on compositional properties of milk, rennetability, casein micelle size and content of non-glycosylated k-casein. "Proc. IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand", 158-161. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
114. Delacroix-Buchet A., Lefier D., Nuyts-Petit V. (1993) – Polymorphisme de la caséine k de trois races bovines françaises et aptitude à la coagulation. "Lait", 73, 61-72.
115. Jakob E. (1993) – [Relationships between genetic polymorphisms of milk proteins and the rennetability of milk]. "Thesis ETH", Eidgen. Techn. Hochschule, Zürich, no. 10224, XIII+220 pp.
116. Macheboeuf D., Coulon J.B., D'Hour P. (1993) – Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows' milk coagulation properties. "J. Dairy Res.", 60, 43-54.
117. Plowman J.E., Creamer L.K., Smith M.H., Hill J.P. (1997) – Restrained molecular dynamics investigation of the differences in association of chymosin to k-caseins A and C. "J. Dairy Res.", 64, 299-304.
118. Smith M.H., Hill J.P., Creamer L.K., Plowman J.H. (1997) – Towards understanding the variant effect on the rate of cleavage by chymosin on k-casein A and C. "Proc. IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand", 185-189. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
119. Creamer L.K., Plowman J.E., Liddell M.J., Smith M.H., Hill J.P. (1998) – Micelle stability: k-casein structure and function. "J. Dairy Sci.", 81, 3004-3012.
120. Law A.J.R., Leaver J., Banks J.M., Horne D.S. (1994) – The effect of k-casein genotype on the composition of whole casein. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.i. no. 9402, 134-141.
121. Mariani P., Sumner A., Anghinetti A., Senese C., Di Gregorio P., Rando A., Serventi P. (1995) – Effetti dell'allele α_{s1} -Cn G sulla ripartizione percentuale delle caseine α_{s1} , α_{s2} , β e k in vacche di razza Bruna. "Ind. Latte", 37(4), 3-13.
122. Corradini C., Battistotti B. (1973) – Indagine elettroforetica della progressiva idrolisi delle proteine durante la maturazione del formaggio Montasio. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 24, 11-22.
123. Delacroix-Buchet A., Marie C. (1994). Comparaison des variants A et C de la caséine β des laits de vaches Tarentaises en modèle fromager de type Beaufort. I. Aptitudes fromagères et rendements en frais. "Lait", 74, 343-360.
124. Creamer L.K. (1974) – Preparation of α_{s1} -casein A. "J. Dairy Sci", 57, 341-344.
125. Creamer L.K., Zoerb H.F., Olson N.F., Richardson T. (1982) – Surface hydrophobicity of α_{s1} -I, α_{s1} -casein A and B and its implications in cheese structure. "J. Dairy Sci.", 65, 902-906.
126. Coker C.J., Creamer L.K., Burr R.G., Hill J.P. (1997) – The action of chymosin or plasmin on α_{s1} -casein A, B and C. "Proc. IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand", 175-181. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
127. De Jong L. (1976) – Protein breakdown in soft cheese and its relations to consistency. I. Proteolysis and consistency of Noordhollandic Meshanger cheese. "Neth. Milk Dairy J.", 30, 242-253.
128. Resmini P., Saracchi S., Pazzaglia G., De Bernardi G. (1976) – Struttura primaria del primo peptide ad alta mobilità elettroforetica (α_{s1} -I) che si forma nella maturazione dei formaggi. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 27, 7-21.
129. Creamer L.K., Olson N.F. (1982) – Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. "J. Food Sci.", 47, 631-636, 646.
130. Anema S.G., Creamer L.K. (1993) – Effect of the A and B variants of both α_{s1} and k-casein on bovine casein micelle solvation and k-casein content. "J. Dairy Res.", 60, 505-516.
131. Mariani P., Artoni A. (1983) – Il latte ad acidità anomala. II. Composizione in caseina, fosforo e acido citrico. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 34, 33-49.
132. Mariani P., Sumner A., Formaggioli P., Fossa E. (1999) – Contenuti di caseina, fosforo e urea e proprietà di coagulazione di campioni di latte di massa di vacche di razza Frisona Italiana caratterizzati da bassa acidità titolabile. "Atti Soc. It. Sci. Vet.", 53, 411-412.
133. Mariani P., Bonatti P., Pecorari M. (1989) – Il latte ad acidità anomala. IV. Fosforo solubile, cloruri e tipi di latte ipoacido. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 40, 215-225.
134. Fontana P., Colagrande O., Corradini C. (1962) – Relations entre les constituants du lait anormal et leur influence dans la fabrication du fromage. Proc. "16th Int. Dairy Congr.", 4(2), 890-902.
135. Albonico F., Resmini P. (1964) – Ricerche sui latti ipoacidi di lenta coagulazione presamica prodotti nella bassa pianura Padana. "Il Latte", 38, 585-596 e 672-680.
136. Albonico F., Gianani L., Prati F., Saracchi S., Semenza S., Volontero G., Zanini A. (1965) – Ricerche sui latti ipoacidi di lenta coagulazione presamica prodotti nella pianura Padana. "Il Latte", 39, 831-843.
137. Corradini C. (1966) – Contributo allo studio della composizione chimica dei latti ipoacidi. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 17, 93-102.
138. Mariani P., Bonatti P. (1988) – Il latte ad acidità anomala. III. Osservazioni sulla composizione chimica dei latti ad elevata acidità titolabile. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 39, 43-48.
139. Calamari L., Pallavicini G., Foglia E., Bertoni G. (1983) – Ricerche su talune cause di variazione dell'acidità del latte bovino. Atti "Associazione Scientifica di Produzione Animale", 5, 179-185.
140. Flüeler O. (1977) – Beitrag zur Kenntnis der Labtraeageit von Milch. "Thesis ETH", Eidgen. Techn. Hochschule, Zürich, no. 6045, 115 pp.
141. Mariani P. (1994) – Il latte ad acidità anomala. V. Contenuto di fosforo, rapporto Ca/P e tempo di coagulazione del latte a bassa e ad elevata acidità titolabile. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 45, 15-26.
142. Zannetti G., Martelli P., Guazzetti S., Bonatti P., Mariani P. (1988) – Ulteriore contributo alla conoscenza della sindrome di non lavorabilità del latte: il latte ad elevata acidità. "Atti Soc. It. Buiatria", 20, 359-369.
143. Annibaldi S., Ferri G., Mora R. (1977) – Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: tipizzazione lattodinamografica. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 28, 115-126.
144. Tervala H.L., Antila V. (1985) – Milk with anomalous renneting properties. "Meijeritieteellinen Aikakauskirja", 43(1), 26-32.
145. Losi G., Castagnetti G.B., Morini D., Resmini P., Volontero G., Mariani P. (1982) – Il latte a coagulazione anomala: fattori chimici e chimico-fisici che condizionano il fenomeno. "Ind. Latte", 18(1), 13-33.
146. Mariani P., Russo V. (1976) – Ricerche sul contenuto di calcio e fosforo nel latte delle razze Frisona, Bruna Alpina, Reggiana, Modenese, "Riv. Zoot. Vet.", 4, 23-46.
147. Mariani P. (1985) – Osservazioni sul contenuto e la ripartizione dei principali costituenti del sistema micellare del latte in quattro razze bovine. "Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma", 5, 173-183.
148. Pecorari M., Sandri S., Mariani P. (1987) – Attitudine alla coagulazione dei latti delle razze Frisona, Bruna, Reggiana e Modenese. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 38, 376-384.
149. Patel R.S., Reuter H. (1986) – Effect of sodium, calcium and phosphate on properties of rennet coagulated milk. "Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie", 19, 288-291.
150. Lenoir J., Veisseyre R. (1987) – Coagulation du lait par la présure et correction des laits de fromagerie. In "Le Lait: Matière première de l'industrie laitière", 329-342 (CEPIL, INRA), Paris.
151. Gastaldi E., Pellegrini O., Lagaude A., Tarodo de la Fuente B. (1994) – Functions of added calcium in acid milk coagulation. "J. Food Sci.", 59, 310-312, 320.

152. Wolfschoon-Pombo A.F. (1997) – Influence of calcium chloride addition to milk on the cheese yield. "Int. Dairy Journal", 7, 249-254.
153. Bassalik-Chabielska Janota L. (1989) – Chloride in milk, metabolic disorders and susceptibility to mastitis. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.i. no. 8901, 130-137.
154. Nicpoń J., Hejlasz Z. (1985) – [Influence of experimental rumen acidosis on udder function and some physical and chemical parameters of milk in cattle]. "Dtsch. Tierärztl. Wschr.", 92, 275-278.
155. Mariani P., Sumner A., Zanzucchi G., Fossa E. (1998) – Variabilità tra allevamenti e rapporto tra i contenuti di cloruri e di fosforo in latti di massa di vacche di razza Frisona. "Atti Soc. It. Sci. Vet.", 52, 539-540.
156. Pearce K.N. (1978) – The inactivation of rennet by chlorinated water. "N. Z. J. Dairy Sci. Technol.", 13, 127-128.
157. Anema S.G. (1997) – The effect of chymosin on k-casein-coated polystyrene latex particles and bovine casein micelles. "Int. Dairy Journal", 7, 553-558.
158. Bringue N.A., Kinsella J.E. (1986) – Inhibition of chymosin and the coagulation of para-casein micelles by anions. "J. Dairy Sci.", 69, 965-970.
159. Cheeseman G.C. (1962) – Syneresis of milk and caseinate solutions. Proc. "16th Int. Dairy Congr.", 4(1), 465-472.
160. Zittle C.A. (1970) – Influence of phosphate and other factors on the rennin gel obtained with whole casein and with k-casein in the presence of calcium salts. "J. Dairy Sci.", 53, 1013-1017.
161. Grufferty M.B., Fox P.F. (1985) – Effect of added NaCl on some physicochemical properties of milk. "Irish J. Food Sci. Technol.", 9, 1-9.
162. McGann T.C.A., Pyne G.T. (1960) – The colloidal phosphate of milk. III. Nature of its association with casein. "J. Dairy Res.", 27, 403-417.
163. McGann T.C.A., Buchheim W., Kearney R.D., Richardson T. (1983) – Composition and ultrastructure of calcium phosphate-citrate complexes in bovine milk systems. "Biochim. Biophys. Acta", 760, 415-420.
164. van Dijk H.J.M. (1990) – The properties of casein micelles. I. The nature of the micellar calcium phosphate. "Neth. Milk Dairy J.", 44, 65-81.
165. Schmidt D.G. (1982) – Association of caseins and casein micelle structure. In "Development in Dairy Chemistry", vol. I, General Aspects. 61-86 (Ed. P. F. Fox). Applied Science Publ., London, UK.
166. McGann T.C.A., Kearney R.D., Buchheim W., Posner A.S., Betts F., Blumenthal N.C. (1983) – Amorphous calcium phosphate in casein micelles of bovine milk. "Calcif. Tissue Int.", 35, 821-823.
167. Rollema H.S. (1992) – Casein association and micelle formation. In "Advanced dairy chemistry", vol. I, 111-140 (Ed. P. F. Fox). Elsevier Applied Science, London, UK.
168. Aoki T., Kako Y., Imamura T. (1986) – Separation of casein aggregates cross-linked by colloidal calcium phosphate from bovine casein micelles by high performance gel chromatography in the presence of urea. "J. Dairy Res", 53, 53-59.
169. Holt C., Davies T., Law A.J.R. (1986) – Effects of colloidal calcium phosphate content and free calcium ion concentration in the milk serum on the dissociation of bovine casein micelles. "J. Dairy Res.", 53, 557-572.
170. van Hooydonk A.C.M., Hagedoorn H.G., Boerrigter I.J. (1986) – pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. I. Effect of acidification on physico-chemical properties. "Neth. Milk Dairy J.", 40, 281-296.
171. Holt C. (1994) – Effects of heating and cooling on milk salts and their interaction with casein. In "IDF Doc. 238. Heat-induced Changes in milk", 105-133. (Ed. P. F. Fox). International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
172. Singh H., Roberts M.S., Munro P.A., Tet Teo C. (1996) – Acid-induced dissociation of casein micelles in milk: effects of heat treatment. "J. Dairy Sci.", 79, 1340-1346.
173. Decelles G.A. Jr (1967) – Investigation of the caseinate-phosphate-calcium complexes as they exist naturally in milk. "Diss. Abstr., Sect. B", 28, 1295.
174. Holt C., Muir D.D. (1978) – Natural variations in the average size of bovine casein micelles. II. Milk samples from creamery bulk silos in south west Scotland. "J. Dairy Res.", 45, 347-353.
175. Mariani P. (1971) – Studio delle frazioni di azoto, fosforo, calcio e magnesio nel latte massale di bovine di razza Reggiana e Frisona. "Riv. Zoot.", 44, 246-274.
176. Mariani P. (1989) – Variazioni della caseina e delle frazioni colloidali di fosforo, calcio, magnesio e acido citrico nel latte bovino in rapporto alla stagione di produzione e al periodo della lattazione. "Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma", 8-9, 303-318.
177. Mariani P., Zanzucchi G., Sumner A. (1996) – Contenuto di fosfato di calcio colloidale e grado di mineralizzazione della caseina in campioni di latte di massa di allevamenti bovini di razza Frisona. "Ind. Latte", 32(3), 3-16.
178. Pyne G.T., McGann T.C.A. (1962) – The influence of the colloidal phosphate of milk on the rennet coagulation. Proc. "16th Int. Dairy Congr.", 4(1), 611-615.
179. Resmini P. (1972) – Caratteristiche del latte ed attitudine alla coagulazione in relazione alla produzione di formaggi a pasta cotta. "Sci. Tecnol. Alim.", 2, 383-384.
180. Green M.L., Hobbs D.G., Morant S.V., Hill V.A. (1978) – Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk. II. Process of gel assembly. "J. Dairy Res.", 45, 413-422.
181. Shalabi S.I., Fox P.F. (1982) – Influence of pH on the rennet coagulation of milk. "J. Dairy Res.", 49, 153-157.
182. Alais Ch. (1984) – Scienza del latte. Principi di tecnologia del latte e dei derivati. Ed. Tecniche Nuove, Milano.
183. van Hekken D.L., Strange E.D. (1994) – Rheological properties and microstructure of dephosphorylated whole casein rennet gels. "J. Dairy Sci.", 77, 907-916.
184. Martin B., Coulon J.B. (1995) – Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. I. Influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de troupeaux. "Lait", 75, 61-80.
185. Lucey J.A., Fox P.F. (1993) – Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. "J. Dairy Sci.", 76, 1714-1724.
186. Lawrence R.C., Gilles J. (1987) – Cheese composition and quality. In "Milk: the vital force", 111-121. Ed. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Netherlands.
187. Mariani P., Colajacomo A. (1971) – Caseificazione del latte di razza Reggiana e Frisona: aspetti tecnologici, resa e caratteristiche dei sieri e dei formaggi. "Riv. Zoot.", 44, 207-218.
188. Bottazzi V. (1967) – I latti mastitici nei riflessi lattiero-caseari. "Ind. Latte", 3, 76-85.
189. Waes G., van Belleghem M. (1969) – Influence de la mammité sur les propriétés technologiques du lait et sur la qualité des produits laitiers. "Le Lait", 49, 266-290.
190. Schultz L.H. (1976) – Mastitis-induced changes in milk composition. Proc. "15th Ann. Meet. Nat. Mastitis Council", Louisville (USA), 16-18 February 1976.
191. Kitchen B.J. (1981) – Bovine mastitis: milk composition changes and related diagnostic tests. "J. Dairy Res.", 48, 167-188.
192. Munro G.L., Grieve P.A., Kitchen B.J. (1984) – Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. "Aust. J. Dairy Technol.", 39(3), 7-16.
193. Redaelli G., Zeccoli A. (1985) – Influenza della mastite bovina sul latte destinato alla caseificazione. "Il Latte", 10, 42-44, 45-50.
194. Mitchell G.E., Fedrick I.A., Rogers S.A. (1986) – The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. II. Cheddar cheese made from farm bulk milk. "Aust. J. Dairy Technol.", 41(3), 12-18.
195. Pecorari M., Fossa E. (1978) – Turbe mammarie e caratteristiche qualitative dei latti destinati alla trasformazione in Parmigiano-Reggiano. Atti Tavola rotonda "Le turbe di secrezione mammaria ed il loro significato nei riflessi della caseificazione del latte", 51-58, Parma, 17 giugno 1978.
196. Kiermeier F., Keis K. (1964) – [The behaviour of milk in cheesemaking from cows affected by secretory disturbances]. "Milchwissenschaft", 19, 79-82.
197. Tallamy P.T., Randolph H.E., Dill C.W. (1969) – Influence of mastitis on properties of milk. I. Curd tension. "J. Dairy Sci.", 52, 980-983.
198. Butkus K.D., Butkene V.P., Potsyute R. Yu. (1973) – [Properties of milk coagulum during subclinical mastitis]. "Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya", 9, 473-477.
199. Annibaldi S., Berliani G., Menozzi P., Pecorari M. (1974) – Osservazioni sull'influenza del tasso cellulare del latte sulla caseificazione. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 25, 245-260.
200. Annibaldi S., Guidetti R., Mora R., Pecorari M. (1975) – Nota sulla caseificazione del latte di bovine affette da mastiti subcliniche con diversa eziologia. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 26, 13-25.
201. Ruffo G., Carini S., Maffeo G., Lodi R., Fedeli E. (1975) – Osservazioni sulla caseificabilità del latte normale e patologico (Mastiti bovine e disordini secretori). "Ind. Latte", 11(1), 19-40.
202. Annibaldi S., Guidetti R., Menozzi P. (1976) – Osservazioni sulla coagulazione presamica del latte dei diversi quartieri mammari. "Ind. Latte", 12(3-4), 33-47.
203. Ritcher R.L. (1976) – The effect of mastitis on the processing properties of milk. Proc. "15th Ann. Meet. Nat. Mastitis Council", Louisville (USA), 16-18 February 1976.
204. Ali A.E., Andrews A.T., Cheeseman G.C. (1980) – Influence of elevated somatic cell count on casein distribution and cheesemaking. "J. Dairy Res.", 47, 393-400.
205. Politis I., Ng-Kwai-Hang K.F. (1988) – Effects of somatic cell counts and milk composition on the coagulating properties of milk. "J. Dairy Sci.", 71, 1740-1746.
206. Rogers S.A., Mitchell G.E. (1994) – The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. VI. Cheddar cheese and skim milk yoghurt. "Aust. J. Dairy Technol.", 49(11), 70-74.
207. Politis I., Ng-Kwai-Hang K.F. (1988) – Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese-making efficiency. "J. Dairy Sci.", 71, 1711-1719.
208. Murphy S.C., Cranker K., Senyk G.F., Barbano D.M., Saeman A.I., Galton D.M. (1989) – Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. "J. Dairy Sci.", 72, 620-626.

209. Barbano D.M., Rasmussen R.R., Lynch J.M. (1991) – Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. "J. Dairy Sci.", 74, 369-388.
210. Barbano D.M. (1994) – Overview. Influence of mastitis on cheese yield. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.i. no. 9402, 48-54.
211. Olson N.F. (1977) – Factors affecting cheese yields. "Dairy Industries Int.", 42(4), 14-15, 19.
212. Leavitt B.E., O'Leary J., Harmon R.J., Hicks C.L. (1982) – Effect of mastitis on cheese yield, milk production, milk composition and starter culture activity. "J. Food Protection", 45, 1176.
213. Politis I., Ng-Kwai-Hang K.F. (1988) – Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. "J. Dairy Sci.", 71, 1720-1727.
214. Annibaldi S. (1978) – Le turbe di secrezione mammaria ed il loro significato nei riflessi della caseificazione del latte. Atti Tavola rotonda "Le turbe di secrezione mammaria ed il loro significato nei riflessi della caseificazione del latte", 59-63, Parma, 17 giugno 1978.
215. Pecorari M. (1984) – La mastite bovina e sua influenza nella tecnologia del formaggio grana. "Obiettivi Doc. Vet.", 5(6), 35-38.
216. Sandri S. (1999) – Dati non pubblicati.
217. Barry J.G., Donnelly W.J. (1981) – Casein compositional studies. II. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milk. "J. Dairy Res.", 48, 437-446.
218. Schaar J. (1985) – Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milks. "J. Dairy Res.", 52, 369-378.
219. Verdi R.J., Barbano D.M., Dellavalle M.E., Senyk G.F. (1987) – Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell count milks. "J. Dairy Sci.", 70, 230-242.
220. Saeman A.I., Verdi R.J., Galton D.M., Barbano D.M. (1988) – Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. "J. Dairy Sci.", 71, 505-512.
221. Verdi R.J., Barbano D.M. (1991) – Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. "J. Dairy Sci.", 74, 772-782.
222. Zachos T., Politis I., Gorewit R.C., Barbano D.M. (1992) – Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells. "J. Dairy Res.", 59, 461-467.
223. Benfeldt C., Sørensen J., Ellegård K.H., Petersen T.E. (1997) – Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. "Int. Dairy Journal", 7, 723-731.
224. Kennedy A., Kelly A.L. (1997) – The influence of somatic cell count on the heat stability of bovine milk plasmin activity. "Int. Dairy Journal", 7, 717-721.
225. Beaudry C., Robitaille G., Lacasse P. (1998) – Proteolytic activity in endotoxin-induced mastitic milk. "J. Dairy Sci.", 81(suppl.1), 40 (Abstr.).
226. Bottazzi V. (1971) – Sui fenomeni di agglutinazione nella preparazione del latte per il formaggio grana. Atti "Giornate Studio Problemi Lattiero-caseari", 197-205, Ente Aut. Mostra Cons. Alim., Parma, 28 aprile-2 maggio 1971.
227. Bottazzi V. (1976) – Particolari aspetti della produzione del formaggio grana. I parte. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 27, 239-260.
228. Cabrini A., Carini S. (1982) – Tecnologia del grana. I. La sosta in bacinella. "Ind. Latte", 13(3-4), 3-23.
229. Ma Y., Barbano D.M. (2000) – Gravity separation of raw bovine milk: fat globule size distribution and fat content of milk fractions. "J. Dairy Sci.", 83, 1719-1727.
230. Bottazzi V., Battistotti B., Bertozzi L. (1995) – La qualità del latte crudo per la produzione di formaggi duri a lunga stagionatura. Workshop "La certificazione dei prodotti alimentari: il caso del latte", 289-308, (Ed. G. Piva & G. Enne), Il Mulino, Bologna.
231. Zacconi C., Bottazzi V. (1982) – Anticorpi ed aggregazione dei globuli di grasso del latte. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 33, 7-14.
232. Salvadori Del Prato O. (1998) – Trattato di Tecnologia Casearia. Ed. Edagricole, Bologna.
233. Bertoni G., Cappa V., Speroni A. (1979) – Indagine preliminare sui fattori zootecnici implicati nella produzione di latte a bassa capacità di affioramento. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 30, 343-356.
234. Calamari L., Mariani P. (1998) – Effects of the hot environment conditions on the main milk cheesemaking properties. "Zoot. Nutr. Anim.", 24, 259-271.
235. Bottazzi V., Dellaglio F., Montescani G. (1968) – Affioramento del grasso ed agglutinazione dei microrganismi. I. Valutazione delle capacità di affioramento del latte. Concentrazione e purificazione delle globuline. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 19, 391-410.
236. Mariani P. (1971) – Ulteriori osservazioni sul latte di razza Reggiana e Frisona in relazione alla produzione di formaggio Parmigiano-Reggiano. "Riv. Zoot.", 44, 360-375.
237. Bottazzi V., Dellaglio F., Montescani G. (1969) – Affioramento del grasso ed agglutinazione dei microrganismi. II. Affioramento del grasso in rapporto alle caratteristiche dei singoli lattici ed alla loro mescolanza. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 20, 219-244.
238. Battistotti B., Premi L., Bottazzi V., Clari L. (1970) – Caratteristiche microbio-logiche del latte impiegato nella produzione del formaggio grana. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 21, 379-401.
239. Zannoni M., Nanni M., Mora R. (1984) – Influenza di diverse modalità di affioramento sulle caratteristiche casearie del latte e del formaggio Parmigiano-Reggiano. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 35, 541-556.
240. Bottazzi V. (1964) – Gli effetti del trattamento con centrifuga titolatrice-pulitrice sulla caseificazione a formaggio grana. "Il Latte", 38, 207-209.
241. Zannoni M., Nanni M. (1982) – Indagine sull'affioramento del grasso del latte in caseificio. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 33, 493-506.
242. Bagni A., Chiavari C., Castagnetti G.B., Grazia L., Losi G. (1987) – Ulteriori osservazioni sugli effetti esercitati dal raffreddamento della camera del latte nella tecnologia del Parmigiano-Reggiano. "Il Latte", 12, 1017-1025.
243. Rossi J. (1964) – Sul processo di caseificazione del formaggio grana. II. Sosta del latte in bacinella e distribuzione dei microrganismi. "Il Latte", 38, 301-305.
244. Tedeschi G., Tosi F., Pecorari M. (1993) – La tecnologia di caseificazione del Parmigiano-Reggiano: variabilità e rilievi analitici su latte, cagliata e siero. "Sci. Tecn. Latt.-cas.", 44, 327-343.
245. Pecorari M. (1994) – Parmigiano-Reggiano, innovazione e tipicità. "Alimentaria" (suppl. Inf. Zoot., 41(6), 1994), n.1, 20-26.
246. DPR n.54 del 14-1-1997, Regolamento recante attuazione delle direttive 92/46 e 92/47/CEE in materia di produzione e immissione sul mercato di latte e di prodotti a base di latte. Pubbl. G. U. n. 59 del 12-3-1997.
247. Maggi E., Bentley S. (1999) – L'igiene nella filiera lattiero-casearia tra tradizione e innovazione. Atti workshop "L'industria lattiero-casearia tra microfobia e nuova cultura microbiologica", 1-14, Correggio (RE), 24 aprile 1999.

LIVELLI ED EVOLUZIONE DI CADMIO, MERCURIO ED ARSENICO NEI PESCI DELL'ALTO ADRIATICO

LEVELS AND EVOLUTION OF CADMIUM, MERCURY AND ARSENIC IN FISH OF NORTHERN ADRIATIC SEA

S. Ghidini - G. Delbono - G. Campanini

Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti

Premessa

La contaminazione dell'ambiente marino, in modo particolare quella da metalli pesanti, costituisce uno dei maggiori problemi di tossicologia ambientale. Alcuni elementi, infatti, a causa delle loro caratteristiche, possono ritrovarsi a concentrazioni tossiche negli organismi marini. La qualità igienico-sanitaria dei prodotti della pesca desta preoccupazione per quei metalli e per quelle specie particolarmente soggetti ai fenomeni della biomagnificazione lungo la catena trofica o della bioconcentrazione attraverso le acque (Thibaud, 1992; Orlando, 1989). Oltre al piombo, conosciuto per la sua tossicità da tempo memorabile, altri elementi assumono particolare interesse: il mercurio, oggetto da qualche decennio di interesse legislativo-ispettivo, il cadmio e l'arsenico, più recentemente indagati per la potenziale pericolosità dei livelli ambientali e per la loro incidenza sulla dieta (Burgat-Sacaze, 1996; Campanini, 1998). Il Mar Adriatico, presenta una fauna ittica piuttosto particolare che alimenta una vasta attività di pesca. L'importanza che riveste quest'area marina, deriva dall'elevata pescosità associata al limitato scambio idrico ed alla presenza di contaminazione ambientale. La diffusa presenza di elementi in tracce tossici è da imputare all'inquinamento naturale da mercurio sulla costa settentrionale, agli scarichi industriali dell'area della Laguna di Venezia ed al carico di inquinanti veicolati dal fiume Po.

Cadmio

Il cadmio, pur essendo un elemento ubiquitario sulla crosta terrestre, è presente normalmente in bassissime quantità ed accompagna come impurezza altri metalli, soprattutto lo zinco. Nonostante ciò il ciclo biogeochimico dell'elemento e gli equilibri nei diversi ecosistemi sono fragili: deboli variazioni dei flussi possono avere ripercussioni importanti come il possibile trasferimento dell'inquinamento nelle derrate di origine vegetale e animale (McLaughlin, 1999). La presenza ambientale del metallo è andata progressivamente aumentando negli ultimi anni in conseguenza delle sue svariate applicazioni. La contaminazione ambientale da cadmio deriva principalmente dagli scarichi dell'industria dello zinco e della galvanoplastica, dagli scarichi delle industrie delle vernici e smalti, dagli inceneritori dei rifiuti e dall'impiego dei concimi fosfatici spesso contaminati da cadmio. L'impiego nell'industria della plastica, nella produzione di leghe, di coloranti e di batterie accresce la possibile contaminazione globale. L'uomo è esposto al cadmio presente negli alimenti, nell'acqua, nell'aria e nelle polveri. Negli ultimi tempi numerose ricerche hanno attestato un aumento progressivo del carico di cadmio nell'organismo umano e si pensa che questa evoluzione derivi dall'inquinamento dell'aria, dalla contaminazione degli alimenti, dal fumo di sigaretta e dalla proprietà dell'elemento di accumularsi nei tessuti animali (Burgat-Sacaze, 1996). Il cadmio, assente alla nascita, si accumula nella corteccia renale, dove la concentrazione aumenta con l'età in funzione degli apporti, principalmente alimentari. Il cadmio presenta la caratteristica di essere facilmente assorbibile e difficilmente eliminabile dall'organismo (Reilly, 1991). L'eccessivo accumulo di Cd è associato a vari effetti tossici come nefropatia, osteomalacia, acidosi e rischi di azione mutagenica e teratogena (Friberg, 1986). La biodisponibilità dell'elemento dipende dalla composizione della dieta, come dal livello di Zn, e dalle molecole cui si trova associato (Groten e van Bladeren, 1994). Il dibattito scientifico è attualmente indirizzato a studiare gli effetti cronici dell'esposizione per lunghi periodi ai bassi livelli di Cd nella dieta (Nordberg, 1996). La catena alimentare acquatica ha un impatto limitato per il consumatore, salvo casi particolari e abitudini alimentari speciali (Louekari e Salminen, 1986). Nell'ambiente acquatico il cadmio dell'acqua e dei sedimenti viene trasferito e si concentra specialmente nel fitoplancton, nelle macrofite e di conseguenza nei crostacei e nei molluschi. Gli invertebrati marini presentano un fattore di concentrazione rispetto all'acqua da 300 fino a 10000 volte (Cossa e Lassus, 1989). Nei pesci i fattori di accumulo sono più bassi ed il cadmio si concentra specialmente nel rene, mentre le parti muscolari sono generalmente poco contaminate dall'elemento (da 200 fino a 700 volte rispetto all'acqua). Bisogna però sottolineare che il destino del cadmio è differente da quello del mercurio. Il bioaccumulo del cadmio è selettivo: ci sono delle "trappole intermedie" come i vegetali ed i molluschi. Si ha quindi bioaccumulo del metallo senza biomagnificazione.

Mercurio

Il mercurio è un metallo la cui presenza nell'ambiente è sia di origine naturale che antropica. L'erosione naturale della crosta terrestre e l'attività vulcanica liberano la parte più considerevole di Hg. Il Mar Mediterraneo è al centro di un'area sede del 65% delle riserve mondiali dell'elemento (Savi, 1995). Tra le fonti antropiche si ricordano gli inceneritori, le fonderie, gli impianti di combustione di carbone ed alcuni settori produttivi. Gli effluenti potenzialmente più pericolosi sono quelli dell'industria cartiera e degli impianti cloro-soda e negli ultimi decenni si è cercato di limitare la contaminazione consentendo la lavorazione soltanto a ciclo chiuso. Negli ultimi decenni l'utilizzo industriale del mercurio, a causa della contaminazione della catena alimentare, è stato notevolmente ridotto, ad esempio nelle apparecchiature elettriche, nelle batterie, negli amalgami dentari e per gli usi farmaceutici. Sono stati, invece, completamente banditi gli utilizzi agricoli del metallo. La sua presenza nell'ambiente, tuttavia, è stazionaria per l'alta persistenza nelle precipitazioni atmosferiche e nei sedimenti marini. È stato calcolato che il 5% del mercurio apportato annualmente nel Mediterraneo si ritrova nel pesce (Cossa, 1995). Il mercurio nell'ambiente marino, per opera di microrganismi, subisce la trasformazione in composti organici, come il metilmercurio. La metilazione avviene negli strati superiori dei sedimenti e dipende da pH, ossigeno e temperature

elevate. Il metilmercurio entra nella catena alimentare attraverso il plancton, gli invertebrati, i pesci fino ai grandi predatori che manifestano le concentrazioni maggiori perché questo composto è eliminato con difficoltà dall'organismo. Le ragioni di ciò sono innanzitutto che le molecole di mercurio metilato penetrano senza difficoltà attraverso le membrane biologiche grazie alle piccole dimensioni ed alla loro lipofilia. All'interno delle cellule queste molecole subiscono delle trasformazioni che danno luogo a nuove specie chimiche che si fissano sugli aminoacidi e le proteine. La combinazione della lipofilia delle specie di mercurio presenti nel mezzo acquatico esterno e l'idrofilia delle specie di Hg intracellulare provoca l'intenso bioaccumulo: le prime provocano la penetrazione, le seconde la ritenzione. Il mercurio organico, inizialmente accumulato nei globuli rossi, ha invece la capacità di attraversare le membrane biologiche, come quella placentare e quella ematoencefalica, causando avvelenamento prenatale e gravi ed irreversibili disturbi al sistema nervoso centrale (Reilly, 1991). Il mercurio inorganico invece viene in gran parte trattenuto a livelli della membrana cellulare. Questa discriminazione è presente nei vegetali acquatici ed è stata ritrovata a tutti i livelli della catena alimentare.

Hg viene accumulato principalmente in fegato e rene. L'accumulo di Hg e dei suoi composti nel rene causa gravi patologie (Hugunin e Bradley, 1975).

Il problema dell'intossicazione da Hg ha interessato l'igiene alimentare in seguito a ripetuti episodi epidemici verificatisi negli ultimi 40 anni e le autorità sanitarie hanno promosso una serie di misure precauzionali (Harada, 1995); la legislazione italiana, in attuazione di una direttiva comunitaria (Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea, 1991), fissa un livello massimo di 0,5 mg/kg nelle parti commestibili dei prodotti della pesca, tranne che per le specie predatrici dove il livello massimo tollerato è di 1 mg/kg (Gazzetta Ufficiale Italiana, 1994). Il Comitato congiunto FAO-WHO ha stabilito un limite provvisorio tollerabile di assunzione settimanale, sia per il mercurio totale (0,3 mg per un adulto di 60 Kg) sia per il metilmercurio (0,2 mg). L'apporto prevalente di Hg è fornito dagli alimenti, in particolare quelli ittici (Baldini et al., 1994). I consumi di prodotti della pesca sono tuttavia molto variabili (da 140 g/settimana a 2 Kg), così come le concentrazioni rilevate nei vari campionamenti, a seconda della località e delle specie. I pesci predatori presentano i livelli più elevati perché il mercurio si accumula lungo la catena trofica. La concentrazione di Hg aumenta, inoltre, con l'età, con il peso, con la superficie corporea ed è l'unico metallo con queste caratteristiche. Le specie ittiche eliminano molto lentamente il mercurio assorbito. I tempi di dimezzamento del metilmercurio, se gli organismi marini esposti vengono spostati in aree non contaminate, vanno da 6 mesi per i mitili a 2 anni per il luccio (Majori et al., 1967). L'accumulo nei pesci è maggiore nel tessuto muscolare rispetto a quello adiposo e circa il 90% del mercurio presente nei pesci si trova sotto forma di metilmercurio (Guandalini e Mantovani, 1988).

I pesci del Mediterraneo rispetto a quelli dell'Atlantico manifestano i livelli più elevati. Questo è stato spiegato con la presenza di formazioni geologiche ricche di Hg. In alcune aree marine mediterranee inoltre, le particolari condizioni di scarso ricambio di ossigeno e di pH determinano produzioni di metilmercurio, che sono la principale sorgente di contaminazione dei pesci d'altura. Gli scarichi antropici e le acque dei fiumi dei territori con componenti geologiche metallifere, tuttavia sono una sorgente importante di contaminazione dei prodotti ittici nella vicinanza dalle coste, anche se l'immissione di Hg interessa alcune zone ed il raggio di diffusione è di pochi Km (Cinquina et al., 1995).

Arsenico

L'arsenico, sebbene sia a rigore un non metallo, viene normalmente elencato in molti studi insieme ai metalli pesanti. L'elemento è comunemente conosciuto per le sue proprietà tossiche, ma ha mostrato avere azioni benefiche in quantità molto piccole negli animali da laboratorio. Il suo ruolo fisiologico non è stato chiaramente definito, ma alcune ricerche lo indicano come importante nel metabolismo della metionina (Uthus, 1994). E' abbondantemente presente nella crosta terrestre: si trova nei suoli, nelle acque ed in quasi tutti i tessuti animali e vegetali. La sua distribuzione ambientale deriva sia da processi naturali (erosione e degradazione dei suoli e dei minerali, attività vulcaniche, rocce sedimentarie marine) sia da fenomeni di contaminazione in seguito alle attività di estrazione mineraria. Inoltre in passato l'arsenico ha avuto impieghi come erbicida, fungicida, insetticida e rodenticida. Gli arsenicali fortunatamente sono stati banditi, perciò si assiste ad un decremento della contaminazione, anche se l'elemento è molto persistente nell'ambiente. Nel suolo e nelle acque i composti di arsenico subiscono processi di ossidazione, riduzione, metilazione e demetilazione. Nell'ecosistema marino la metilazione e la demetilazione sono influenzate dalle caratteristiche chimico-fisiche delle acque. Il risultato è la formazione di composti metilati di diverso potenziale tossico che possono venire assunti dalle varie specie marine e quindi raggiungere le tavole dei consumatori (Reilly, 1991). La fauna acquatica ha la capacità di accumulare l'arsenico ma, fortunatamente, in pochi casi si ha biomagnificazione ai vari livelli della catena trofica. I prodotti ittici maggiormente contaminati sono crostacei e molluschi mentre solitamente la contaminazione del pesce è minore (Edmonds, 1977). Per questi ultimi si possono distinguere due gruppi: i pesci piatti con tenori più elevati ed una grande variabilità e gli altri pesci con tenori 10-20 volte inferiori (Michel, 1987). Questa variabilità è da attribuire alla differente alimentazione: i policheti che costituiscono una parte importante dell'alimentazione dei pesci piatti presentano livelli di As molto variabili.

Alcune ricerche indicano che il maggior fattore che contribuisce alle assunzioni di As con la dieta è la categoria dei prodotti ittici (Dabeka et al., 1993)

Negli organismi marini percentuali variabili tra il 90 ed il 99% del As totale sono costituite da As in forma organica, principalmente arsenobetaina, che non venendo assunto dal tratto intestinale dell'uomo è da considerare di scarso interesse tossicologico (Mohri et al., 1990; Flanjak, 1982). L'arsenico inorganico viene assorbito e rapidamente convertito in acido monometilarsenico e dimetilarsenico. La biometilazione può essere considerata una detossificazione perché i composti metilati dell'arsenico sono meno tossici e rapidamente eliminati dall'organismo. L'ingestione di grandi quantità di As inorganico provoca manifestazioni tossiche rilevanti. L'intossicazione acuta è caratterizzata da sintomi intestinali, cardiovascolari e neurologici (Campanini, 1998). L'intossicazione cronica è stata osservata perfino con dosi bassissime per molti anni ed è associata ad effetti dermatologici, neurologici e vascolari. Dopo alcuni anni di esposizione As provoca cancro della pelle e del polmone ed altre forme di neoplasie maligne (Benramdane et al., 1998). L'assunzione di As determina aumento della permeabilità capillare. L'elemento si accumula nei leucociti dove determina riduzione delle attività enzimatiche per blocco dei gruppi tiolici ed agisce da disaccoppiante della fosforilazione

ossidativa riducendo la produzione di ATP (Sqibb e Fowler, 1983).

Finalità della ricerca

In questa ricerca vengono messi a confronto i livelli di mercurio, cadmio e arsenico rilevati nell'ultimo decennio in pesci provenienti dall'Alto Adriatico. Queste analisi sono state condotte nell'ambito di un più vasto progetto di campionamento dei prodotti ittici che prevede la determinazione di 10 elementi, sulle diverse categorie di pescato. Prendiamo qui in considerazione la categoria dei pesci con le specie che dalle varie località di pesca dell'Alto Adriatico raggiungono le tavole dei consumatori, attraverso i tradizionali canali commerciali. L'obiettivo è anche quello di indagare la distribuzione dei metalli tossici in funzione delle categorie tassonomiche, del livello trofico e delle abitudini di vita dei pesci.

Materiali e metodi

Campionamento

I campioni di pesce di interesse alimentare sono stati prelevati direttamente presso i pescatori, oppure sono stati acquistati presso mercati ittici o pescherie commerciali in varie annate dal 1987 al 1999. Il campionamento ha riguardato diverse località dell'Alto Adriatico, come riportato in Tabella 1. Gli esemplari di pesce sono stati classificati, catalogati e, dopo la misura di peso e lunghezza, conservati a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ANNO	LOCALITA'	N. CAMPIONI
1987	Trieste	18
1987	Grado	5
1987	Caorle	13
1987	Venezia	88
1987	Chioggia	5
1987	Goro	7
1987	Totale	136
1988	Trieste	44
1988	Totale	44
1994	Caorle	2
1994	Venezia	7
1994	Porto Garibaldi	5
1994	Totale	14
1999	Caorle	61
1999	Goro	6
1999	Comacchio	28
1999	Porto Garibaldi	26
1999	Totale	121
Totale complessivo		315

Tabella 1 - Campionamento

Preparazione dei campioni ed analisi

Per i pesci di piccole dimensioni, che normalmente si consumano interi si sono costituiti dei pool, mentre tutti gli altri campioni sono derivati dalla parte muscolare di esemplari singoli. La parte edibile è stata macinata ed omogeneizzata ed un'aliquota è stata sottoposta ad essiccamento. Dopo la polverizzazione in mortaio, circa 0,3 g del campione essiccato sono stati mineralizzati per via umida, con l'aggiunta di 3 ml di acido nitrico e 0,5 ml di acqua ossigenata, tramite sistema a microonde in pressione. Il campione mineralizzato è stato portato al volume di 10 ml con acqua bidistillata e conservato in provette di vetro.

Per la determinazione analitica è stata utilizzata la tecnica della Spettrofotometria di Assorbimento Atomico, con sistema di atomizzazione elettrotermica per il cadmio, a vapori freddi per il mercurio e ad idruri per l'arsenico.

Analisi dei dati

I risultati delle analisi dei campioni delle diverse annate sono stati messi a confronto per specie nei loro valori medi. Per l'ultimo campionamento è stata effettuata una elaborazione statistica tramite programma SPSS 9.0.1 per evidenziare differenze tra gruppi tramite analisi della varianza e test post hoc di Scheffé.

Risultati

Dei risultati vengono presentate le medie e deviazioni standard distinguendo secondo specie, località ed anno. I dati sono raggruppati secondo l'ordine tassonomico. I dati relativi ad alcuni campioni degli anni 1987 e 1988 sono stati pubblicati precedentemente (Sigovini et al., 1988) e vengono riportati per il confronto temporale.

La Tabella 2 contiene i dati relativi ai pesci degli ordini degli Anguilliformi e dei Beloniformi, organismi con la caratteristica di essere prevalentemente predatori di pesci. Si osserva che i livelli di Hg sono piuttosto alti nelle aguglie (individui pelagici) campionate nel decennio scorso e che i livelli più bassi sono quelli relativi alle anguille, in particolare quelle dei campionamenti più recenti. Il modesto tenore di As nelle anguille raccolte nel 1999 è probabilmente da imputare al fatto che gli individui, di taglia inferiore, hanno vissuto in acque salmastre. Nei gronghi l'arsenico si presenta con concentrazioni particolarmente elevate.

Specie	Anno	Località	N.	Taglia cm	Cd	Hg	As
					Media±dev.st	Media±dev.st	Media±dev.st
Grongo	1999	Porto Garibaldi	1	77	0,046	0,129	10,33
Grongo	1999	Caorle	1	90	0,053	0,135	17,67
Anguilla	1987	Venezia	8	44-55	0,013 ± 0,006	0,182 ± 0,114	10,03 ± 3,84
Anguilla	1987	Goro	2	36-39	0,031 ± 0,009	0,038 ± 0,007	5,90 ± 1,41
Anguilla	1999	Goro	2	36-41	0,051 ± 0,005	0,099 ± 0,016	0,18 ± 0,04
Anguilla	1999	Comacchio	5	33-38	0,028 ± 0,008	0,032 ± 0,015	0,51 ± 0,20
Aguglia	1987	Venezia	1	58	0,015	0,470	7,69
Aguglia	1988	Trieste	3	38-39	0,016 ± 0,001	0,365 ± 0,222	2,21 ± 0,49

Tabella 2 - Concentrazioni degli elementi in mg/kg negli Anguilliformi e nei Beloniformi.

Nella Tabella 3 che raggruppa i Clupeiformi, pesci che vivono in mare aperto e si nutrono prevalentemente di organismi planctonici, si osserva che i livelli di Cd, relativamente alti, sono in aumento negli esemplari del 1999 mentre quelli di Hg sono nel complesso stazionari. Le concentrazioni di As in questi pesci presentano scarsa variabilità.

Specie	Anno	Località	N.	Taglia cm	Cd	Hg	As
					Media±dev.st	Media±dev.st	Media±dev.st
Sardina	1987	Caorle	3	18-19	0,072 ± 0,059	0,136 ± 0,046	5,75 ± 4,32
Sardina	1987	Venezia	1	19	0,022	0,091	4,46
Sardina	1987	Chioggia	2	18	0,036 ± 0,011	0,114 ± 0,057	2,88 ± 0,11
Sardina	1988	Trieste	8	17-20	0,022 ± 0,008	0,242 ± 0,051	3,96 ± 0,67
Sardina	1994	Porto Garibaldi	5	17-20	0,060 ± 0,012	0,139 ± 0,030	1,27 ± 0,63
Sardina	1999	Caorle	5	16-19	0,078 ± 0,014	0,128 ± 0,056	2,33 ± 0,47
Sardina	1999	Comacchio	4	13-16	0,072 ± 0,011	0,056 ± 0,032	3,33 ± 0,49
Alice	1987	Caorle	2	12-13	0,021 ± 0,002	0,087 ± 0,011	2,40 ± 0,42
Alice	1987	Chioggia	3	12-13	0,040 ± 0,010	0,072 ± 0,018	2,37 ± 0,64
Alice	1988	Trieste	1	13	0,015	0,118	7,73
Alice	1994	Venezia	5	11-15	0,072 ± 0,023	0,217 ± 0,110	2,61 ± 0,74
Alice	1999	Caorle	5	11-15	0,066 ± 0,018	0,117 ± 0,049	2,78 ± 0,32
Alice	1999	Comacchio	5	11-14	0,073 ± 0,026	0,080 ± 0,041	1,74 ± 0,16
Papalina	1988	Trieste	1	16	0,020	0,192	4,05
Papalina	1999	Comacchio	4	20-24	0,081 ± 0,011	0,074 ± 0,005	3,69 ± 0,52

Tabella 3 - Concentrazioni degli elementi in mg/kg nei Clupeiformi.

Il vasto ordine dei Perciformi raggruppa specie con habitat e abitudini alimentari molto diverse. Per questo i campioni sono stati suddivisi secondo le abitudini di vita ed alimentari. Nella Tabella 4 sono comprese le specie bentoniche che vivono anche in acque salmastre e che hanno la caratteristica di essere piscivore; viene compreso anche il nono dell'ordine dei Ciprinodontiformi. Possiamo constatare che il cadmio, pur essendo a livelli contenuti, nel campionamento del 1999 è aumentato; ciò è evidente comparando i valori riscontrati per i cefali raccolti nelle stesse località in annate diverse. Il mercurio nei campioni di Trieste del decennio scorso è decisamente alto. L'arsenico in alcuni individui è al di sotto di 1 mg/kg. Probabilmente questo è dovuto alla loro permanenza in acque dolci.

Specie	Anno	Località	N.	Taglia cm	Cd Media±dev.st	Hg Media±dev.st	As Media±dev.st
Nono	1987	Venezia	7	3-5	0,025 ± 0,012	0,119 ± 0,024	6,54 ± 2,33
Latterino	1987	Venezia	13	7-9	0,023 ± 0,024	0,197 ± 0,098	6,89 ± 4,44
Latterino	1988	Trieste	4	7-9	0,015 ± 0,004	0,454 ± 0,084	1,98 ± 0,23
Latterino	1999	Porto Garibaldi	3	5-7	0,107 ± 0,023	0,029 ± 0,009	0,62 ± 0,06
Cefalo verzelata	1987	Caorle	1	21	0,028	0,047	1,50
Cefalo verzelata	1987	Venezia	5	18-23	0,013 ± 0,007	0,077 ± 0,023	6,78 ± 2,41
Cefalo calamita	1987	Venezia	2	26-31	0,012 ± 0,009	0,136 ± 0,026	5,70 ± 0,85
Cefalo	1987	Caorle	1	25	0,018	0,043	1,30
Cefalo	1987	Venezia	7	16-21	0,017 ± 0,013	0,068 ± 0,032	7,56 ± 3,34
Cefalo	1988	Trieste	1	31	0,013	0,094	2,02
Cefalo	1999	Caorle	5	21-27	0,049 ± 0,007	0,075 ± 0,030	0,35 ± 0,11
Cefalo	1999	Comacchio	2	38-45	0,074 ± 0,007	0,074 ± 0,029	0,62 ± 0,18
Branzino	1988	Trieste	1	29	0,019	0,102	0,91
Branzino	1999	Comacchio	2	33-34	0,043 ± 0,003	0,041 ± 0,000	1,17 ± 0,25
Orata	1988	Trieste	1	21	0,012	0,208	14,10
Mormora	1987	Trieste	3	19-21	0,021 ± 0,001	0,067 ± 0,037	2,42 ± 1,00
Mormora	1987	Grado	1	18	0,014	0,071	2,60
Mormora	1987	Venezia	3	18-19	0,020 ± 0,011	0,146 ± 0,033	5,68 ± 1,42
Mormora	1988	Trieste	4	21-23	0,014 ± 0,002	0,263 ± 0,085	5,49 ± 0,380
Mormora	1999	Caorle	5	19-22	0,047 ± 0,006	0,119 ± 0,083	0,59 ± 0,38

Tabella 4 - Concentrazioni degli elementi in mg/kg nei pesci bentonici degli ambienti salmastri (ordine dei Ciprinodontiformi e dei Perciformi). Si ricorda che il latterino è stato utilizzato intero

Nella Tabella 5 sono raggruppati i Perciformi bentonici con abitudini alimentari onnivore (crostacei, molluschi, vermi). Sono comprese specie che vivono nei fondi sabbiosi a pochi metri di profondità come sparaglioni, rossetti e ombrine, specie che vivono più in profondità nelle praterie di posidonie, come menole, tordo di mare e pagelli e specie che vivono sui fondi fangosi a profondità elevate come le triglie di fango. Il mercurio, in generale stazionario nel confronto temporale, è decisamente in concentrazioni più elevate negli sparaglioni. L'arsenico ed il cadmio hanno tenori variabili e talvolta elevati. Nei rossetti l'arsenico manifesta le concentrazioni maggiori.

Specie	Anno	Località	N.	Taglia cm	Cd	Hg	As
					Media±dev.st	Media±dev.st	Media±dev.st
Pagello	1987	Caorle	1	22	0,019	0,219	2,34
Fragolino	1988	Trieste	1	20	0,014	0,224	5,64
Sparagione	1987	Venezia	1	15	0,031	0,260	
Sparagione	1987	Trieste	3	16-17	0,023 ± 0,00	0,210 ± 0,062	4,44 ± 2,40
Sparagione	1988	Trieste	1	18	0,014	0,146	3,90
Sparagione	1987	Caorle	2	14-16	0,125 ± 0,105	0,262 ± 0,109	2,67 ± 1,03
Sparagione	1999	Caorle	5	15-18	0,048 ± 0,009	0,415 ± 0,164	3,50 ± 1,66
Menola	1988	Trieste	1	20	0,013	0,190	8,72
Triglia	1987	Venezia	1	12	0,020	0,162	3,80
Triglia	1988	Trieste	1	15	0,020	0,121	13,78
Triglia	1999	Caorle	5	11-15	0,051 ± 0,009	0,147 ± 0,030	6,25 ± 1,94
Ombrina	1988	Trieste	1	22	0,012	0,151	11,37
Ombrina	1999	Caorle	5	23-26	0,052 ± 0,008	0,165±0,056	4,96 ± 2,00
Tordo di mare	1987	Caorle	1	20	0,021	0,056	9,70
Rossetto	1987	Venezia	23	10-22	0,015 ± 0,006	0,164 ± 0,076	8,29 ± 5,26
Rossetto	1999	Caorle	5	7-14	0,065 ± 0,022	0,181 ± 0,092	19,04 ± 8,30

Tabella 5 - Concentrazioni degli elementi in mg/kg nei Perciformi bentonici.

Nella Tabella 6 sono raggruppati i Perciformi pelagici con alimentazione a base di plancton ed anche di piccoli pesci. Il cadmio risulta essere complessivamente in aumento. I tenori di Hg sono talvolta alti in esemplari campionati in tempi remoti. L'arsenico mostra tenori molto diversificati

Specie	Anno	Località	N.	Taglia cm	Cd	Hg	As
					Media±dev.st	Media±dev.st	Media±dev.st
Boga	1987	Trieste	2	18-21	0,039 ± 0,012	0,054 ± 0,008	5,46 ± 2,96
Boga	1988	Trieste	1	17	0,013	0,540	7,20
Boga	1999	Caorle	5	15-25	0,055 ± 0,005	0,102 ± 0,022	1,49 ± 0,45
Lanzardo	1987	Goro	1	32	0,068	0,087	6,80
Sgombro	1987	Trieste	4	21-28	0,019 ± 0,004	0,234 ± 0,077	4,58 ± 2,01
Sgombro	1988	Trieste	1	30	0,025	0,102	2,07
Sgombro	1994	Venezia	2	29-30	0,054 ± 0,007	0,437 ± 0,108	0,91 ± 0,01
Sgombro	1999	Porto Garibaldi	5	22-27	0,045 ± 0,015	0,048 ± 0,016	1,08 ± 0,55
Suro	1987	Trieste	6	17-24	0,031 ± 0,025	0,156±0,108	5,39 ± 2,94
Suro	1987	Grado	2	17-18	0,015 ± 0,001	0,080±0,008	6,60 ± 3,96
Suro	1987	Caorle	1	25	0,011	1,046	1,30
Suro	1987	Venezia	3	18-22	0,016 ± 0,004	0,480 ± 0,379	9,59 ± 6,44
Suro	1987	Goro	2	21-22	0,019 ± 0,008	0,415 ± 0,302	8,05 ± 3,61
Suro	1988	Trieste	1	20	0,015	0,211	3,80
Suro	1999	Caorle	5	16-23	0,053 ± 0,008	0,098 ± 0,074	1,94 ± 1,32
Suro	1999	Goro	2	25	0,035 ± 0,010	0,111 ± 0,069	9,22 ± 5,84
Suro	1999	Porto Garibaldi	5	19-23	0,042 ± 0,007	0,100 ± 0,076	2,33 ± 0,93

Tabella 6 - Concentrazioni degli elementi in mg/kg nei Perciformi pelagici.

Le analisi riguardanti i Pleuronettiformi (Tabella 7), ordine comprendente specie carnivore, evidenziano un aumento generalizzato del cadmio nelle specie analizzate nel campionamento del 1999. Per converso l'andamento tendenziale dei tassi di Hg sembra mostrare un calo dalla contaminazione. Tuttavia, in alcune stazioni di pesca da tempo note per le elevate concentrazioni di Hg nelle acque, i livelli di Hg permangono elevati anche nell'ultimo campionamento (si vedano, ad esempio, le linguatole di Trieste 1999). L'arsenico si presenta con tenori variabili e talvolta alti.

Specie	Anno	Località	N.	Taglia cm	Cd	Hg	As
					Media±dev.st	Media±dev.st	Media±dev.st
Linguattola	1999	Comacchio	5	14-21	0,064 ± 0,016	0,544 ± 0,213	12,06 ± 1,39
Passera pianuzza	1987	Venezia	7	15-26	0,013 ± 0,004	0,247 ± 0,147	8,93 ± 4,83
Passera pianuzza	1987	Goro	2	19-24	0,024 ± 0,003	0,260 ± 0,110	6,95 ± 2,33
Passera pianuzza	1988	Trieste	3	18-20	0,010 ± 0,003	0,501 ± 0,180	5,56 ± 4,82
Passera pianuzza	1999	Goro	2	20-22	0,062 ± 0,008	0,043 ± 0,019	2,49 ± 2,24
Passera pianuzza	1999	Porto Garibaldi	2	27-31	0,041 ± 0,006	0,017 ± 0,002	0,86 ± 0,06
Rombo liscio	1999	Comacchio	1	35	0,044	0,052	2,69
Sogliola	1987	Grado	2	17-22	0,023 ± 0,001	0,106 ± 0,027	4,65 ± 0,21
Sogliola	1987	Venezia	4	9-17	0,022 ± 0,009	0,114 ± 0,092	8,27 ± 7,11
Sogliola	1988	Trieste	6	16-20	0,010 ± 0,003	0,141 ± 0,037	5,58 ± 0,70
Sogliola turca	1999	Caorle	5	18-23	0,055 ± 0,008	0,052 ± 0,023	11,47 ± 5,21
Suacia	1999	Porto Garibaldi	5	8-12	0,054 ± 0,008	0,044 ± 0,012	3,00 ± 0,32

Tabella 7 - Concentrazioni degli elementi in mg/kg nei Pleuronettiformi.

Nella Tabella 8 sono raggruppate specie, anche lontane tassonomicamente, con in comune le caratteristiche di abitare fondali profondi, specialmente il pesce S. Pietro e la rana pescatrice, e di essere predatori. Da notare i tenori di Hg e As molto alti nella rana pescatrice campionata nel 1988 a Trieste.

Specie	Anno	Località	N.	Taglia cm	Cd	Hg	As
					Media±dev.st	Media±dev.st	Media±dev.st
Cappellano	1988	Trieste	2	21-27	0,011 ± 0,002	0,198 ± 0,075	3,72 ± 0,87
Cappellano	1999	Porto Garibaldi	5	18-21	0,050 ± 0,008	0,085 ± 0,018	10,27 ± 1,37
Pesce S. Pietro	1999	Caorle	5	13-17	0,067 ± 0,008	0,111 ± 0,022	1,83 ± 1,14
Rana pescatrice	1988	Trieste	1	39	0,014	0,881	10,52

Tabella 8 - Concentrazioni degli elementi in mg/kg in Gadiformi, Zeiformi e Loffiformi.

Nei pesci cartilaginei (Tabella 9), organismi prettamente predatori, i livelli di Hg sono complessivamente e costantemente alti.

Specie	Anno	Località	N.	Taglia cm	Cd	Hg	As
					Media±dev.st	Media±dev.st	Media±dev.st
Palombo	1994	Caorle	1	tr.	0,074	0,591	0,87
Palombo	1987	Venezia	2	50	0,023 ± 0,008	0,222	4,40 ± 0,14
Spinarolo	1987	Caorle	1	tr.	0,021	0,434	3,60
Spinarolo	1994	Caorle	1	70	0,044	0,413	19,49

Tabella 9 - Concentrazioni degli elementi in mg/kg negli Squaliformi (tr.=trancio).

Discussione

Cadmio

I contenuti sono estremamente variabili, infatti, l'elemento viene ritrovato a concentrazioni che vanno da 0,005 a 0,199 mg/kg (media 0,037 mg/kg). I valori più elevati sono lontani da quelli che possono essere considerati pericolosi per la salute del consumatore. In ogni caso tali valori sono inferiori a quelli ritrovati in crostacei e molluschi provenienti dall'Alto Adriatico (Delbono, 1997; Renon, 1987). Tuttavia l'aumento del cadmio rilevato nel campionamento del 1999 (media di 0,057 mg/kg) suggerisce che la contaminazione ambientale è in aumento, come osservato anche da altri autori (McLaughlin, 1999) specialmente nell'ultimo decennio. Il Consiglio Superiore di Igiene Pubblica francese raccomanda di non oltrepassare 0,1 mg/kg di Cd nei pesci (Burgat-Sacaze, 1996). Nello studio di Giaccio et al. (1984) che si proponeva di studiare il contenuto in elementi in tracce di organismi marini costieri di un'isola disabitata,

per isolare l'influenza antropica, è emerso che in tutti i pesci esaminati i livelli erano al di sotto di 0,100 mg/kg. I campioni della nostra ricerca che superano il valore citato sono otto: due sardine, due alici, due latterini, uno sparaglione ed un rossetto. Si tratta di pesci di piccole dimensioni, a dieta planctonica od onnivora. In un nostro precedente lavoro effettuato su campioni di Pescara del 1986 i livelli medi erano di 0,039 mg/kg (Delbono et al., 1993). Suddividendo i campioni del 1999 in 3 livelli trofici ed applicando il test statistico di Scheffé (p=0,05) per valutare la differenza delle medie si è osservato che le specie situate nel gradino più basso presentano livelli di cadmio significativamente più elevati rispetto alle specie delle altre categorie.

Livello Trofico	N.	Cd
1	31	0,076 ^a
2	78	0,050 ^b
3	12	0,053 ^b

Tabella 10 - Media delle concentrazioni di Cd espresse in mg/kg per livello trofico (organismi prevalentemente planctonici = 1, predatori di invertebrati = 2, predatori anche di pesci = 3) con suddivisione per gruppi di sottoinsiemi omogenei secondo Sheffé (alfa = 0,05).

Sempre all'interno dello stesso campionamento, suddividendo a seconda dell'ambiente di vita in pesci pelagici, pesci bentonici e pesci bentonici degli ambienti salmastri risulta che questi ultimi hanno livelli più bassi e appartengono ad un gruppo a sé stante (anguille, branzini e mormore). La triglia di fango, specie considerata indicatrice dell'inquinamento ambientale ha un tenore medio di 0,051. Gasparre et al. (1994), che hanno studiato tale specie pescata nel Mare Jonio, hanno trovato valori medi di 0,270 mg/kg, valori simili a quelli trovati per esemplari delle coste spagnole ed israeliane. In una ricerca condotta su prodotti della pesca catturati lungo le coste mediterranee del Marocco i risultati danno valori comparabili a quelli da noi pubblicati (El Hraiki et al., 1992). In altri studi condotti in Italia su campioni di pesci commercializzati in Marche e Umbria è risultato che alcune specie, come cefalo, ombrina, pagello, sogliola, surò e triglia hanno concentrazioni più alte (Galarini et al., 1996). Ricerche condotte in Finlandia rivelano tenori di Cd in pesci di acqua marina notevolmente più basse (Tahvonen e Kumpulainen, 1996).

Mercurio

I tenori di mercurio rilevati vanno da 0,015 a 1,046 mg/kg (media 0,167 mg/kg). E' da osservare che le concentrazioni nei campioni del 1999 (media 0,123 mg/kg) sono decisamente più basse rispetto a quelle dei precedenti campionamenti. Dai risultati ottenuti emerge che alcuni campioni superano il valore limite stabilito in Italia di 0.5 mg/kg: 4 linguatole su 5 di Comacchio e 1 sparaglione su 5 di Caorle nel 1999. Per i campionamenti del passato le specie con i livelli più alti (>0,5 mg/kg) erano: 2 suri provenienti da Goro e da Caorle nel 1987; 2 latterini, 1 boga, 1 rana pescatrice, 1 passera pianuzza provenienti da Trieste nel 1988; 1 palombo proveniente da Caorle nel 1994; 1 sgombrò proveniente da Venezia del 1994. Per palombo e rana pescatrice il limite massimo consentito di mercurio allo stato attuale è di 1 mg/kg. E' da osservare che tra le specie dell'allegato A (Gazzetta ufficiale Italiana, 1994) l'anguilla mostra livelli molto contenuti. Il confronto con la precedente ricerca condotta su prodotti ittici catturati nel basso Adriatico ci permette di evidenziare che i campioni più contaminati erano due gronghi, un fragolino ed un surò (Delbono et al., 1994). Il confronto con analisi effettuate su numerose specie ittiche prelevate nelle Marche rivelano concentrazioni simili a quelle di questa ricerca, ad eccezione delle boghe (media 0,3 mg/kg) che hanno concentrazioni inferiori (Haouet et al., 1996). Nella ricerca di El Hraiki (1992) i valori sono mediamente superiori: le boghe presentano concentrazioni circa 10 volte maggiori, gli sgombri, le sogliole ed i pesci S. Pietro valori 6 volte superiori, i suri ed i pagelli valori all'incirca doppi, le sardine valori 1.5 volte più elevati, le rane pescatrici valori simili. In esemplari di triglia di fango provenienti dal Mar Ionio i tenori sono più elevati (Gasparre et al., 1994).

Diversi autori riportano che la contaminazione da mercurio delle specie ittiche risulta nettamente superiore nel Mediterraneo rispetto agli oceani. Ciò potrebbe essere imputabile al fatto che l'area è tra le più ricche di minerali di mercurio e che lo scambio idrico con l'oceano è modesto. Il distretto di Trieste per la sua limitata comunicazione con il resto del Mediterraneo risulta critico dal punto di vista dell'inquinamento, specialmente per questo elemento. Dai nostri dati emerge che i campioni recenti provenienti da Caorle e quelli più remoti provenienti da Trieste, spesso hanno tenori superiori a quelli delle altre località.

Suddividendo i campioni dell'ultimo campionamento sulla base delle abitudini di vita i pesci bentonici hanno livelli di Hg significativamente più alti degli altri due gruppi (p<0,005). Come osservato linguatole e sparaglioni hanno tenori significativamente più elevati delle altre specie e ciò porta a nascondere l'effetto livello trofico che dai nostri dati non emerge. Al di là delle caratteristiche proprie delle varie specie, il bioaccumulo può essere legato ad elevate concentrazioni di mercurio in ben delineate zone acquatiche, accanto ad un'azione combinata di temperatura e luce che agiscono sui processi di metilazione microbica (Thibaud Y., 1992).

Arsenico

I livelli di questo elemento sono molto variabili (da 0,157 a 33,1 mg/kg) anche all'interno delle varie specie. Nell'ultimo campionamento il livello medio è risultato pari a 4,48 mg/kg. Le concentrazioni più elevate sono state ritrovate nei ghiozzi, nei gronghi, nelle linguatole, nelle sogliole e nei merluzzi cappellani. Le concentrazioni più basse sono nelle anguille, nei

cefali, nei latterini e nelle mormore. Questi dati confermano in parte l'osservazione che i pesci piatti avrebbero le concentrazioni più alte di As per motivi legati alla loro alimentazione. Per le specie per cui è possibile fare il confronto temporale si evidenzia che per molte di esse i livelli sono in diminuzione (anguilla, sardina, cefalo, passera pianuzza). Applicando il test statistico risulta che i pesci bentonici hanno tenori significativamente più alti degli altri due gruppi. Da osservare che i campioni delle specie che frequentano gli ambienti salmastri o le foci dei fiumi hanno tenori quasi sempre inferiori a 1 mg/kg. Nessuna relazione è stata osservata confrontando le medie per livello trofico. La presenza di arsenico nei pesci oltre che al tipo di alimentazione, può essere messa in relazione con la contaminazione delle acque (Michel, 1987). Livelli simili a quelli risultanti da questa ricerca sono stati ritrovati in prodotti ittici dell'Adriatico in precedenti ricerche (Sigovini, 1988; Meloni, 1995; Delbono, 1993; Navarro, 1992). Gasparre et al. (1994) per la triglia riporta valori medi di 4,84 mg/kg, mentre per squaliformi del Basso Adriatico vengono riportate concentrazioni da 2,83 a 8,39 mg/kg (De Natale et al., 1994).

Ricordiamo che nei prodotti ittici l'elemento è presente soprattutto sotto forma di composti organici, notoriamente meno tossici, e che la PTWI (Dose settimanale accettabile provvisoria) riguarda soltanto l'arsenico inorganico, quindi la valutazione tossicologica dei livelli dovrebbe essere effettuata dopo la determinazione di questa componente. Il contributo alla dieta di alcune specie per l'assunzione di As risulta comunque importante, anche ipotizzando ridotte percentuali di As inorganico. Gli studi effettuati sulle specie chimiche dell'arsenico nei pesci hanno accertato che tali percentuali possono arrivare anche al 10 % (Kaise, 1988; Velez et al., 1996).

Conclusioni

La distribuzione dei metalli tossici nell'Alto Adriatico mette in evidenza, come peraltro già noto in letteratura, un diverso grado di inquinamento nelle aree considerate.

I livelli di Cd nei pesci, pur essendo piuttosto bassi rispetto a quelli di molluschi e crostacei, sono in aumento. Questo fenomeno è probabilmente da imputare all'aumento della contaminazione delle acque che riflette quello dell'aria e dei suoli. In Europa si registra infatti che le deposizioni atmosferiche di Cd eguagliano o eccedono quelle da altre fonti (OECD, 1994). Il contenuto di Cd, maggiore nei pesci situati ai gradini più bassi della catena trofica, è direttamente collegato al grado di inquinamento dell'ambiente. Ciò deve suggerire la riduzione dell'immissione ambientale di questo tossico che arriva nell'organismo umano anche attraverso altre vie, alimentari e non. La contaminazione da cadmio nei prodotti ittici costituisce una notevole importanza anche per la definizione di una specifica normativa. Alcuni paesi (Australia, Nuova Zelanda, Olanda, Germania, Danimarca, Svezia) regolamentano o monitorano le concentrazioni di Cd nei prodotti alimentari con "linee guida" o con "concentrazioni massime permesse", specifiche per certe categorie di alimenti (McLaughlin, 1999).

Il mercurio dovrebbe presentare, secondo alcuni autori, livelli più elevati all'apice (Viviani, 1989), ma ciò non viene confermato nella presente indagine. Dai dati emerge piuttosto che i pesci di abitudini bentoniche hanno le concentrazioni più alte. Alcune specie si discostano dalle altre e talvolta si riscontra una ampia variabilità dei dati nelle singole specie e questo avvalorava l'importanza ed il determinismo dell'habitat e dello stato idrico. Sembra che l'accumulo di mercurio sia dovuto, al di là delle caratteristiche di specie, ad alte concentrazioni del tossico in alcune aree ben delimitate ed in particolare i fondali marini. L'assenza di specie grandi predatrici nel nostro ultimo campionamento non ci permette di valutare appieno l'influenza del livello trofico. Il confronto con i dati relativi a campionamenti del passato fa ritenere che la contaminazione dei prodotti ittici sia leggermente diminuita, anche se non in modo sostanziale. Nonostante gli sforzi compiuti dalle autorità sanitarie per ridurre le fonti di inquinamento il tossico si dimostra persistente. Il pesce è stato, anche recentemente, messo sotto accusa per il contenuto di mercurio. L'EPA ha ridotto la dose giornaliera di pesce rispetto a quella raccomandata precedentemente. Molte ricerche, però, sottolineano che i benefici di una dieta ricca di questo alimento superano di molto i rischi legati alle quantità di mercurio che verrebbero ingerite. Il contributo dei prodotti ittici all'introduzione con la dieta di mercurio, in particolare attraverso consumi elevati, può portare al superamento del livello massimo di assunzione consigliato dalle autorità sanitarie. Siccome il bioaccumulo del metallo può essere legato, oltre che a caratteristiche di specie, anche all'inquinamento ambientale in determinate zone acquatiche, è necessario un controllo mirato sui prodotti ed una adeguata educazione sanitaria per i gruppi di popolazione critici e per le categorie particolarmente esposte, come donne in gravidanza e bambini. E' importante monitorare particolarmente i prodotti ittici di quelle zone marine italiane che per cause naturali o per la specifica presenza di inquinamento industriale, possono esporre determinate categorie di persone od i consumatori in generale, al rischio per danni alla salute.

I livelli di As nel pescato dell'Adriatico, in particolare nelle specie pelagiche e bentoniche strette, sono spesso molto elevati ed ogni considerazione favorevole che possa essere espressa circa il basso rischio per la salute riposa sull'assunto che esso si trovi in massima parte sotto forma di composti organici. Questo assunto non e' mai stato negato ma occorre comunque vigilare ed avere più frequenti riscontri e valutazioni anche del solo elemento inorganico.

Parole chiave: Arsenico, Cadmio, Mercurio, pesce

Key words: Arsenic, Cadmium, Mercury, fish

SUMMARY - 315 samples of fishes caught in the north Adriatic Sea between 1987 and 1999 were analysed. Cd, Hg and As levels were determined. Results were compared with those presents in literature, statistically processed and their toxicological significance was considered. Hg mean levels are decreasing, while As and Cd are stationary or increasing. The concentrations of the elements, sometimes quite high, can considerably contribute to the intake of these toxicants through diet. In some species, the Hg levels found show that official surveillance have to go on.

RÉSUMÉ - Il a été effectué des recherches sur 315 échantillons de poisson, commercialisés entre 1987 et 1999 et recueillis en stations de pêche du haut-Adriatique. Les analyses ont

eût pour objet les teneurs de Cd, Hg et As. Les résultats ont été confrontés avec ceux présents en littérature élaborés statistiquement et discutés, en relation a leur impact sur la santé du consommateur. Les niveaux moyens de Hg dans les dernières années sont moyennement diminués, alors que ceux de As et Cd sont stationnaires ou en croissance. Les concentrations des 3 éléments, quelquefois élevées, peuvent contribuer significativement à l'apport de ces toxiques dans la diete. Pour certaines espèces les teneurs de Hg relevés indiquent que l'action de vigilance doit se poursuivre.

RIASSUNTO - Sono state effettuate ricerche su 315 campioni di pesce, commercializzati tra il 1987 ed il 1999, e raccolti in stazioni di pesca dell'Alto Adriatico. Le analisi hanno riguardato i tenori di Cd, Hg e As. I risultati sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura, elaborati statisticamente e discussi in relazione al loro impatto sulla salute del consumatore. I livelli medi di Hg negli ultimi anni sono mediamente diminuiti, mentre quelli di As e Cd sono stazionari od in crescita. Le concentrazioni dei tre elementi, talvolta elevate, possono contribuire significativamente all'assunzione di questi tossici nella dieta. Per alcune specie i tenori di Hg rilevati indicano che l'azione di vigilanza deve proseguire.

Bibliografia

1. Burgat-Sacaze V., Craste L., Guerre P.: "Le cadmium dans les chaines alimentaires: une revue". Revue Med. Vet., 147 (10): 671-680, 1996.
2. Baldini M., Molinaro M.G., Stacchini P., Zanasi F., Comi R., Leoni V.: "Valutazione della ingestione settimanale di mercurio con la dieta in Italia". La Rivista di Scienza dell'Alimentazione, 23 (2): 177-182, 1994.
3. Benramdane L., Accominotti M., Vallon J.J.: "Validated determination of total arsenic species of toxicological interest (arsenite, arsenate and their metabolites) by atomic absorption spectrometry after separation from dietary arsenic by liquid extraction: toxicological applications". Analyst, August, 123: 1711-1715, 1998.
4. Campanini G., Delbono G., Ghidini S.: "L'arsenico negli alimenti". Annali Fac. Med. Vet. Univ. Parma, XVIII: 185-204, 1998.
5. Cinquina A.L., Moriconi M., Cozzani R.: "Mercurio nei prodotti ittici della costa laziale rispetto alle nuove disposizioni di legge (D.M. 9.12.1993)". Atti S.I.S.Vet. XLIX, Salsomaggiore Terme 1995: 505-506, 1995.
6. Cossa D., Lassus L.: "Le cadmium en milieu marine. Biogéochimie et Ecotoxicologie. Rapport scientifiques et techniques de l'Ifremer". N° 16, S.D.P. Ifremer, Plouzane, p 111, 1989.
7. Cossa D.: "Poissons au mercure: une spécialité redoutable". La Recherche 277, Juin, 26:688-689, 1995.
8. Dabeka R., Mckenzie A.D., Lacroix G.M.A., Cleroux C., Bowe S., Graham R.A., Conacher H.B.S.: "Survey of Arsenic in Total Diet Food Composites and Estimation of the Dietary Intake of Arsenic by Canadian Adults and Children". Journal of AOAC International, 76 (1): 14-25, 1993.
9. Delbono G., Campanini G., Madarena G., Dazzi G.: "Elementi tossici in tracce: livelli e rapporti reciproci tra sette elementi nel pescato del porto di Pescara". Annali Fac. Med. Vet. Parma, 13:121-139, 1993.
10. Delbono G., Menta C., Campanini G.: "Elementi in tracce in organismi invertebrati marini di interesse alimentare". Congresso Nazionale A.I.S.E.T.O.V., Roma 20-22 Marzo 1997.
11. De Natale G., Storelli M.M., Fucilli F., Aprea A., Giacomini Stuffer R.: "Residui di metalli pesanti (Pb, Cr, Cd, Cu, Zn, Sn, Hg, As, Se, Fe, Ni) e di composti organoclorurati (PCBs, HCB, Σ DDT, Σ HCH9 in alcuni organi e tessuti di Prionace glauca catturati nel Basso Adriatico da Luglio a Dicembre 1992". Atti S.I.S.Vet. XLVIII, Giardini Naxos 1994: 893-897, 1994.
12. Edmonds J.S., Francesconi K.A.: "Methylated arsenic from marine fauna". Nature, 265: 436, 1977.
13. Haouet M.N., Galarini R., Roscini D.: "Metalli pesanti ed istamina nei prodotti ittici. 1- Presenza di mercurio negli anni 1986-1995". Industrie Alimentari XXXV, Settembre: 939-944, 1996.
14. El Hraiki A., Kessabi M., Sabhi Y., Benard P., Buhler D. R.: "Contamination par le cadmium, le chrome, le mercure et le plomb des produits de la peche marocaine prélevés en Mer Méditerranée". Revue Méd. Vét., 143(1):49-56, 1992.
15. Flanjak J.: "Inorganic and Organic Arsenic in Some Commercial East Australian Crustacea". J. Sci. Food Agric., 33: 579-583, 1982.
16. Friberg L., Elinder C.G., Kjellstrom T., Nordberg G.F.: "Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal". CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1986.
17. Gasparre G., De Natale G., Busco V.P., Piracci L., Palermo D.: "Accumulo di metalli pesanti (Pb, Cr, Cd, Cu, Zn, Sn, Hg, As, Se, Fe, Ni) e composti organoclorurati (PCBs, HCB, Σ DDT, Σ HCH) in *Mullus barbatus* pescati nel Mare Jonio nel 1993". Atti S.I.S.Vet., XLVIII, Giardini Naxos, settembre 1994: 881-885, 1994.
18. Giaccio M., Salese D., Toni G.: "Il contenuto in oligoelementi (Cu, Zn, Cd, Hg, Pb) della fauna marina costiera di un'isola disabitata (Caprara, arcipelago delle Tremiti)". Riv. Merceol., 23 (II): 135-141, 1984.
19. Harada M.: "Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution". Critical Reviews in Toxicology, 25(1):1-24, 1995.
20. Kaise T., Yamauchi H., Hirayamas T., Fukuis S.: "Determination of inorganic arsenic and organic arsenic compounds in marine organisms by hydride generation/cold trap/gas chromatography-mass spectrometry". Applied Organometallic Chem., 2: 339-347, 1988.
21. Galarini R., Haouet M.N., Roscini D.: "Metalli pesanti ed istamina nei prodotti ittici. 2-Livelli di cadmio e piombo negli anni 1986-1995". Industrie Alimentari XXXV, ottobre: 1076-1081, 1996.
22. Gazzetta Ufficiale Italiana: "Decreto Ministeriale del 09/12/1993: Metodi di analisi, piani di campionamento e livelli da rispettare per il mercurio nei prodotti della pesca". G.U. n. 21 del 27/01/1994.
23. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea: "Direttiva 91/493 del consiglio del 15 luglio 1991 che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione ed alla commercializzazione dei prodotti della pesca". G.U.C. E. L.268 del 24/09/1991.
24. Groten J.P., van Bladeren P.J.: "Cadmium bioavailability and health risk in food". Trends in Food Science and Technology, February (5): 50-55, 1994.
25. Guandalini E., Mantovani A.: "Il metilmercurio nei prodotti ittici". Ambiente Risorse Salute, Marzo: 8-11, 1988.
26. Hugunin A.G., Bradley R.L.Jr.: "Exposure of Man to Mercury. A review". J. Milk Food Technol., 38(6): 354-368, 1995.
27. Louekari K., Salminen S.: "Intake of heavy metals from foods in Finland, West Germany and Japan". Food Addit. Contam., 3: 355-362, 1986.
28. McLaughlin M. J., Parker D. R., Clarke J.M.: "Metals and micronutrients-food safety issues". Field Crops Research, 60: 143-163, 1999.
29. Mohri T., Hisanaga A., Ishinishi N.: "Arsenic intake and excretion by Japanese adults: a 7-day duplicate diet study". Food Chem. Toxic, 28 (7): 551-529, 1990.
30. Nordberg G.: "Human cadmium exposure in the general environment and related health risks - a review". In: Sources of Cadmium in the Environment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. pp. 94-104, 1996.
31. Majori L., Nedooclan G., Modonutti G.B.: "Inquinamento da mercurio nell'Alto Adriatico". Acqua e Aria, 3: 164-172, 1967.
32. Meloni S., Oddone M., Bondavalli C., Nonnis Marzano F., Triulzi C.: "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, Giugno 1995.
33. Michel P.: "L'arsenic en milieu marine: synthese bibliographique". Rev. Trav. Inst. Peches Marit., 49:175-185, 1987.
34. Navarro M., Lopez H., Lopez M.C., Sanchez M.: "Determination of arsenic in fish by hydride generation atomic absorption spectrometry". Journal of Analytical Toxicology, 16(3):169-171, 1992.
35. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development): "Cadmium, Background and National Experience with Reducing Risk". Paris, 1994.
36. Orlando E.: "Accumulo e detossificazione di metalli pesanti in organismi marini". Atti Convegno Internazionale Inquinamento ambientale e popolazioni animali, Pisa, Ottobre 1989: 47-55, 1989.
37. Renon P., Malandra R.: "Verifica del contenuto di cadmio in molluschi cefalopodi". Ristorazione collettiva, XII(1):76-80, 1987.
38. Reilly C.: "Metal Contamination of Food". 2nd edition, Elsevier, Essex, 1991.
39. Savi P.: "Il mercurio nei pesci". Il pesce, 4:65-67, 1995.
40. Sigovini G., Chizzolini R., Cannizzaro C., Antonetti P.: "Relazione tra mercurio ed alcuni oligoelementi nel pescato del golfo di Trieste". Atti S.I.S.Vet. XLII, Mantova, Settembre 1988: 431-434, 1988.
41. SPSS 9.0.1 per Windows (11/03/1999).

42. Squibb K. S., Fowler B. A.: "Biological and Environmental Effects of Arsenic". Ed. Elsevier Sci. Publ. Amsterdam, 1983.
43. Tahvonen R., Kumpulainen J.: "Contents of lead and cadmium in selected fish species consumed in Finland in 1993-1994". *Food Additives and Contaminants*, 1996, 13(6): 647-654.
44. Thibaud Y.: "Utilisation du modèle de Thomann pour l'interprétation des concentrations en mercure des poissons de l'Atlantique". *Aquat. Living Resour.*, 5:57-80, 1992.
45. Uthus E.O.: "Arsenic essentiality and factors affecting its importance". In: *Arsenic Exposure and Health* (Chappell, W.R., Abernathy, C.O., Cothran, C.R., eds) pp. 199-208. Science and Technology Letters, Northwood, UK.
46. Velez D., Ybanez N., Montoro R.: "Monomethylarsonic and Dimethylarsinic acid Contents in seafood Products". *J. Agric. Food Chem.*, 44 :859-864, 1996.
47. Viviani R.: "Inquinamento delle acque marine costiere: gli animali marini come dispositivo di monitoraggio". *Atti S.I.S.Vet.*, XLIII, Pisa , Ottobre 1989: 27-43, 1989.

PLASMA LEVELS OF VITAMINS AND MINERALS AND LENS MINERAL CONCENTRATIONS IN NORMAL AND SENILE CATARACT DOGS.

Pier Luigi Dodi¹

¹*Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Clinica Medica Veterinaria*

Introduction

The eye presents an anatomic and physiological structure which is particular and complicated with a very high metabolism. Its position in contact with the outside agents, as environmental pollution and sun rays, and its very wide vascularization makes it considered a target organ of many systematic diseases, whether contagious or toxic.

In these last few years, the lifetime of carnivorous domestic animals has increased considerably, thanks to the progress carried out in the veterinarian field. Even though, it is possible for a dog to reach a maximum age of 27 years, in reality, the average lifetime, taken into consideration all the breeds, is of 13 years (Dairin, 1997). As it grows older, the organs ability to maintain the homeostasis and to adapt to the aggressions of the external elements alter progressively, in this way, eye diseases and alterations increase.

The crystalline is undoubtedly, the easiest structure to study in its ageing progress. As its test is relatively simple and its ophthalmological study has been strongly helped by the growth of ocular surgery (Chaudieu et al, 1997). Senile alternations of the crystalline are common in old dogs. The most frequent are nuclear sclerosis, the formation of cataract and the crystalline luxation. The cataract in particular senile type, represents a model to study in the ageing pathology.

Among the most important causes, up till now recognized, of the damage caused by the ageing of ocular structure. A position of relief is kept without doubt by the oxidation produced by luminous radiation.

These processes of oxidation, take place due to the fact that the eye is chronicley exposed to luminous radiation, able to trigger a chain of harmful chemical reactions (Orzalesi e coll., 1998) with free radical synthesis produced by lipidic peroxidation, which reacting with biological molecules, determines serious cellular damages. The effectiveness of the enzymatic defenive systems and the anti-oxident activity substances is reduced with ageing.

It is supposable that environmental pollution plays an important role in the human being, in etiology of sinile cataract. In this pathology it has been observed in the human being, a high concentration of cadmium and lead and a slight increase of copper concentration (Racz and coll., 1988). Moreover, the polluting substances can determine oxidative stress. Cekie, 1998, has studied the effects caused by smoke in the cataractous lenses and has pointed out a significant increase of copper, lead and cadmium in cataractous lenses of smokers. These heavy metals, which are present in the environment, due to pollution, could re-enter among causes of cataract. The mechanism of etiopathogenesis, of which these elements cause cataract is not yet totally clear.

The purpose of the research

In order to carry out the above ideas, a research having the following aims was done on a dog:

- To characterize the physiopathologist metabolic aspects, significant in the cataract of a dog on the bases of the information supplied by the dosage of toxic minerals (cadmium and lead) and nutritions (calcium, chlorine,phosphur, magnesium potassium, sodium, copper and zinc) present in the lenses and in the plasma.
- To evaluate the possible role of the lens which indicates the state of oxidation in the dog, based on the amount of plasmatic concentration of vitamin A, E and C.

Materials and methods

Animals

The present study has been conducted on a sample of randomized dogs of various breeds, consisting of a total of 30 subjects, of varied ages, weight and sexes, which come from north Italy.

Lenses

The 20 samples in which the concentrations were determined of macro and microelements were made up of 14 lenses cataractized, 7 males and 7 females and 6 normal lenses of 2 males and 4 females, from different breeds. The ages of the dogs with cataract varied from 4 to 7 years, whereas, the group under inspection aged from 1 to 10 years, all the cataract lenses were classified as mature.

All the subjects, before being surgically treated, were subjected to an exam with a general objective, a hematic biochemical – clinical (formula with hemochrome and liverwort, renal and muscular functionality) exam and an exam, which is particularly aimed at an eye covered in electroretinography and ocular ecography.

As there hasn't been found any contraindications, the subjects have been ideal candidates for the operation. The pathological lenses have been removed through an extracapsule surgical technique. The normal lenses removed with the same technique have been obtained within 6 hours, after the death of the subjects.

The lenses removed before being analyzed have been placed in plastic test tubes and frozen at -20° .

On the day of the tests, the crystallines have been weighed, and after, dried in an oven at the temperature of 100°C for 24 hours. The weight of the samples has been taken after. The moisture of the samples has been calculated. To determine the concentrations of the metals in atomic absorption a preventive breakdown is necessary of the organic matrix. The method chosen was the wet mineralization.

This technique requires the use of strong acids, such as nitric, perchloric, hydrochloric and their mixtures which should be able to completely breakdown the organic material through oxidative reactions. The speed of the reaction can be increased by the temperature and by the pressure.

In our case, the dried samples have been placed in teflon capsules together with 3ml of HNO_3 (65%) Suprapur[®] (Merck) and 0.5ml H_2O_2 (volume 110). The capsules have been placed in a microwave oven (Milestone 1200 Mega) where the complete mineralization takes place in 20' with a program of 6 increasing steps, at a maximum temperature 180°C and a pressure of 20 bar. After the cooling, the liquid was brought to a final volume of 10ml with hexastyled water.

The spectrophotometric definitions have been executed with a Perkin-Elmer Mod.305/B apparatus, equipped with lamps charged with radiofrequency and corrector at the base of the lamp with deuterium. The vaporization was obtained by means of a oxyacetylene flame of Ca, K, Na, Mg, and Mn and by means of a graphite oven (HGA500) for Cd, Cu, Pb. In order to guarantee accuracy of the preparation and of the analytics definition, controls on the materials in reference to NBS (SRM 1566 and SRM 1577) were done.

Plasma

The 10 older dogs or equal to 8 years of age, therefore old, whom which were determined the plasmatic values, came from a kennel in the north of Italy. The subjects were male, 4 with mature cataract and 6 normal and they had been kept for years with the same diet and environmental condition and at the time of the hematic removal, systemic pathology was not present in course, as confirmed by the objective exam and from the results of the laboratory exams.

The blood samples were placed in test tubes containing EDTA, for the dosage of the vitamins, and Eparina, for the minerals, and have been analyzed the same day when taken.

The dosage of the vitamins A and E has been done with the technique HPLC. Acetate-alpha-tocoherol has been added to the plasma with EDTA, used as internal standard. Later the sample is dissolved in chloroform and diluted in ethanol. The function of ethanol is to get the plasmatic proteins to precipitate. The vitamins have been extracted twice with hexane through vaporization under nitrogeno. Finally, the determination of the liposoluble vitamins takes place through HPLC.

The determination of vitamin C in the blood is done with the HPLC technique by electrochemistry of 650 nA. 220 microlitres have been added at four parts at 6% of metaphosphoric acid, and in this way it acids the plasma and it stabilizes the ascorbic acid. After the samples are whirled at 2500 rpm. The supernatant obtained is added to a solution containing trisodiumphosphate and dichloride, in order to reduce the dihydroascorbic, formed from the previous reaction, to ascorbic. The minerals are determined by a spectrophotometer of COBAS MIRA Plus chemical clinic.

Statistical methods

Among the 20 dogs of which the crystallines have been analyzed, different groups based on the normal or pathologic eye, sex, age, right or left eye.

For all the groups each element's media and deviation has been calculated.

The 10 subjects in which the plasma level of some minerals has been determined, have been subdivided into two groups, pathological and normal. Media and standard deviation have been calculated.

The values of the concentrations in healthy dogs and in dogs with cataract have been statistically compared by student test. The differences have been considered when $p < 0.5$.

Moreover, the factors of correlation of the different determinations have been calculated.

Results

Correlated differences of sex or age, in the concentration of cadmium, lead, copper and magnesium in cataractous lenses have not been found. In the cataractous lenses the level of calcium, sodium and zinc is very high if compared to normal lenses. The level of calcium is higher in the cataractous lenses of young subjects, age less than 7.

Magnesium doesn't seem to be correlated with the process of cataract in the dog because there aren't any significant variations.

In the 10 subjects in which sodium, potassium, chlorine, calcium, phosphorus and magnesium and vitamins A, E and C have been pointed out an increase of plasmatic sodium in subjects with total senile cataract and an increase of chlorine in the normal subjects of the controlled group. Potassium, calcium, phosphorus and magnesium do not have a significant variation.

Vitamin E is mainly high in the plasma of subjects with cataract, in respect of the controlled group, while, vitamins A and C do not present significant variations.

All the results can be examined in the appendix tables.

Discussion

The bibliography of veterinary science regarding micro-macroelements and vitamins in lenses and in plasma in dogs with cataract is poorly published.

LENSES

Cadmium, lead, and copper

These elements are considered biomarkers. Biomarkers represent the level of contamination in a certain area and, consequently, establish an indicator of the toxic risk level to which a certain population can be subject to (Fossi, 1994). These contaminated elements induce biochemical variations or cells which are able to speed up the cataractous process in the lens. In the present research there hasn't been found any significant difference correlated to the sex and age in the concentration of cadmium, lead, copper in the cataractous lenses compared to the normal ones.

These results are in contrast with the existing work done with the human being. As a matter of fact, in the senile cataract of the human being the concentration of cadmium, lead and copper are high, if compared to normal ones. Lead is the element with the highest concentration, followed by cadmium and copper.

The concentration of these elements, moreover, increases with the age of the subjects (Racz and coll., 1998).

Other studies confirm these facts. In 1998 Cekic has determined the concentration of the three previous elements of lenses with cataract of different stages of the human being. In the group of pathologic lenses belonging to male subjects, high concentrations of cadmium have been registered compared to the female group. In the human being, as in animals, the origin of cadmium, lead and copper is tied to the environmental issue of the contaminated factors coming from different industrial production stages. Cadmium, in the human being, is mainly from cigarette smoke and fertilizers used in agriculture, while lead is caused by the vehicles' exhaust pipes (Racz and coll., 1998).

Moreover, alimentation cannot be excluded, in fact, through a diet (mainly cereals) the most largest quantities of cadmium and lead are taken (Galal-Gorchev, 1993, FAO/WHO, 1998/a/b).

The role of cadmium in the cataract pathogenesis of the human being is mainly in chronic smokers (Ramakrishnan and coll., 1995). This would confirm the pathogenic role of metal, only in certain conditions. It cannot be excluded that in lenses, in which a cataract is present at an incipient stage, modifications of the crystalline capsule help the entry of the metals, that could speed up the degenerating process, but not to set it off.

Copper is important for many physiological functions and among these it is essential for many enzymes (Underwood, 1977). The concentration of copper in the normal dog's lenses decreases with age (Cook and coll., 1985), as in human beings (Shlopak, 1962).

In the dog, with a mature cataract, the amount of copper is significantly low even though a high level has been noted in the hypermature stage (Cook and coll., 1985).

Therefore, the results obtained in the present research suggest some theories on the low concentration of heavy metals in the toxic actions, cadmium and lead, in the dog's cataractous lenses:

1. A dog's life is shorter than a human being's life, 13-15 years compared to the 70-75 years of human beings; this fact underlines that dogs are in shorter contact with the contaminated environment.
2. The possible theory of a lower concentration of metals of the environment in the north of Italy is to be excluded, due to the fact that this area, the major number of industrial settlement and of automobiles of the whole peninsula.
3. The level of absorption of these substances can be different from species to species.

Lead is the heavy metal which is mainly present in nature. In mammals it is easily absorbed. Infact, it is possible to find it in different organs, like kidneys, bones and nerve tissues.

Cadium is considered one of the heavy metals, mostly dangerous for the health due to its high environmental dispersion, it is possible to find in the air at high concentration. Infact, one of the main ways of absorbing it, is through the respiratory system.

As to regards to copper, it is possible to absorb it through a diet, therefore, it is extremely difficult to establish the toxic level of the lens.

Calcium, Sodium, Zinc, Potassium and Magnesium

In the present research of the cataractous lenses the level of calcium, sodium and zinc is significantly high if compared to normal lenses.

The level of calcium results to be high in the cataractous lenses of young subjects, under the age of 7 years. The average age statistically significant, is of 5.33 ± 1.03 and 12.9 ± 3.1 years. Respectively in the young group and in that of the old.

This confirms a part of the studies completed in human medicine that calcium is very high in cataractous lenses (Cekic, 1998), mainly in the case of senile cataract (Burge, 1909; Adams, 1929; Kraus, 1934). Also, cigarette smoke has a cataractic action on calcium. An increase of calcium was noted in the normal lenses of mice, exposed to cigarette smoke (Avunduk and coll., 1997). These variations seem to be caused by morphological modifications of the lens epithelium (Avenduk and coll., 1999).

Based on these last researches it is possible to assume that dogs which live with their owners that smoke feel the effects of it in their eyes.

In the dog's lenses examined calcium variations are higher in pathologic lenses of young subjects compared to adult subjects. For this assumed difference the pathogenic role of calcium in dogs is particularly evident in young subjects. Infact, the concentration of this element results to be about four times higher (1453,78 ppm against 345.1 ppm of the old group) than in dogs with cataract at a mature stage.

In the human being you can assist of an increase in calcium as cataract matures (Cristini and coll., 1983).

The porportionality between calcium tension and its maturing level results to be so much that authors have suggested it for classifying cataracts (Saraux and coll., 1986). The levels of calcium which have been discovered in this research enable to state that the membrane is more permeable in young subjects and this can speed up the pathologic process.

The potassium level in examined dogs is high in normal lenses. Magnesium doesn't seem to be involved in the dog's cataractic process because there aren't any significant variations.

This is confirmed by the existing bibliography. Researches done on laboratory animals, in cataractic lenses of mice, potassium and magnesium decrease, while sodium and calcium increase (Dilsiz and coll., 1999). Also, in the human being you can assist at a decrease of potassium in the lenses (Stanojevic and coll., 1987; Rasi and coll., 1992).

The increase of zinc and sodium in dog's pathologic lenses is indicated also in the human being. Infact, zinc increases all types of cataract (Srivastava and coll., 1992; Rasi and coll., 1992), while the second one (sodium) is found in high concentrations only in senile cataracts (Stanojevic and coll., 1987)

Hematic plasma

In the second study regarding dogs with senile cataract, a small number of dogs was studied and this due to that fact, that a group of harmonious subjects in age, environment, alimentation. The ten dogs came from a kennel from the north of Italy and have been feed for years the same alimentation, they are old subjects (over 8 years of age), all males: four with senile cataract at a mature stage and six present normal controls.

The necessity of a sample, the most homogeneous possible, is binded to the strong influence to the type of alimentation in the variations of the minerals and plasmatic vitamins.

Vitamins A, E and C.

The result of the dosage of the vitamins of the dogs examined, has not pointed out significant differences in comparision with the 2 groups, except for vitamin E, which is the major in the group of the subjects with senile cataract.

This last result is in contrast with the scientific work done, which has demonstrated the importance of this anti-oxidant in the prevention of cataract.

In different researches it has been observed that additional vitamin E, both in the human being and in animals of laboratory reduce significantly the effect of cataract, because high dosage of vitamin E slow down or eliminate the oxidative stress, which is the main cause of cataract (Lyle, 1999).

The result obtained in the dogs of the present research can be referred to two factors.

High mobility of vitamin E in the organism and low concentrations that limit a precise dosage at a plasmatic level. The tissue deposits mainly at a hepatic level, are able to supply enough provision for long periods and so the plasmatic concentrations vary from subject to subject, generally, the plasmatic levels of vitamin E seem to be correlated with the absorbed quantity with the diet and able to absorb lipidic compound for these reasons it is not possible to evaluate the anti-oxidant effect in a subject of vitamin E based only on the plasmatic concentration.

The low number of the examined subjects does not enable to draw final considerations. This fact, as already confirmed is due to the need to have a calculation on samples of subjects the most homogeneous possible, which would not be possible with others. Only through a dosage of more homogeneous groups, a significant result will be possible. During this study there hasn't been pointed out differences of ascorbic acid and vitamin A.

An English research, on a sample group of 23 poodle dogs with cataract, has pointed out a significant decrease of ascorbic acid at a plasmatic level, compared to the controlled group, even if the difference in concentration at level of aqueous humour, in the same animals, has not resulted to be significant (Barros and coll., 1999).

Other studies have established that the concentration of vitamin C in the aqueous humour, is correlated at the same level of vitamin C in the plasma. This would confirm the importance of the additional alimentation with ascorbic acid (Haung and coll., 1997).

From the different bibliograpy, the role of vitamin C does not appear clear in the pathogenesis of cataract. Moreover, the dog holds a high endogenous production and does not need this type of vitamin. Even, additioned high quantities result to be contraindicated because they are cause of hypervitaminic pathologies.

With vitamin C, also, for vitamin A there hasn't been found a difference in the 2 groups of dogs.

Researches done by Lyle, 1999, in the human being have established that the plasmatic level of vitamin A does not seem to influence the development of cataract.

Sodium, Potassium, Chlorine, Calcium, Potassium and Magnesium.

The present research has underlined an increase of plasmatic sodium in subjects with mature senile cataract and an increase of chlorine in normal subjects of the controlled group. Phosphor presents an increasing trend in the controlled group. Potassium, calcium and magnesium have not gotten a significant variation.

Researches done on human plasma in patients with senile cataract, have underlined a significant lower level of calcium, while, phosphor is higher compared to the normal controlled group (Chen, 1992).

Conclusion

The emerged datas must be interpreted with caution, considering the limits of the present study.

A first potential limit able to influence the result obtained is the geographic one. Infact, all dogs that from the north of Italy, could not be the representatives of the whole Italian dog population.

The possibility of minium outside contaminations of the examined lenses is not to be undervalued, because eventhough, sterile containers and standard laboratory methods are used, it is impossible to avoid them in particular for calcium.

However, even considering the limits as indictated above from the obtained data, it's possible to arrive to some important preliminary conclusions:

1. There isn't significant factors to highlight risks tied up to age, sex, breed and environment, except for the elevated contents of calcium in young subjects with mature cataract. This variation could be considered in an eventual pharmacology therapy, which limits the entry of calcium in the lens through chelates of calcium.
2. The loss of the control of hydroelectric equilibrium of the cataractous lens, over loaded with calcium and sodium and potassium depletion, confirms the pathogenesis in the human being, with a major interest for calcium in young subjects. Therefore, eventual experimental pharmacological therapies, with the intention of modifying this relation, done on the human being can find an application also in dogs.
3. The non-significant variations of cadmium and lead do not seem to influence the cataractic role of these elements found in dogs, most probably due to the fact that dogs which have a lifetime of 10-15 years and therefore, insufficient to absorb these polluting substances from the environment. Moreover, cadmium and lead are not the causes that set off cataract. Most probably they speed up the pathologic process due to the fact that they cause oxidative stress.
4. The dosage of liposoluble vitamins is not significant. This should be connected with the high mobility of the vitamins that do not enable to calculate them. Moreover, the limitedness and the imprecision of the given diet, as the effect, which is usually controlled as these nutritions confuses even more the observations of the different researches.

Basic studies of bibliography suggest that the oxidative mechanisms, mainly with the ageing, can play a very important role in the pathogenesis of cataract.

Many results seem to agree on the positive effect of the vitamins and the traced elements in the progression of cataract, even, if the result of the epidemic observation in the human being remain however, not totally clear and inconclusive (Christen, 1999).

Therefore, only through double blind, randomized on large scale it will be possible to define the potentiality and the benefits of the vitamins and the micro and macroelements.

At the present time, the datas which are at disposition and the limited number of observations of the present research do not enable to draw definate considerations on the existence and entity of such differences.

In any case, the obtained results represent a clear indication in this sense and lead to further examinations, on which the author is already involved with.

Lens	Age	Zn=ppm	Cu=ppm	Pb=ppm	Cd=ppm	Ca=ppm	K=ppm	Na=ppm	Mg=ppm
Normal	4.8	27.9	3.6	< 0,05	0.1	32.7	436.2	2273.1	129.6
Cataractous	9.6	48.8	2.9	< 0,05	0.1	820.2	121.7	6845.1	113.6

Tab. 1 *Normal vs cataractous*

Lens	Age	Zn=ppm	Cu=ppm	Pb=ppm	Cd=ppm	Ca=ppm	K=ppm	Na=ppm	Mg=ppm
Young dog	5.33	0.13	3	0.1	0.08	1453.7	94.5	6951.7	130.6
Old dog	12.9	0.1	2.7	0	0.1	345.1	142	6765.1	100.2

Tab. 2 *Young dog vs old dog*

Plasma	vit.A µg/ml	vit.E µg/ml	vit.C µg/ml
Cataracts	1.3483	9.6235	0.673
Normal	1.023	6.6067	0.7527

Tab. 3 *Cataracts vs normal*

Plasma	Age	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mg/dl	Ca mg/dl	P mg/dl	Mg mg/dl
Cataracts	11.75	148.75	5.225	411.25	11.8	4.79	1.93
Normal	10.33	144	5.13	449.17	12.23	4.02	2.25

Tab. 4 *Cataracts vs normal*

Parole chiave: cane, cataratta, minerali, vitamine.

Key words: dog , cataract, mineral, vitamins,.

RIASSUNTO - L'occhio presenta una struttura anatomica e fisiologica complessa e particolare con un metabolismo tra i più elevati. La sua posizione a contatto con gli agenti esterni, quali inquinanti ambientali e raggi solari, nonché la sua estesa vascolarizzazione, lo portano ad essere considerato un organo bersaglio di molte malattie sistemiche sia di natura infettiva che tossica. Finalità della ricerca:

a) Caratterizzare aspetti fisiopatologici metabolici significativi della cataratta nel cane, sulla base delle informazioni fornite dal dosaggio dei minerali tossici (cadmio e piombo) e nutrizionali (calcio, cloro, fosforo, potassio, sodio, rame e zinco) presenti nella lente e nel plasma.

b) Valutare il possibile ruolo della lente quale indicatore dello stato di ossidazione del cane in base alla determinazione della concentrazione plasmatica delle vitamine A, E e C.

I 20 campioni in cui sono state determinate le concentrazioni macro e microelementi erano composti provenienti da 14 lenti catarattose, 7 maschi e 7 femmine, e 6 lenti normali, da 2 maschi e 4 femmine di razza differente. L'età dei cani con cataratta variava da 4 a 17 anni mentre il gruppo di controllo da 1 a 10 anni. Tutte le lenti catarattose sono state classificate come mature.

I 10 cani con età maggiore o uguale ad 8 anni, quindi anziani, in cui sono stati determinati i valori plasmatici provenivano da un canile del Nord Italia.

Non è stata rilevata nessuna differenza, correlate a sesso ed età, nelle concentrazioni in cadmio, piombo, rame e magnesio nelle lenti catarattose rispetto alle normali. Nelle lenti catarattose il livello di calcio, sodio e zinco è significativamente alto se comparato con le lenti normali. Mentre il livello di potassio risulta elevato nelle lenti normali. Il livello di calcio risulta maggiormente elevato nelle lenti catarattose dei soggetti giovani, con una età inferiore ai 7 anni.

Il magnesio non sembrerebbe correlato al processo della catarattogenesi nel cane in quanto non vi sono variazioni significative.

Nei 10 soggetti in cui si è determinato il sodio, potassio, cloro, calcio, fosforo e magnesio e le vitamine A, E e C ha evidenziato un aumento di sodio plasmatico nei soggetti con cataratta totale senile ed un aumento del cloro nei soggetti normali del gruppo di controllo. Il potassio, calcio, fosforo e magnesio non hanno una variazione significativa.

Le vitamine E è maggiormente elevata nel plasma dei soggetti con cataratta rispetto al gruppo di controllo, mentre le vitamine A e C non presentano delle variazioni significative.

Attualmente i dati a disposizione e il ristretto numero di osservazioni del presente ricerca non consentono di trarre considerazioni definitive sulla esistenza e entità di tali differenze.

In ogni caso il risultati ottenuti rappresentano un chiaro indizio in questo senso e spingono ad ulteriori approfondite verifiche.

SUMMARY - The eye presents an anatomic and physiological structure which is particular and complicated with a very high metabolism. Its position in contact with the outside agents, as environmental pollution and sun rays, and its very wide vascularization makes it considered a target organ of many systematic diseases, whether contagious or toxic.

The purpose of the research are: 1) To characterize the physiopathologist metabolic aspects, significant in the cataract of a dog on the bases of the information supplied by the dosage of toxic minerals (cadmium and lead) and nutrients (calcium, chlorine, phosphur, magnesium potassium, sodium, copper and zinc) present in the lenses and in the plasma; 2) To evaluate the possible role of the lens which indicates the state of oxidation in the dog, based on the amount of plasmatic concentration of vitamin A, E and C.

The 20 samples in which the concentrations were determined of macro and microelements were made up of 14 lenses cataractized, 7 males and 7 females and 6 normal lenses of 2 males and 4 females, from different breeds.

The 10 older dogs or equal to 8 years of age, therefore old, whom which were determined the plasmatic values, came from a kennel in the north of Italy.

Correlated differences of sex or age, in the concentration of cadmium, lead, copper and magnesium in cataractous lenses have not been found. In the cataractic lenses the level of calcium, sodium and zinc is very high if compared to normal lenses. The level of calcium is higher in the cataractous lenses of young subjects, age less than 7.

Magnesium doesn't seem to be correlated with the process of cataract in the dog because there aren't any significant variations.

In the 10 subjects in which sodium, potassium, chlorine, calcium, phosphorus and magnesium and vitamin A, E and C have been pointed out an increase of plasma sodium in subjects with total senile cataract and an increase of chlorine in the normal subjects of the controlled group. Potassium, calcium, phosphorus and magnesium do not have a significant variation. Vitamin E is mainly high in the plasma of subjects with cataract, in respect of the controlled group, while, vitamin A and C do not present significant variations. At the present time, the data which are at disposition and the limited number of observations of the present research do not enable to draw definite considerations on the existence and entity of such differences. In any case, the obtained results represent a clear indication in this sense and lead to further examinations

References

- Adams D.R. : The role of calcium in senile cataract. *Biochim J*, 23:902, 1929.
- Avunduk A. M., Yardimci S., Avunduk M.C., Kurnaz L., Aydin A., Kockar M.C., Delibasi T., Dayanir V. : Prevention of lens damage associated with cigarette smoke exposure in rats by alpha-tocopherol treatment. *IOVS*, 40:2, 537-541, 1999.
- Avunduk A.M., Yardimci S., Avunduk M.C., Kurnaz L., Kocka M.C.:determination of some trace and heavy metals in rat lenses after tobacco smoke exposure and their relationships lens injury. *Exp Eye Res.* 65:3, 417-423, 1997.
- Barros P.M., Safatle A.M., Queiroz L., Silva V.V., Barros S.B. :Blood and aqueous humor antioxidant in cataractous poodles. *IOVS Abstract issue*, Fort Lauderdale, Florida,40:4 p.527, 1999.
- Burge W.E.: Analyses of the ash of normal and cataractous lens. *Archs Ophthal.* 38:447, 1909.
- Chadieu G. Clerc B. Et al. : Ophthalmologia, Da: Geriatria del cane e del gatto, Ed. SCIVAC Cremona, pp. 81 -97, 1997.
- Chen C.Z. : Analysis of 7 elements in the serum and lens of senile cataract patients. *Chung Hua Yen Ko Tsa Chih (Abstract)*, 28:6:355-357, 1992.
- Cristini G., Meduri R. : Basi fisiopatologiche di clinica oculistica. *UTET Torino*, 153 –157, 1983.
- Cekic O. : Effect of cigarette smoking on copper, lead and cadmium accumulation in human lens. *Br J Ophthalmology*, 82:2, 186-88, 1998.
- Cook C.S., McGahan M.C. : Copper concentrations in cornea, iris, normal and cataractous lenses and intraocular fluids of vertebrates. 5:1, 69-76, 1985.
- Dairin F. : Necessità della visita oculistica nell'animale anziano. Da: Geriatria del cane e del gatto, Ed. SCIVAC Cremona, pp. 17 – 21, 1997.
- Dilsiz N., Olcucu A., Cay M., Naziroglu M., Cobanoglu D.: Protective effects of selenium, vitamin C and vitamin E against oxidative stress of cigarette smoke in rats. *Cell Biochem Funct*, 17:1, 1-7, 1999.
- FAO/WHO. Discussion paper on cadmium . Agenda item 15(d), CX/FAC 99/21, December, 1998/a.
- FAO/WHO. Draft maximum levels for lead. Agenda Item 15(b). CX/FAC 99/19,December, 1998/b.
- Fossi M.C. : Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 102:12, 49 –54, 1994.
- Galal-Gorchev H. : Dietary intake, levels in food and estimated intake of lead, cadmium and mercury. *Food additives and contaminants*, 10, 115 –128, 1993.
- Haug W., Koralewska M.A., Bauer B., Akesson B. : Extracellular GSH and ascorbic acid in aqueous humor and serum of patients operated on for cataract. : *Clin Chim Acta*, 261:2, 117 –130, 1997.
- Krause A.C. :The biochemistry of the eye. Hopkins Press, Baltimore, 1934
- Lyle B.J., Mares-Perlman J.A., Klein B.E., Klein R., Palta M., Bowen P.E., Greger J.L. : Serum carotenoids and tocopherols and incidence of age-related nuclear cataract. *Am J Clin Nutr*, 69:2, 272-277, 1999.
- Racz P., Erdohelyi A.: Cadmium, lead and copper concentrations in normal and senile cataractous human lenses. *Ophthalmic Res.* 20: 10 –13, 1988.
- Ramakrishnan S., Sulochana K.N., Selvaraj T., Abdul-Rahim A., Lakshmi M., Arunagiri K. : Smoking of beedis and cataract: cadmium and vitamin C in the lens and blood. *Br J Ophthalmol.*, 79:3, 202-206, 1995.
- Rasi V., Costantini S., Moramarco A., Giordano R., Giustolisi R., Gabrieli C. : Inorganic element concentrations in cataractous human lenses. *Ann Ophthalmol.*, 24:12, 459 –464, 1992.
- Shlopak T.V. : Chemistry of the crystalline lens in the normal and pathological states II. Chemical elements in the blood and crystalline lenses of patients with cataracts. *Oftalmol. Zh.* ,17, 347-351, 1962.
- Srivastava V.K., Varshney M., Pandey D.C.: Role of trace elements in senile cataracts. *Acta Ophthalmol Copenh.*, 70:6, 839-41, 1992.
- Stanojevic P.A., Hristic V., Cuperlovic M., Jovanovic S., Kramanovic J.: Macro- and microelements in cataractous eye lens. *Ophthalmic Res.*, 19:4, 230-234, 1987.

DIAGNOSI DELLE MALATTIE OTOLOGICHE DEL CANE E DEL GATTO

Bianchi Ezio, Dondi Maurizio

Premessa

La semeiologia dell'orecchio riveste un importante ruolo nella clinica degli animali da compagnia, sia per la frequenza con cui questa complessa struttura viene colpita da processi morbosi, sia per le drammatiche ripercussioni che questi hanno sul rapporto Uomo/Animale d'affezione. Tra i segni e i sintomi più comunemente associati alle malattie otologiche, infatti, possiamo ricordare: depressione del sensorio, forte dolorabilità alla palpazione dell'orecchio con manifestazioni di aggressività anche nei confronti del proprietario, presenza di essudati maleodoranti, scuotimento continuo della testa, testa ruotata, sordità, atassia locomotoria. Pur essendo quindi patologie che solo raramente mettono in pericolo la vita dell'animale, vengono vissute con grande angoscia dai proprietari che vedono profondamente trasformato dalla malattia il loro "pet".

Cenni dell'anatomia dell'orecchio

L'orecchio viene classicamente suddiviso in orecchio esterno, orecchio medio e orecchio interno; nella figura 1 è riportata un'immagine schematica delle strutture più importanti che compongono l'orecchio del cane e del gatto.

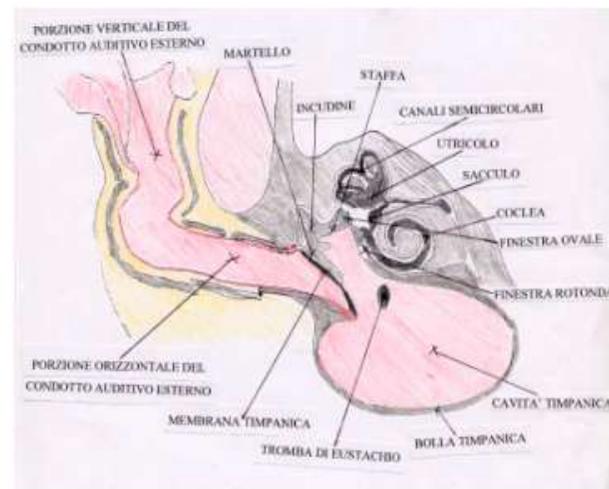


Figura 1. Immagine dell'anatomia dell'orecchio nel cane e nel gatto.

L'orecchio esterno si compone della pinna e del condotto uditivo esterno. La pinna è una struttura cartilaginea, rivestita da cute, molto mobile e di forma variabile, che riceve le vibrazioni dell'aria e le trasmette alla membrana timpanica attraverso il condotto uditivo esterno. Questo è delimitato da una struttura cartilaginea e ossea rivestita da una cute ricca di ghiandole sebacee e ceruminose; ha una lunghezza e un diametro variabili, e si compone di una porzione verticale più lunga, che si dirige ventromedialmente, e di una porzione orizzontale più breve, che si dirige medialmente terminando in corrispondenza della membrana timpanica.

La membrana timpanica è una struttura ellittica, di color grigio perla, semitrasparente, che separa l'orecchio esterno da quello medio; presenta una superficie esterna concava, sulla cui porzione più depressa si inserisce il manubrio del martello.

L'orecchio medio è una cavità ossea rivestita da uno strato epiteliale; contiene la catena degli ossicini (martello, incudine e staffa), che si estende dal timpano alla finestra ovale, il muscolo stapedio e il tensore del timpano, e una branca del nervo facciale: la corda del timpano. Lo spazio contenuto nell'orecchio medio è delimitato lateralmente dalla membrana timpanica, medialmente da una eminenza ossea che contiene la coclea e su cui si affaccia la finestra ovale, anteriormente dall'ostio della tromba di Eustachio e posteriormente dalla membrana che chiude la finestra rotonda. Questo spazio termina dorsalmente a livello del recesso epitimpanico, che è occupato quasi completamente dalla testa del martello e dall'incudine, e ventralmente nella bolla timpanica.

L'orecchio interno è costituito da una complessa serie di dotte e sacchi pieni di liquido, il labirinto membranoso, contenuti nel labirinto osseo. Quest'ultimo può essere suddiviso in: coclea, vestibolo e canali semicircolari. La coclea è posta anteriormente, ha una forma simile alla conchiglia di una chiocciola ed è l'organo in cui sono situati i recettori acustici. Il vestibolo contiene l'utricolo e il sacculo, i quali, come i canali semicircolari, contengono i recettori dell'equilibrio. Dalle strutture acustiche e dell'equilibrio dell'orecchio interno originano rispettivamente le fibre cocleari e vestibolari, che vanno a costituire l'VIII nervo cranico (nervo vestibolo-cocleare) (Getty, 1964).

Cenni di acustica e di fisiologia dell'orecchio

Il suono è una forma di energia fisica generata da un corpo elastico posto in vibrazione comprimendo e decomprimendo le molecole del mezzo circostante. Si determina così la comparsa di vibrazioni che si propagano attraverso l'aria (o mezzi diversi dall'aria) sotto forma di onde longitudinali. Il suono viene caratterizzato dalla frequenza, dall'intensità e dal timbro.

Per frequenza si intende il numero di oscillazioni che queste onde compiono al secondo (Hz). Il cane è in grado di percepire suoni con frequenza fino a 100 mila Hz, molto al di sopra quindi del limite massimo di frequenza percepita dall'orecchio umano che è circa 16 mila Hz; i gatti percepiscono suoni con valore di frequenza massima intermedio tra quello del cane e quello dell'Uomo: 50 mila Hz.

L'intensità è l'energia sonora e si misura in decibel (dB). Unità di misura dell'intensità utilizzate nella clinica audiologica sono il dB SPL (sound pressure level) e il dB NHL (normal hearing level), che sono riferite rispettivamente all'orecchio più sensibile, e alla soglia auditiva media di un gruppo di persone con udito normale (Chiappa, 1997; Giulio, 1992; Colletti e Sittoni, 1993).

Il timbro si riferisce al contenuto in armoniche di un suono; i suoni, infatti, ad eccezione di quelli puri detti toni, sono eventi complessi, cioè sono formati dalla somma di un'onda fondamentale e di onde armoniche (Giulio, 1992; Colletti e Sittoni, 1993).

Quando lo stimolo sonoro, convogliato dall'orecchio esterno, raggiunge il timpano determina una vibrazione della membrana, che viene trasmessa alla finestra ovale tramite la catena degli ossicini. La finestra ovale quindi comprime il liquido contenuto nella coclea, determinando, con un meccanismo complesso e non ancora del tutto chiarito, la stimolazione delle cellule capellute dell'organo del Corti, che sono i recettori acustici.

I canali semicircolari, l'utricolo e il sacculo vanno a costituire il cosiddetto labirinto non acustico. I primi registrano, a livello dei recettori delle creste ampollari, le accelerazioni angolari della testa; l'utricolo e il sacculo registrano invece, in corrispondenza delle macule, che contengono le cellule recettoriali, i movimenti gravitazionali e lineari della testa (Jenkins, 1989).

Semeiologia dell'orecchio

Le procedure diagnostiche adottate nelle patologie di interesse otologico sono per buona parte sovrapponibili, indipendentemente dal fatto che la struttura colpita sia l'orecchio esterno, il medio o l'interno. Tanto più che molto frequentemente due o anche tutte e tre le componenti che compongono l'orecchio sono interessate contemporaneamente dal processo morboso.

Prima di effettuare l'esame clinico dell'orecchio è molto importante che il veterinario raccolga l'anamnesi e le informazioni utili ai fini del segnalamento, e quindi che effettui un accurato esame obiettivo generale del cane o gatto in esame. Solo successivamente si provvederà ad effettuare l'esame obiettivo particolare dell'orecchio e le indagini collaterali. Un tipo particolare di esami collaterali sono i test audiometrici, che vengono impiegati soprattutto, ma non esclusivamente, nella diagnosi di sordità.

Anamnesi e segnalamento

Prima di esaminare l'animale bisogna porre al proprietario alcune domande, focalizzando l'attenzione sull'ambiente in cui il cane o il gatto vive, sulla presenza di altri animali, sulla storia passata e recente dell'animale in questione. Per quanto riguarda l'ambiente esterno, questo può predisporre all'insorgenza di infezioni dell'orecchio, soprattutto quando è caldo-umido, o essere causa diretta di patologia nel caso dei corpi estranei vegetali che possono localizzarsi nel condotto uditivo esterno. Il contatto con altri cani o gatti può favorire la trasmissione di ectoparassiti (principalmente *Otodectes cynotis*) che causano otiti esterne. Ciò che più interessa della storia dell'animale sono le malattie pregresse, soprattutto quelle a carico dell'orecchio e in generale quelle che colpiscono, anche non primariamente, l'apparato tegumentario: otiti, piodermiti, dermatiti allergiche o autoimmuni, malattie endocrine, demodicosi, FIV. Per quel che concerne l'anamnesi recente, questa consiste essenzialmente nei sintomi notati dal proprietario e negli interventi terapeutici eventualmente già effettuati. Tra i sintomi di più frequente riscontro nelle patologie otologiche possiamo ricordare: lo scuotimento della testa, la testa ruotata, il grattamento delle orecchie, la presenza di cattivo odore, il cambiamento di carattere (depressione del sensorio, aggressività), la sordità parziale o totale, l'anoressia e l'atassia. Riguardo alle terapie effettuate, si deve verificare se i principi attivi impiegati sono potenzialmente ototossici (aminoglicosidi, metronidazolo, furosemide, clorexidina, iodopovidone etc.) (Oliver et al., 1997 ; Mansfield, 1988).

I dati che compongono il segnalamento dell'animale presentano spesso una notevole utilità diagnostica. I cani con le orecchie pendenti, ad esempio, sono molto predisposti alle infezioni del condotto uditivo esterno, così come quelli che presentano delle stenosi congenite del condotto (chow chow, bulldog inglese, shar pei) (Rosychuk e Luttgen, 2000). I gatti con le orecchie depigmentate che vivono all'aperto sono spesso colpiti da dermatite solare e da carcinomi squamocellulari a carico della pinna. I cani anziani sono maggiormente colpiti dalla sindrome vestibolare periferica idiopatica. Infine possiamo ricordare le "malattie professionali" dei cani da caccia e dei cani da salvataggio in mare, che sono: le otiti esterne iperacute da corpo estraneo (ad esempio ariste di graminacee) per i primi, e le otiti esterne favorite dall'aumentata umidità interna al condotto per i secondi e per i cani nuotatori in genere.

Esame obiettivo generale

Molte sono le informazioni utili che possiamo ottenere dall'esame obiettivo generale. Valutando, ad esempio, lo stato di nutrizione si possono evidenziare cali di peso conseguenti ad anoressia o a vomito, che sono sintomi talvolta associati a patologie otologiche acute e possono sfuggire al proprietario. Il sensorio può essere normale o leggermente depresso, oppure eccitato nelle forme più dolorose. Di frequente riscontro sono gli atteggiamenti particolari della testa e del tronco. La testa viene spesso tenuta inclinata verso il lato colpito in molte malattie dell'orecchio; movimenti di maneggio e di rotolamento verso il lato colpito sono frequentemente associati a otiti interne o a forme vestibolari idiopatiche. Una mancanza di simmetria della faccia si evidenzia talvolta per la paralisi del facciale e/o per la comparsa della sindrome di Horner (miosi, enoftalmo, ptosi palpebrale, procidenza della terza palpebra) nelle otiti medie-interne monolaterali, poiché sia il nervo facciale che le fibre simpatiche che innervano l'occhio passano molto vicino all'orecchio medio e a quello interno. Nelle otiti più gravi si può avere rialzo febbrile e aumento di volume dei linfonodi regionali. Un interessamento linfonodale si può riscontrare anche nei processi neoplastici a carico dell'orecchio.

Esame clinico dell'orecchio

Si inizia ispezionando esternamente l'orecchio alla ricerca di lesioni da grattamento o scuotimento (aree alopeciche; otoematomi), malformazioni congenite, lesioni infiammatorie o parassitarie, neoformazioni. Nel caso si riscontri la presenza di processi infiammatori bisogna valutare se le lesioni sono riferibili ad un processo iperacuto-acuto o ad un processo subacuto-cronico. Nel primo caso la faccia interna della pinna si presenterà calda ed arrossata, nel secondo caso l'epitelio sarà più o meno iperplastico fino alla lichenificazione ed iperpigmentazione che si evidenziano nelle forme croniche più gravi (figura 2).



Figura 2. Particolare dell'orecchio esterno di un cocker spaniel americano di 9 anni con otite purulenta cronica. Da notare l'aspetto "a cavolfiore" dovuto all'iperplasia tissutale e la presenza di essudati purulenti.

Successivamente si passa all'esame otoscopico del condotto e della membrana timpanica; in molti casi questo esame deve essere effettuato con l'animale sedato o in anestesia generale. E' necessario osservare il condotto per tutta la sua lunghezza, per individuare la presenza di eventuali arrossamenti, vescicole, ulcere, neoformazioni, corpi estranei, quantità abnormi di cerume e/o essudati. Spesso nelle otiti esterne la presenza di questi ultimi impedisce l'ispezione del condotto e del timpano, è necessario quindi effettuare una pulizia del condotto prima dell'esame otoscopico. E' importante in questi casi fare almeno due prelievi di questo materiale con tamponi sterili dalla porzione orizzontale del condotto, prima di effettuare i lavaggi. Il materiale così prelevato verrà utilizzato per allestire dei vetrini ed eventualmente per effettuare una coltura batterica con antibiogramma. Un'idea abbastanza precisa del tipo di agente eziologico la si può avere, nelle otiti esterne, già osservando questi essudati. Le otiti parassitarie da *Otodectes cynotis* sono caratterizzate infatti da un cerume bruno-nerastro, granuloso; mentre le otiti batteriche presentano solitamente essudati purulenti maleodoranti, di colore che può andare dal giallo, nelle forme da strepto-stafilococchi, a verdastro, nelle forme da *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp. La presenza, invece, di un cerume giallo-marrone di aspetto ceroso si può ricondurre di solito ad infezione da lieviti o a disordini della cheratinizzazione (Guaguère, 1985; Noxon, 2000). All'esame otoscopico della membrana timpanica si possono rilevare perforazioni, alterazioni del colore e della tensione. Una colorazione blu si riscontra nelle emorragie, rossa nelle otiti medie acute, bianca nelle otiti medie purulente, ambrata quando vi sono essudati sierosi nell'orecchio medio (Shell, 2000). La faccia esterna del timpano da concava diviene convessa quando si ha accumulo di materiale nell'orecchio medio (di solito sangue o essudati).

L'ultima parte dell'esame obiettivo particolare dell'orecchio consiste nella palpazione, per evidenziare la presenza di ematomi, ascessi, neoformazioni, e dolorabilità a carico dell'orecchio esterno e dell'articolazione temporo-mandibolare. Nelle otiti esterne croniche è di frequente riscontro un'ossificazione delle cartilagini del condotto.

In tutti i casi in cui si sospetta una patologia a carico dell'orecchio medio e/o dell'orecchio interno è necessario effettuare l'esame neurologico, dal momento che in prossimità di queste strutture passano anche il nervo facciale, le fibre simpatiche che innervano l'occhio e le fibre parasimpatiche che innervano le ghiandole lacrimali, oltre, ovviamente, all'VIII nervo cranico (vestibolococleare). Segni di paralisi del facciale sono, ipsilateralmente, l'abbassamento dell'orecchio e dei labbri, la paralisi della narice, la perdita della saliva, l'assenza del riflesso palpebrale e corneale. La compromissione delle fibre oculosimpatiche è abbastanza frequente nelle otiti medie-interne e determina la comparsa della sindrome di Horner (miosi, ptosi palpebrale, enoftalmo e procidenza della terza palpebra) (figura 3). L'interessamento delle fibre parasimpatiche che innervano le ghiandole lacrimali può portare a cheratite secca; la produzione di lacrime viene misurata mediante il test di Schirmer. Deficit dell'VIII nervo cranico si riscontrano nelle patologie dell'orecchio interno e sono caratterizzati dalla sindrome vestibolare periferica e da sordità parziale o totale. Nella sindrome vestibolare periferica si ha solitamente: nistagmo spontaneo orizzontale o rotatorio con la fase rapida diretta verso il lato opposto rispetto alla lesione, testa ruotata rispetto al suo asse longitudinale verso il lato lesionato, atassia asimmetrica senza segni di paresi, nistagmo fisiologico ridotto od assente. La capacità uditiva non si riesce solitamente a valutare clinicamente, a meno che non ci sia una sordità completa bilaterale. E' importante valutare la funzionalità anche degli altri nervi cranici, i riflessi spinali e le reazioni posturali, per poter differenziare la sindrome vestibolare periferica dalla sindrome vestibolare centrale. In quest'ultima infatti sono solitamente riscontrabili deficit a carico di altri nervi cranici, e disfunzioni motorie e/o atassie sensoriali a carico degli arti (Oliver et al., 1997; Shell, 1988).



Figura 3. Sindrome di Horner sinistra in un Setter con otite esterna/media cronica.

Indagini collaterali

Le procedure diagnostiche collaterali impiegate nelle patologie otologiche sono: l'esame citologico, gli esami colturali e l'antibiogramma, la diagnostica per immagini, la miringotomia, l'esame biotico e gli esami di laboratorio.

L'esame citologico è una procedura rapida e molto utile in tutti i casi di otite esterna. Questo esame si esegue prelevando con un tampone del materiale dal tratto orizzontale del condotto; quindi si fa rotolare il tampone su un vetrino portaoggetti. Conviene preparare in questo modo due vetrini, uno dei quali verrà esaminato direttamente al microscopio senza colorazione, l'altro invece verrà colorato. Diverse colorazioni possono essere utilizzate; la più impiegata è la colorazione di Wright modificata (Diff-Quick) (Chickering, 1988). Il vetrino non colorato viene esaminato a basso ingrandimento per evidenziare la presenza di parassiti (soprattutto *Otodectes cynotis*) (vedi figura 4), in quello colorato si vanno a cercare e a valutare le componenti non cellulari, quelle cellulari (cellule di sfaldamento, cellule infiammatorie etc.) e gli agenti infettivi (batteri, lieviti, funghi). L'esame citologico consente la differenziazione tra batteri gram-positivi, che hanno la forma di cocci e sono soprattutto stafilococchi e streptococchi, e batteri gram-negativi, che si presentano come bastoncelli corti, rappresentati da *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. (figura 5 e 6).



Figura 4. *Otodectes cynotis* (×100).

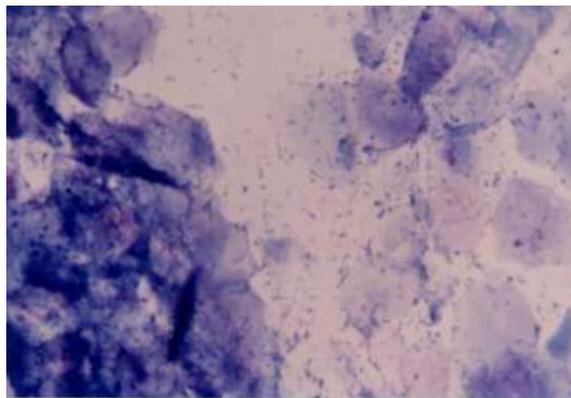


Figura 5. Esame citologico di cane con otite purulenta cronica. Si notano molti batteri sia cocchiiformi che bastoncellari e numerose cellule di sfaldamento. All'esame culturale è stato isolato *Pseudomonas*. (Colorazione May-Grünwald Giemsa; $\times 600$).

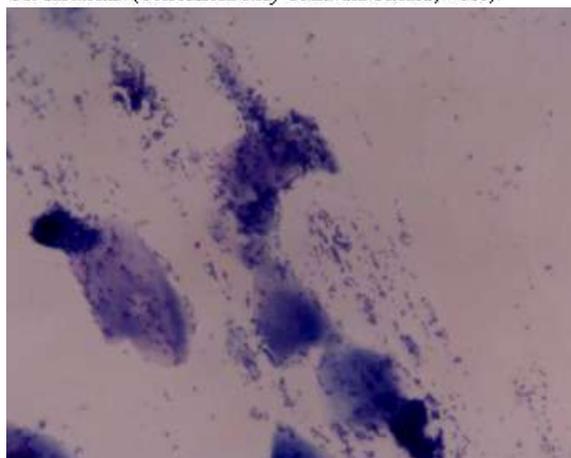


Figura 6. Essudato settico contenente cocci, bastoncelli e cellule di sfaldamento. All'esame culturale è stato isolato *Proteus* e *Staphylococcus epidermidis*. (May-Grünwald Giemsa; $\times 600$).

Altri microrganismi frequentemente isolati nelle otiti sono i lieviti (soprattutto *Malassezia pachydermatis*), che si presentano di forma ovale con gemme a base ampia, che originano dalle estremità delle cellule madri, e che conferiscono loro un aspetto tipico ad "arachide" (figura 7). Dal momento che sia la *Malassezia* che alcuni cocci possono essere isolati anche da orecchie normali, è necessario che siano presenti in numero elevato per poter essere considerati causa primaria di otite. La presenza di leucociti, soprattutto neutrofili, conferma la patogenicità di qualsiasi microrganismo venga ritrovato. I macrofagi si riscontrano soprattutto nelle otiti croniche.

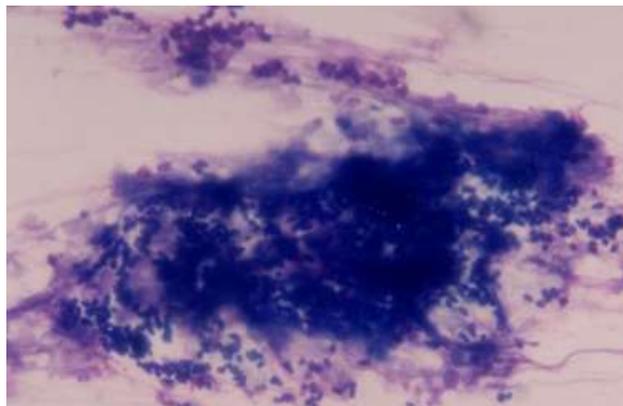


Figura 7. Esame citologico di gatto con otite ceruminosa. Si evidenziano numerosi lieviti (*Malassezia pachydermatis*) e molti neutrofili degenerati. (May-Grünwald Giemsa; $\times 600$).

L'identificazione, mediante esame citologico, dei diversi tipi di microrganismi che possono essere responsabili di otite è di fondamentale importanza ai fini terapeutici e prognostici. Nel caso si riscontri la presenza di una quantità eccessiva di detriti cheratinici e/o di cerume in assenza di batteri o lieviti va sospettata la presenza di atopia, endocrinopatie, seborrea primaria o ipersensibilità alimentare (Chickering, 1988, Kowalski, 1988). L'esame citologico risulta molto utile anche nelle forme neoplastiche a carico dell'orecchio esterno.

Gli esami colturali e l'antibiogramma sono indicati in tutti i casi di otite grave già trattata senza risultati, o recidivante; soprattutto se all'esame citologico è stata rinvenuta la presenza di batteri di forma bastoncellare (gram-negativi). *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. sono infatti agenti eziologici di otite difficili da contrastare, che sviluppano resistenza agli antibiotici con notevole frequenza (Kowalski, 1988).

Gli esami radiografici sono impiegati soprattutto: nelle otiti esterne e/o medie croniche, nelle malformazioni congenite o acquisite (atresia del condotto auditivo esterno), nelle neoplasie del condotto e dell'orecchio medio, per valutare l'integrità del timpano quando questo non è ben visibile all'esame otoscopico, e nelle sindromi vestibolari periferiche, per visualizzare una eventuale otite media che può far supporre la presenza anche di un'otite interna (Guaguère, 1985; Shell, 1988). Le proiezioni utilizzate sono la ventrodorsale o la dorsoventrale, la laterale obliqua e la frontale a bocca aperta (figure 8-9-10); l'animale deve essere posto in anestesia. In alcuni casi è necessario immettere del mezzo di contrasto acquoso nel condotto auditivo per delineare le dimensioni del canale o per evidenziare rotture del timpano (Trower et al. 1998). Un'ossificazione delle cartilagini del condotto è spesso visibile nelle otiti esterne croniche nella proiezione ventrodorsale o dorsoventrale; se piene di liquido, tessuto di granulazione o proliferazioni neoplastiche, le bolle timpaniche presenteranno una radiopacità aumentata, soprattutto nella proiezione obliqua laterale e frontale a bocca aperta. Sempre in queste proiezioni si può vedere un ispessimento della parete della bolla timpanica, nelle otiti medie croniche, e la lisi delle bolle nell'osteomielite e nelle neoplasie (Shell, 1988). L'assenza di alterazioni radiologiche non esclude la presenza di otite media.

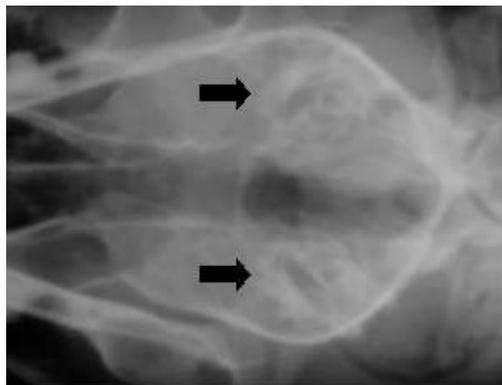


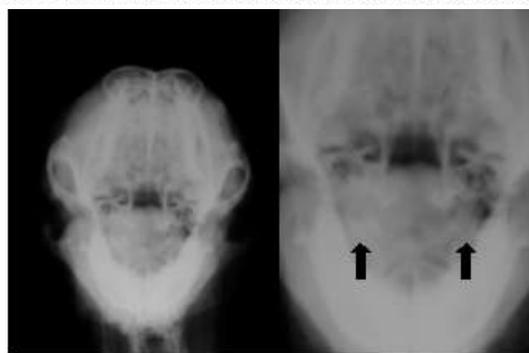
Figura 8. Rx cranio in proiezione dorsoventrale. Bolle timpaniche normali (freccie).



A

B

Figura 9. A: Rx del cranio di un gatto in proiezione laterale obliqua sinistra; B: particolare dell'immagine precedente con in evidenza le bolle timpaniche (freccie).



A

B

Figura 10. A: Rx del cranio di un cane in proiezione frontale a bocca aperta; B: particolare delle bolle timpaniche (freccie).

La risonanza magnetica nucleare (RMN) e la tomografia assiale computerizzata (TAC) sono tecniche di diagnostica per immagini che forniscono informazioni più precise sulle alterazioni anatomiche dell'orecchio (figura 11) .

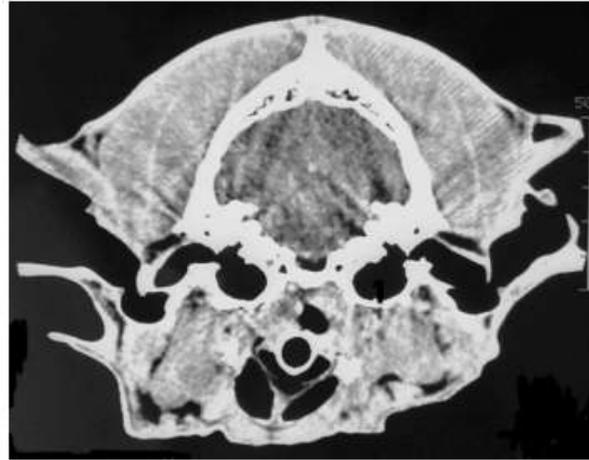


Figura 11. Immagine tomografica (TAC) del cranio. Scansione coronale in cui è apprezzabile l'aspetto normale delle strutture auricolari del cane.

La miringotomia è una procedura allo stesso tempo diagnostica e terapeutica che si attua nei casi di sospetta otite media. Consiste nell'introduzione di un ago spinale di 20 o 22 gauge attraverso il timpano, nella porzione posteroinferiore, nella bolla timpanica. Quindi si aspirano gli essudati presenti, o si fa un lavaggio con soluzione salina sterile. Il campione così ottenuto viene sottoposto ad esame citologico, a coltura batteriologica ed ad antibiogramma. La piccola apertura creata nella membrana timpanica si chiude in un paio di settimane. Nel caso la membrana timpanica sia già rotta, si può prelevare il materiale da esaminare direttamente dall'orecchio medio (Rosychuk e Luttgen, 2000; Bernardini, 1996).

L'esame bioptico può fornire in molti casi una diagnosi precisa come: nei polipi, nelle neoplasie e nelle malattie autoimmuni della pelle che colpiscono l'orecchio esterno (Rosser, 1988).

L'esame emocromocitometrico, i profili biochimici sierici, l'esame delle urine, i test endocrini, i test allergici sono esami di laboratorio utilizzati per evidenziare la presenza di patologie predisponenti o primarie dell'orecchio.

Test audiometrici

I test audiometrici più utilizzati in medicina veterinaria sono: la timpanometria, la riflessometria stapediale e i potenziali evocati auditivi del tronco encefalico (BAEP). Questi esami trovano impiego nella pratica clinica soprattutto nella diagnosi di sordità.

La valutazione comportamentale dell'animale in risposta a stimoli sonori diversi per tipo ed intensità, anche se effettuata in modo preciso e da persone esperte, consente, infatti, solo una grossolana individuazione dei soggetti completamente sordi in tutte e due le orecchie. Gli esami audiometrici invece permettono di diagnosticare anche i deficit acustici parziali e/o monolaterali, e, cosa ancor più importante, permettono di localizzare la lesione con notevole precisione.

Si definisce sordità di conduzione quella dovuta ad un'alterazione nella trasmissione e/o trasduzione del suono nell'orecchio esterno o medio; questa condizione si realizza ad esempio quando il condotto è ostruito, la membrana timpanica o la catena degli ossicini sono rotte o sclerotizzate, oppure c'è del materiale nell'orecchio medio. I deficit acustici di questo tipo sono spesso risolvibili, almeno in parte, con l'utilizzo di interventi terapeutici adeguati.

La sordità causata da alterazioni del labirinto acustico, dei recettori della coclea, o di qualsiasi altra componente della via uditiva, dal nervo cocleare fino alla corteccia acustica, viene definita neurosensoriale; si tratta, in questi casi, di deficit solitamente permanenti.

La timpanometria è una metodica che consente di determinare la funzionalità dell'orecchio medio, misurandone la compliance al variare della pressione aerea nel condotto auditivo esterno. La compliance è l'inverso dell'impedenza, si misura in cm^3 , e, in questo caso, indica la "mobilità" delle strutture che compongono l'orecchio medio.

Questo test si pratica inserendo nel condotto acustico dell'animale una sonda di dimensioni adatte, in modo da chiudere ermeticamente l'orecchio esterno. Questa sonda è attraversata da tre tubicini: il primo invia un'onda acustica continua a bassa frequenza (220 Hz), di 90 dB SPL di intensità; il secondo è collegato a un sistema pneumatico che modifica la pressione dell'aria nel condotto portandola gradualmente da +200 mm H₂O a -200 mm H₂O; il terzo è collegato a un microfono che registra il suono che viene riflesso indietro nel condotto dal timpano. L'entità di questo suono è inversamente proporzionale alla compliance, in quanto maggiore è la mobilità (compliance) dell'orecchio medio, maggiore sarà la sua capacità di trasmettere il suono alla coclea, e minore la parte del suono riflessa indietro nel condotto. Viceversa, un orecchio medio più rigido (con compliance minore) accetterà meno suono, e ne rifletterà di più.

Le variazioni di compliance conseguenti al modificarsi della pressione nel condotto acustico vengono riportate su un sistema di assi cartesiani, e vanno a costituire il timpanogramma (figura 12), che nei soggetti normali ha un profilo a V rovesciata; si parla in questi casi di timpanogramma di tipo A. La compliance massima si ha, infatti, quando la pressione nell'orecchio medio è contrastata da una pressione nell'orecchio esterno uguale ed opposta, e questo accade per pressioni esterne intorno a 0 mm H₂O; man mano che la pressione esterna si allontana dallo 0, in positivo o in negativo, il valore di compliance diminuisce. Un tracciato appiattito, detto di tipo B, si riscontra nella sclerosi del timpano e della catena degli ossicini, nel caso di presenza di fluidi nell'orecchio medio (ad esempio per un'otite media) o di un eccesso di cerume nel condotto, e nelle perforazioni del timpano. Il timpanogramma presenta il picco spostato a sinistra (verso valori negativi di pressione) nel caso vi sia una depressione endotimpanica dovuta a una disfunzione della tuba di Eustachio o ad un'anomalia dell'orecchio medio; in questi casi si parla di tracciato di tipo C (Sims, 1988; Lefebvre, 1993; Colletti e Sittoni, 1993). Le anomalie timpanometriche stanno ad indicare una sordità di conduzione.

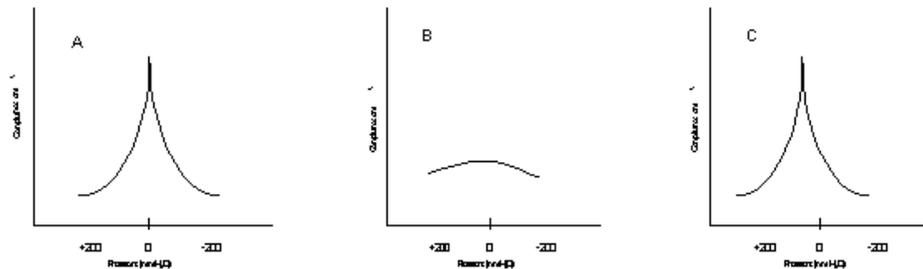


Figura 12. Esempi di tracciati timpanometrici; vedi spiegazione nel testo.

La riflessometria stapediale registra le modificazioni di impedenza che si realizzano in seguito alla contrazione del muscolo stapedio. L'impedenza, come riportato in precedenza, è l'inverso della compliance, e sta ad indicare la "rigidità" dell'orecchio medio. Il riflesso stapediale esercita un'azione protettiva attenuando la trasmissione di suoni molto intensi all'orecchio medio. Questo arco riflesso inizia dai recettori della coclea, raggiunge tramite il nervo acustico i nuclei cocleari e il complesso olivare superiore, e prende quindi sinapsi bilateralmente con il nucleo motore nel nervo facciale. Sono le fibre efferenti di quest'ultimo che innervano il muscolo stapedio; la contrazione si ha quindi in tutte e due le orecchie (Colletti e Sittoni, 1993).

Questo test si effettua fornendo all'orecchio in cui è inserita la sonda o al controlaterale uno stimolo acustico di intensità da 70 a 120 dB SPL, di frequenza 1000, 2000 Hz o maggiore, e di 1 secondo di durata. L'intensità dello stimolo viene aumentata di 10 dB fino all'apparire di una risposta, che consiste in una variazione di impedenza nell'orecchio in cui è presente la sonda (figura 13). I parametri esaminati sono soprattutto: la soglia, che è l'intensità di stimolazione minima capace di evocare una variazione di impedenza registrabile, la latenza e l'ampiezza. Questo esame permette di valutare la funzionalità dell'orecchio medio, interno, dei nuclei e del nervo VIII dell'orecchio stimolato, e di alcuni nuclei del tronco encefalico (compreso il facciale), del nervo facciale e dell'orecchio medio del lato in cui si effettua la registrazione. Questo è un test, quindi, che trova impiego non solo nello studio della sordità o nelle patologie otologiche, ma anche in alcune malattie neurologiche.

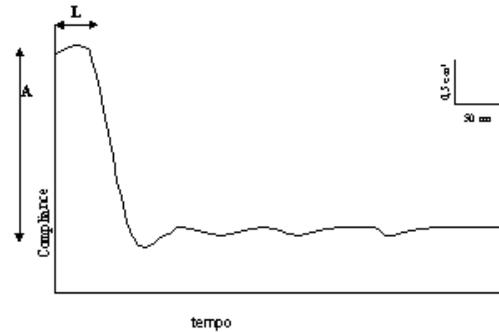


Figura 13. Esempio di riflesso acustico ipsilaterale in seguito all'applicazione di uno stimolo di 100 dB SPL. A = ampiezza;

Una volta verificata la presenza del riflesso acustico si può completare l'esame di questo riflesso attuando la ricerca dei fenomeni adattativi perstimolatori (decay test di Anderson). Si effettua una stimolazione simile alle precedenti per frequenza, di intensità 10 dB superiore alla soglia, e di 10 secondi di durata. In un soggetto normale, a una frequenza di 1000 Hz, l'ampiezza della risposta si riduce di meno del 6% durante i 10 secondi della stimolazione. In caso di patologie come: myasthenia gravis, ipotiroidismo, traumi dell'VIII nervo cranico, traumi sonori della coclea, o neurinomi acustici, la riduzione di ampiezza della risposta è molto maggiore e più precoce (Lefebvre, 1993; Sims, 1988).

I potenziali evocati auditivi del tronco encefalico, spesso indicati anche con l'acronimo BAEP (brainstem auditory-evoked potentials) o BAER (brainstem auditory-evoked response), rappresentano il test audiometrico più impiegato in medicina veterinaria. Questo esame verifica la capacità uditiva del soggetto, attraverso la registrazione dell'attività elettrica lungo la via acustica evocata da uno stimolo uditivo.

La stimolazione può essere acustica oppure ossea, nel primo caso si impiega un suono secco (click), che viene inviato all'orecchio esterno mediante cuffie audiometriche; nel caso della stimolazione ossea, lo stimolo è di tipo vibratorio, e viene applicato mediante un trasduttore direttamente sul cranio. La stimolazione ossea attiva direttamente la coclea, bypassando l'orecchio esterno e medio.

La registrazione viene effettuata mediante elettrodi ad ago infissi nel sottocute della testa e del collo, secondo configurazioni standardizzate (Dondi e Bianchi, 1997). Il tracciato registrato è costituito da una serie di 5-7 onde, che corrispondono a variazioni del potenziale di campo elettrico nei 10 millisecondi (ms) successivi alla stimolazione (Figura 14). Si fa una media dei potenziali registrati dopo almeno 500 stimolazioni; in questo modo si ottengono tracciati "ripuliti" dal rumore elettrico di fondo. Ogni onda corrisponde ad una precisa struttura nervosa, dai recettori acustici (I onda) fino alle radiazioni uditive che raggiungono la corteccia (VII onda) (Dondi e Bianchi, 1997). Valutando la presenza delle onde e la loro latenza (tempo in ms che le separa dallo stimolo) è possibile evidenziare in modo obiettivo i deficit acustici, localizzando anche la sede della lesione. Si può stabilire inoltre la soglia uditiva del paziente, che è la più bassa intensità di stimolazione, espressa in dB, in grado di dare origine ad un'onda V registrabile (Steiss et al., 1990).

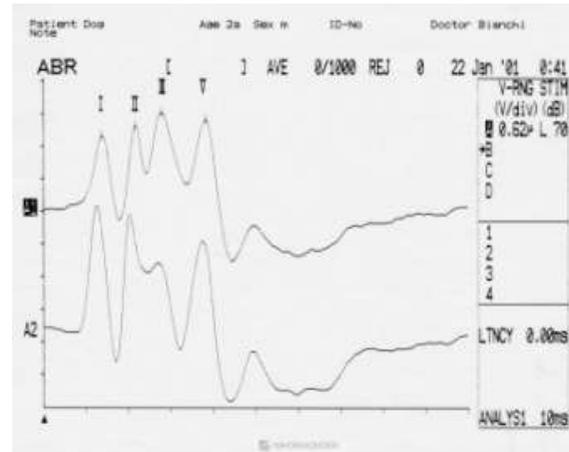


Figura 14. Esempio di BAEP normale, registrato dopo stimolazione acustica dell'orecchio sinistro in un cane di 2 anni. I due tracciati riportati rappresentano registrazioni effettuate in contemporanea impiegando derivazioni diverse. Nel tracciato in alto sono identificate le onde di impiego clinico più frequente; l'onda IV non è visibile perché fusa alla V.

La registrazione dei BAEP acustici e ossei sullo stesso paziente permette di differenziare le sordità neurosensoriali, che presentano tracciati fortemente alterati o addirittura piatti con tutte e due le stimolazioni, da quelle di conduzione, caratterizzate da BAEP ossei normali e da BAEP acustici alterati (figura 15). Le sordità acquisite neurosensoriali possono essere dovute a presbiacusia, cioè degenerazione progressiva dei recettori nei soggetti anziani, oppure ad ototossicità, ad esempio da antibiotici aminoglicosidi, o anche a otiti interne. Le sordità acquisite di conduzione sono dovute ad alterazione della pervietà del condotto, o a lesioni del timpano e della catena degli ossicini, e sono conseguenza solitamente di otiti croniche, neoplasie, traumi o fenomeni di senescenza. Le sordità congenite rappresentano un'evenienza frequente in alcune razze di cani (dalmata, setter inglesi, bull terrier, border collie etc.) e di gatti a mantello bianco e con gli occhi azzurri, e sono dovute a una degenerazione delle strutture recettoriali (figura 16). I BAEP sono molto impiegati in queste razze nella diagnosi precoce di sordità, in quanto già a 50 giorni di vita è possibile individuare con notevole accuratezza i soggetti colpiti.

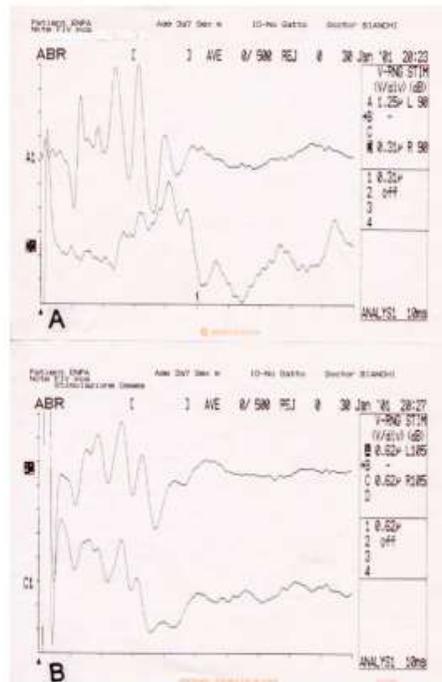


Figura 15. Gatto con sordità di conduzione destra conseguente ad otite parassitaria e sterna-media monolaterale destra e perforazione del timpano. A: BAEP acustici. Da notare l'alterazione del tracciato destro (in basso) confrontato con il sinistro normale (in alto). B: BAEP ossei. I tracciati dopo stimolazione ossea sono normali sia a sinistra (in alto) che a destra (in basso).

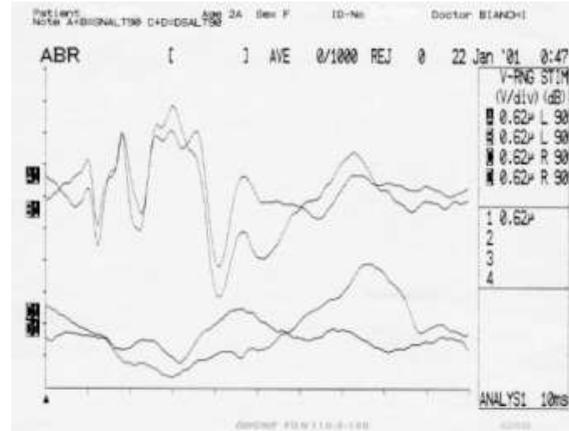


Figura 16. BAEP registrati dopo stimolazione acustica delle due orecchie con "click" di 90 dB NHL in un cane dalmata di 2 anni affetto da sordità unilaterale destra congenita. Le due tracce in alto (orecchio sinistro) sono normali, mentre quelle in basso, corrispondenti all'orecchio destro, non presentano alcuna onda riconoscibile.

I BAEP sono utilizzati anche nei casi di sindrome vestibolare, nella differenziazione tra forme centrali e forme periferiche. In queste ultime spesso il tracciato è piatto, mentre nelle forme centrali la parte del tracciato alterata è quella che viene dalla onda II in poi.

Conclusioni

Le malattie otologiche sono evenienze molto frequenti nella pratica clinica degli animali d'affezione. L'approccio a questi problemi deve avvenire seguendo un iter diagnostico preciso, modulato di volta in volta sulla base dei riscontri all'esame obiettivo generale e all'esame clinico dell'orecchio.

Buona parte delle indagini collaterali richieste sono praticabili presso molte strutture veterinarie (esame citologico, Rx, miringotomia, esami di laboratorio), altre presso numerosi laboratori di riferimento (esami colturali e antibiogramma, esami istologici dei campioni biotici). Esami collaterali particolari quali la TAC, la RMN e i test audiometrici sono veramente indispensabili solo in alcune patologie a carico dell'orecchio interno e del medio. Comunque, queste attrezzature specialistiche, un tempo impiegate solo in medicina umana, cominciano oggi ad essere disponibili anche presso alcuni centri di riferimento per la neurologia veterinaria.

Viste le caratteristiche anatomiche e di sensibilità dell'orecchio, e il tipo di procedure diagnostiche comunemente utilizzate (otoscopia, miringotomia, radiografie in proiezione frontale a bocca aperta etc.) risulta evidente la necessità dell'impiego almeno della sedazione, se non dell'anestesia generale. Una volta "addormentato" l'animale, si potranno effettuare tutte le indagini diagnostiche necessarie, ed eventualmente anche le terapie mediche o chirurgiche specifiche.

Si potrà obiettare che in alcune patologie più banali, quali le otiti esterne, un simile approccio è ingiustificato. Senz'altro, nelle patologie meno gravi a carico del condotto esterno e della pinna l'impiego dell'anestesia non è sempre necessario. Diventa però obbligatorio in tutti i casi di malattie dell'orecchio esterno recidivanti, o con presenza di fattori predisponenti all'insorgenza di forme croniche, o comunque in tutti quei soggetti in cui non si riesce ad effettuare una visita clinica completa da svegli.

Un approccio diagnostico di questo tipo consentirà in molti casi di raggiungere una diagnosi precisa, e quindi di adottare gli interventi terapeutici più adeguati. Nel caso delle forme infiammatorie, che rappresentano senz'altro il capitolo più corposo nella patologia otologica, la diagnosi eziologica permette di ridurre notevolmente i problemi di recidive e di cronicizzazione del processo morboso, eventi purtroppo molto comuni quando si attua una terapia non mirata.

cani e gatti affetti da patologie otologiche. Uno spazio particolare viene riservato all'esecuzione e all'interpretazione di quegli esami diagnostici collaterali che possono essere effettuati nella maggior parte delle strutture veterinarie (esame citologico, esame radiologico, miringotomia, etc.). Vengono quindi presi in considerazione la timpanometria, la riflessometria stapediale e i potenziali evocati auditivi del tronco encefalico (BAEP), che sono test audiometrici impiegati nella valutazione della funzionalità uditiva, e nella determinazione del tipo ed della gravità della sordità eventualmente presente.

SUMMARY - Following a brief review of the anatomy and physiology of the ear, the authors thoroughly discuss the semiology of otological diseases in dogs and cats. Particular emphasis is placed on the complementary examinations that can be performed in most veterinary clinics (cytology, radiology, miringotomy, etc.). Then, they discuss auditory tests: tympanometry, acoustic reflex testing, and brainstem auditory-evoked potentials (BAEP). Those are objective tests, used to assess the auditory function, and to determine the type and degree of deafness that may exist.

Parole chiave: Otologia, semiologia, orecchio, esame citologico, esame radiologico, miringotomia, test audiometrici, cane, gatto.

Key words: Otology, semiology, ear, cytology, radiology, miringotomy, auditory test, dog, cat.

Bibliografia

- GETTY R.: The Sense Organs and Integument: The Ear. In Miller M., Christensen G.C., Evans H.E. (Eds.): Anatomy of the dog - Saunders, Philadelphia, 1964.
- CHIAPPA K.H.: Brain stem auditory evoked potentials: methodology. In: Evoked potentials in clinical medicine - 3rd ed. - Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
- GIULIO L.F.: Organi di senso. In Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F. (Eds.): Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia - UTET, Torino, 1992.
- COLLETTI V., SITTONI V.: Fisiologia del sistema uditivo. In: Otologia clinica - Libreria editrice internazionale, Milano, 1993.
- JENKINS T.W.: Orecchio - udito ed equilibrio. In: Neuroanatomia funzionale dei mammiferi - Edizioni agricole, Bologna, 1989.
- OLIVER J.E., LORENZ M.D., KORNEGAY J.N.: Ataxia of the head and the limbs. In: Handbook of veterinary neurology - 3rd edition - W.B.Saunders, Philadelphia, 1997.
- MANSFIELD P.D.: Preventive ear care for dogs and cats. Veterinary clinics of north america / small animal practice, 18, 845-858, 1988.
- ROSYCHUK R.A.W., LUTTGEN P.: Diseases of the ear. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. (Eds.): Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat - 5th edition - W.B. Saunders, Philadelphia, 2000.
- GUAGUERE E.: Sémiologie de l'oreille externe, de la membrane tympanique et de l'oreille moyenne du chien. Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie, 20, 329-337, 1985.
- NOXON J.O. : Otitis externa. In : Birchard S.J., Sherding R.G. (Eds.) : Saunders manual of small animal practice - 2nd edition - W.B. Saunders, Philadelphia, 2000.
- SHELL L.G.: Otitis media and otitis interna. In : Birchard S.J., Sherding R.G. (Eds.) : Saunders manual of small animal practice - 2nd edition - W.B. Saunders, Philadelphia, 2000.
- SHELL L.G.: Otitis media and otitis interna: etiology, diagnosis, and medical management. Veterinary clinics of north america / small animal practice, 18, 885-900, 1988.
- CHICKERING W.R.: Cytologic evaluation of otic exudates. Veterinary clinics of north america / small animal practice, 18, 773-782, 1988.
- KOWALSKI J.J.: The microbial environment of the ear canal in health and disease. Veterinary clinics of north america / small animal practice, 18, 743-754, 1988.
- TROWER N.D., GREGORY S.P., RENFREW H., LAMB C.R.: Evaluation of the canine tympanic membrane by positive contrast ear canalography. Veterinary record, 142, 78-81, 1998.
- BERNARDINI M.: Oriti e sindrome vestibolare. L'importanza dell'esame otoscopico. Veterinaria, anno 10, n. 4, 51-57, 1996.
- ROSSER E.J.: Evaluation of the patient with otitis externa. Veterinary clinics of north america / small animal practice, 18, 765-772, 1988.
- SIMS M.H.: Electrodiagnostic evaluation of auditory function. Veterinary clinics of north america / small animal practice, 18, 913-944, 1988.
- LEFEBVRE H.P.: Exploration fonctionnelle de l'audition chez le chien: possibilités actuelles. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 28, 105-121, 1993.
- DONDI M., BIANCHI E.: Potenziali evocati uditivi del tronco encefalico nel cane e nel gatto. Annali della facoltà di medicina veterinaria di Parma, XVII, 101-116, 1997.
- STEISS J.E., WRIGHT J.C., STORRS D.P.: Alterations in the brain stem auditory evoked response threshold and latency-intensity curve associated with conductive hearing loss in dogs. P.V.N., 1, 205-211, 1990.

ANSIA DA SEPARAZIONE DEL CANE - SINTOMI, DIAGNOSI DIFFERENZIALE E TERAPIA

Alessandra Scopelliti[°] - Pier
Giovanni Bracchi^{°°}

[°] *Medico Veterinario, e-mail: alevet72@libero.it*

^{°°} *Istituto di Scienze e Tecnologia degli Alimenti
- Facoltà di Medicina Veterinaria - Università
degli Studi di Parma*

Introduzione

Prima di iniziare a parlare di anomalie del comportamento occorre definire cosa si intende quando parliamo di comportamento patologico; un cane che costituisce un problema per un padrone può non costituirlo per un altro, anche se presenta con entrambi lo stesso tipo di comportamento [5].

Questa affermazione ci porta obbligatoriamente all'analisi del contesto ambientale in cui l'animale vive. Non tutti i cani posti nelle medesime situazioni e sottoposti agli stessi stimoli reagiscono però allo stesso modo; occorre perciò inserire anche la componente genetica.

L'approccio della Medicina Comportamentale Veterinaria non risulta uniforme, ma può presentarsi diverso da un Paese all'altro.

Occorre puntualizzare che attualmente esistono due grandi tendenze: quella latina, e quella anglo-americana [30].

La scuola latina, raggruppa ricercatori francesi, spagnoli, ecc. come Patrick Pageat ed altri. Questi affrontano i disturbi comportamentali sotto un profilo medico ed etologico, cercando di evidenziare il grado di disorganizzazione delle funzioni comportamentali.

Con il termine patologico si intende, in questo contesto, qualsiasi comportamento che abbia perduto la sua capacità di adattamento, ovvero il soggetto si è "cristallizzato" in una risposta che non cambia a seconda delle situazioni, ma rimane per così dire rigida. Tale comportamento, perdura nel tempo, in quanto incapace di tornare spontaneamente ad una situazione di equilibrio.

La scuola anglo-americana, invece, presenta un approccio behaviourista, che considera i comportamenti alterati solo come risposte inopportune che sono state rafforzate dall'ambiente. Importanti, risultano allora i periodi critici dello sviluppo del cucciolo o particolari atteggiamenti da parte del proprietario, o stimoli ambientali, che vengono poi rafforzati in maniera positiva o negativa.

Secondo tale corrente, i problemi possono anche derivare dal modo in cui il cane scarica le tensioni create dalle frustrazioni di un comportamento innato od appreso, e ciò che predispone un soggetto più di un altro ad incorrere in tali problemi è la sua capacità o incapacità di adattarsi a particolari condizioni di stress [7].

Che un cane costituisca un problema viene accertato dal suo padrone o da coloro che devono interagire con lui, ma sta al medico veterinario, inquadrare secondo protocolli prestabiliti se si tratta di uno stato patologico del cane o di una mancanza d'educazione dello stesso. Da qui l'importanza di studiare il soggetto collocandolo però nel suo ambiente, in modo da creare un profilo riportabile sì a modelli esistenti, ma nel suo genere unico ed esclusivo.

Disturbi legati alla separazione

Il termine di ansia da separazione viene utilizzato genericamente per descrivere tutti i fenomeni ansioso-frenetici o ripetitivi che compaiono quando i cani vengono lasciati da soli (isolamento sociale).

Essendo il cane un animale altamente sociale si può facilmente immaginare come i nostri amici a quattro zampe, tollerino questa situazione di malavoglia.

Quando ciò avviene è comprensibile che gli animali manifestino forme di attesa ansiosa per il ricongiungimento del/i partner sociali (canini o umani).

In questo senso tale stato d'ansia è da considerarsi perfettamente normale e risulta più accentuato in cani predisposti geneticamente.

Quando l'ansia assume però, delle dimensioni spropositate e maladattative, ecco che diviene patologica manifestandosi con sintomi e problematiche ben definite.

Sulla base di quanto detto, possiamo distinguere varie forme di ansia da separazione [23].

Forme generiche

Quando un animale è lasciato troppo a lungo solo, si possono osservare dei *comportamenti eccessivi*, legati allo stato d'ansia che scatena un comportamento specificatamente rivolto verso l'ambiente, al fine di ridurre la tensione interna.

Tale comportamento può comprendere: un aumento dell'attività fisica, vocalizzazione e distruzione.

La degenerazione di tali comportamenti, in senso patologico, può portare oltre alla strumentalizzazione, alla comparsa d'attività sostitutive che possono aggravare il quadro comportamentale con complicazioni fisiche, come ad es. la self-mutilation.

Forme di origine traumatica

Può accadere che durante i periodi d'isolamento, i cani sperimentino episodi di *forte paura o fobia*, ad es. per forti detonazioni, temporali, ecc.. In tal caso, all'ansia

provocata dall'isolamento possono sommarsi e/o associarsi, in maniera patologica, delle crisi di panico; le distruzioni assumono allora un carattere decisamente più caotico e devastante; compaiono inoltre manifestazioni neurovegetative come urinazione e defecazione.

Forma degenerativa

Quando l'ansia da separazione compare in *cani anziani* (di solito superiori ai 10 anni) che precedentemente si presentavano indipendenti, è solitamente attribuita ad involuzione senile.

Si tratta di un processo patologico che oltre a disfunzioni somatiche, presenta concomitanti alterazioni comportamentali che si possono considerare come sviluppo di processi involutivi già insiti nell'animale.

Di maggior rilievo sono gli aspetti legati all'aggressività e/ o a forme di depressione.

Forme affettive primarie e secondarie

Sono le forme più tipiche e più severe di ansia da separazione, tanto che alcuni studiosi hanno proposto di riservare tale denominazione esclusivamente a questa categoria di comportamenti da separazione [30].

Si tratta di processi patologici la cui causa va ricercata principalmente nei fenomeni di iperattaccamento primario e secondario.

L'iperattaccamento primario si sviluppa nelle primissime fasi della vita del cucciolo ed è appunto legato ad un errato periodo della socializzazione, nel quale non viene attuato il distacco del giovane animale. Questo trasferisce, proiettandolo, il legame materno ad uno o più partner sociali, di solito uno o più proprietari, ma a volte anche altri cani.

I soggetti che ne soffrono trascorrono gran parte del loro tempo incollati alle figure affettive di riferimento,

effettuando eventualmente un'esplorazione ambientale così detta "a stella", tipica dei cuccioli che presentano come fulcro la madre.

Pageat [26] tende a dare maggior peso al grado di maturità raggiunto dal cane in esame, oltre alla presenza di una figura umana alla quale il cane è fortemente legato.

La sua teoria condivisa dalla comunità veterinaria francese, si basa sulla premessa che un cucciolo trasferisce il suo affetto dalla madre al proprietario o a un'altra figura umana a cui è affezionato e che quindi rimane in uno stato immaturo, potenzialmente candidato a problemi di ansia da separazione [39].

Le manifestazioni di quest'ansia sono simili a quelle di origine traumatica, molto esacerbate e debilitanti. Occorre una buona anamnesi per individuare oltre alla sintomatologia anche l'origine di tale fenomeno, in modo da affrontarlo nella maniera più corretta ed efficace possibile.

Le forme di *iperattaccamento secondario*, e di conseguenza l'ansia da separazione, possono invece manifestarsi anche nei cani adulti che in passato non presentavano tali problemi.

Si tratta più frequentemente di cani riscattati dai rifugi o che hanno avuto una lunga degenza ospedaliera o un'altrettanta lunga convalescenza.

Riguarda infatti due categorie: quei cani che sono stati privati per molto tempo di cure o attenzioni e che si ritrovano ad essere amati ed accuditi premurosamente e quegli animali che ricevono costanti attenzioni e cure per una particolare situazione (per es. convalescenza) [7].

Questa classificazione non è sempre ben mantenuta nelle trattazioni che abbiamo visionato durante la nostra ricerca ed è stato proprio questo il punto che più di ogni altro ha creato dubbi e confusione.

E' vero che tutte queste categorie comportamentali presentano sintomi in comune e molte volte tendono a sovrapporsi le une alle altre; a nostro avviso per un corretto approccio terapeutico oltre alla diagnosi differenziale con altre patologie occorre cercare di definire nel migliore dei modi il problema da trattare.

Definizione di ansia da separazione

L'ansia da separazione è una patologia molto comune segnalata in Europa, Stati Uniti e Canada [27]. Si tratta di un argomento complesso che ha alla base una forte componente ansiogena.

Uno dei più complessi e rilevanti malesseri umani, come l'ansia, non può comparire perfettamente identico nelle altre specie animali, ma certamente deve avere in esso un suo precursore evolutivo.

L'ansia e la paura sono ipotetici stati mentali di cui tutte le persone sane hanno fatto esperienza nella loro vita sociale. Quando però l'ansia diventa estrema, cronica o sproporzionata agli stimoli esterni, possono allora emergere dei disturbi clinici veri e propri, come accade nel 2-4% della popolazione umana [13].

Anche l'ansia, perciò, come la paura diviene patologica quando perde le caratteristiche di reazione misurata (proporzionata) e differenziata (plastica), cioè quando si irrigidisce nell'intensità e nella forma [23].

L'ansia da separazione tende a manifestarsi esclusivamente quando la figura di riferimento del cane non è presente. La separazione può corrispondere ad una reale assenza del proprietario o essere una manifestazione di disagio, di fobia [6] o di frustrazione [22], che viene avvertita dal cane anche quando la sua figura di riferimento si trova in casa, ma non è sotto il suo diretto controllo: come ad es. quando il cane viene lasciato solo in giardino, oppure quando ci si fa la doccia

o ci si corica per il riposo notturno[27].

Il cane che in presenza del proprietario presenta un buon comportamento, tale da sembrare un animale equilibrato, quando si trova da solo urina o defeca o entrambe le cose, si lamenta, ulula, abbaia insistentemente, distrugge, mastica, graffia le porte; certi cani mordono la moquette, rovinano i tappeti, riducono in brandelli pezzi di carta, stoffa, insomma si rivelano dei veri e propri distruttori della casa.

Questi problemi sono spesso visti come dispetti, ripicche o mancanza di obbedienza da parte del cane, ma così non è.

Il termine dispetto include infatti un grado di cognizione che non è stato dimostrato nel cane; nemmeno la disobbedienza è correlabile all'ansia da separazione, così come non lo sono i problemi relativi alla dominanza [40]: un cane sottomesso può presentare questi problemi allo stesso modo di uno dominante.

L'iperattaccamento è una delle cause più significative; l'attaccamento è infatti un comportamento presente nelle specie più evolute ed ha la funzione di mantenere i contatti sociali ed i legami tra gli individui appartenenti ad uno stesso gruppo: studi compiuti su una vasta gamma di specie tra cui i cani [36], le scimmie [14] e gli umani [17], indicano un sistema generale di motivazioni sociali, associate al comportamento e alla separazione.

Il legame tra madre e figlio ne è un esempio estremamente forte; benché vi siano differenze individuali, i piccoli tendono a reagire alla separazione della madre con vocalizzazione ed aumento dell'attività cinetica: tentano di seguirla e si lamentano mettendo in atto determinati atteggiamenti che risultano essere una risposta di distress [20], il cui significato è volto al ricongiungimento con la figura materna.

Tali manifestazioni cessano, infatti, quando la madre ritorna, se la separazione è invece prolungata si possono

manifestare fenomeni di depressione [4,14,36].

I cani che soffrono di iperattaccamento, trascorrono molto tempo incollati alle figure affettive di riferimento e manifestano un comportamento tipico che meglio vedremo nel capitolo deputato alla sintomatologia.

Il termine stesso "ansia da separazione" è universalmente accettato dagli studiosi del settore, perché i comportamenti che ne sono caratteristici, unitamente ai segni ed ai sintomi clinici, riconducono al concetto di ansia, ripreso dalla psichiatria ed adattato alla dimensione veterinaria.

In umana l'ansia può essere definita come l'anticipazione apprensiva di un futuro pericolo o disgrazia, accompagnato da un senso di disforia e/o sintomi somatici di tensione, quali vigilanza e controllo, iperattività del S.N.A. e aumentata attività motoria; il focus ansiogeno può essere insito nell'individuo o esterno ad esso [28].

Esistono varie scuole di pensiero sulla definizione di tale patologia.

Dodman, Martens et al., [6] la classificano come paura o fobia situazionale, riconducendo il concetto di ansia ad uno stato di paura diffuso e persistente che esiste senza una causa o una minaccia evidenti. L'assenza del proprietario o limitati periodi di isolamento infatti, una volta completato lo sviluppo in maniera equilibrata non dovrebbero rappresentare di per se stimoli ansiogeni in un animale non patologico. Il problema in questo caso risulta, anche per loro estremamente connesso ad un errato sviluppo delle fasi di crescita del cucciolo e a processi seguenti di sensibilizzazione.

Pageat, Voith et al. [30], propongono invece una diversa concezione di tali disturbi comportamentali; pur mantenendo la stessa terminologia, l'ansia da separazione viene concepita come un disturbo che pur essendo estremamente stabile nel tempo, si può

presentare in varie forme.

I sintomi, espressione comunque di uno stato ansioso, possono evolvere nel tempo, come passaggio da un'ansia di tipo intermittente caratterizzata da vocalizzazione, comportamenti distruttivi, minzione e defecazione ecc., ad una di tipo permanente, che altera in modo continuo il comportamento del soggetto e si manifesta con uno stato di inibizione associato alla comparsa di attività sostitutive [30].

Tra le possibili cause che originano l'ansia da separazione si annoverano: predisposizione ereditaria, carenza di esperienze precoci, eventi traumatizzanti; inoltre si devono considerare eventuali problemi nella relazione tra cane e proprietario di tipo gerarchico [5], con effetti del rinforzo anche involontario del comportamento del cane, nonché categorie a rischio come cani adottati da rifugi con distacchi traumatici alle spalle [28].

Per ciò che riguarda il concetto della gerarchia espresso da Campbell [5], molti autori [20,40] non concordano, sottolineando che il grado sociale è ininfluenza nella comparsa dell'ansia da separazione.

A nostro avviso, non si tratta tanto di un ruolo di dominanza o meno, ma per quanto emerso dalla letteratura consultata, il tutto va inquadrato nell'ottica di una più marcata definizione dei ruoli, in quanto, ricordiamolo, stiamo parlando di soggetti ansiosi.

E' per questo motivo che gli stessi autori che negano un problema di tipo gerarchico, suggeriscono essi stessi nella terapia comportamentale un corso di obbedienza di base.

Sintomatologia dell'ansia da separazione

Prima di tutto bisogna premettere che per definire tali segni come sintomi di una eventuale patologia, occorre scartare qualsiasi problema di ordine fisico, come

problemi gastro-intestinali, affezioni alle vie urinarie, algie, ecc. Il che risulta relativamente facile tenendo presente che i sintomi dell'ansia da separazione si manifestano essenzialmente quando il cane viene lasciato da solo.

E' infatti durante questo periodo che il soggetto presenta i sintomi più eclatanti di tale patologia con un'intensità variabile in base alla fase evolutiva della malattia.

Trovandosi solo, il cane manifesta il suo stato ansioso, aumentando l'attività esplorativa alla ricerca della sua figura di riferimento con la quale cerca di ricongiungersi in maniera fisica, grattando le porte [15], e mettendo in atto quegli stessi espedienti che il cucciolo utilizza per richiamare la madre:

1. si lamenta, uggiola, abbaia o emette dei latrati potenti e prolungati [40]
2. ricerca indumenti personali del proprietario (calze, scarpe, ecc..) e vi si accanisce, mettendo in atto un'esplorazione tipica del cucciolo che è quella orale
3. distrugge mobili, divani, oggetti vari, arrivando a ridurli in piccoli pezzi

Trattandosi di vere e proprie manifestazioni d'ansia ecco che associati a tali atteggiamenti, risultano concomitanti le manifestazioni autonome come:

4. tachicardia e tachipnea
5. ipersalivazione
6. incontinenza: minzione e defecazione
7. aumento dell'attività gastro-enterica con eventuale vomito o/e diarrea

Molte volte durante l'assenza del proprietario il cane non mangia né beve, ma lo fa solo al suo ritorno [40].

Alcuni possono manifestare coprofagia [40], i cuccioli sono più predisposti a tale problema e a volte l'aggiunta

di una sostanza amara nelle feci, come tecnica punitiva, può interrompere tale comportamento.

La durata

Mediante video ed osservazioni si è arrivati ad uno schema temporale di base per le manifestazioni dei comportamenti legati all'ansia da separazione. Un picco di intensità viene raggiunto poco dopo la partenza del proprietario e cessa dopo qualche tempo, nonostante i latrati e gli uggolii possano mantenersi relativamente costanti per tutto il giorno.

Gli esperti comportamentali hanno valutato l'inizio delle manifestazioni entro 5 minuti dalla partenza [3,40], evidenziando l'importanza dei primi 30 minuti in cui l'animale resta solo [3,35,40].

Per ciò che riguarda l'attività motoria si è osservato un decremento esponenziale nel tempo; nella maggior parte dei cani sembra esserci un modello ciclico di 20-30 minuti [40]. Se però il soggetto è riattivato da stimoli esterni o risulta particolarmente sensibile, questo modello di base proposto per la durata dell'attività può non essere corrispondente.

Due particolari momenti sono fondamentali per definire l'ansia da separazione: la partenza e l'arrivo del proprietario.

La partenza del proprietario

E' ovvio che la maggior parte dei cani percepisce la partenza del proprietario: per esempio possono accorgersi di particolari gesti, come il truccarsi, prendere le chiavi, mettersi le scarpe o indossare determinati capi di abbigliamento [20,39,40].

Nei soggetti con ansia da separazione questi stimoli per così dire anticipatori, possono scatenare uno stato d'animo ansioso che porta al manifestarsi di alcune

sequenze comportamentali:

1. seguono passo per passo il proprietario risultando particolarmente appiccicosi, tanto che alcuni li hanno definiti "cani velcro" [25], in quanto stanno fisicamente molto vicini al proprietario
2. alcuni cani ansimano o tremano
3. altri abbassano le orecchie e la coda rimanendo immobili con un'espressione depressa [3,16]
4. certi proprietari riportano che alcuni cani provano ad impedire la partenza esibendo un certo grado di aggressività [3,40], possono arrivare a ringhiare o addirittura a mordere il padrone

E' altresì plausibile che tali soggetti, possano manifestare anche al di fuori del contesto della partenza, tali comportamenti, pur essendo comunque legati all'azione del distacco (fenomeno della generalizzazione).

Il rientro a casa del proprietario

Quando il proprietario torna a casa dopo un periodo più o meno lungo di separazione, il cane lo accoglie con manifestazioni d'entusiasmo eccessive se paragonate ad un soggetto equilibrato:

1. salta addosso al proprietario
2. scodinzola in maniera esagerata muovendo tutto il corpo
3. guaisce e abbaia
4. cerca giocattoli e li esibisce, invitando al gioco, ecc.

Questo comportamento va avanti per alcuni minuti ed è prolungato o si ravviva ad ogni minima attenzione del proprietario. Spesso sono descritti come iperattivi.

Quando però le esperienze distruttive precedenti spingono il proprietario, una volta rincasato, ad effettuare

una serie di interventi punitivi sul cane, ecco che l'animale presenta anche in questo contesto un processo di anticipazione, assumendo posture di sottomissione:

1. orecchie basse
2. coda in mezzo alle gambe
3. perdita di qualche goccia d'urina, ecc.

Tale situazione viene interpretata dai proprietari come segno di colpevolezza, infatti, descrivono come il loro animale si senta responsabile di ciò che è avvenuto e ritenendolo ben cosciente di tale comportamento, provvedono ad effettuare ulteriori punizioni. Questo non fa altro che peggiorare la situazione, aumentando lo stato ansioso del cane.

Le differenze individuali risultano dalla maniera in cui i cani manifestano tali comportamenti; alcuni possono presentare un solo segno, altri tutti i sintomi e altri ancora solo una combinazione di questi.

Criteria per la valutazione dell'ansia da separazione

Quando parliamo di ansia da separazione occorre aver presente di cosa si tratta, in quanto esistono altri problemi comportamentali che possono avere dei punti in comune con questa patologia e di conseguenza risulta relativamente facile cadere in errore se ci si presta ad una superficiale analisi del problema.

Nella Clinica del comportamento animale, dell'Ospedale Universitario della Pennsylvania, su 103 casi presentati alla visita clinica come ansia da separazione, nel 1980, solo 36 casi furono effettivamente reputati a tale patologia [40].

Anche nell'indagine epidemiologica condotta da Osella [27] sull'ansia da separazione in Italia, solo in 69 casi sui 104 segnalati (66%), tale diagnosi si è rivelata corretta.

Anche altri Autori [20,22,40] hanno riportato portato casistiche simili a conferma di quanto sia facile cadere in errore se non si hanno punti di riferimento ben precisi.

Possiamo comprendere nella categoria dei cani con ansia da separazione quelli che manifestano uno o più dei seguenti comportamenti quando separati dal proprietario:

- comportamenti distruttivi
- defecazione o orinazione inappropriata
- eccessiva vocalizzazione

Per Simpson & Simpson [37], i cani affetti da ansia da separazione devono dimostrare tutti e tre i seguenti segni, mostrando un alto grado di attaccamento al proprietario:

1. seguono morbosamente la figura di riferimento per tutta la casa e tentano di mantenere uno stretto contatto fisico con questa
2. aumentando la distanza fisica del proprietario esibiscono distress
3. al ritorno del proprietario il cane manifesta un entusiasmo eccessivo

Possiamo escludere dalla categoria dei cani con ansia da separazione:

- i cani sotto i 6 mesi di età
- i cani che non presentano atteggiamenti distruttivi, o li manifestano anche in presenza del proprietario
- fenomeni sporadici
- comportamenti distruttivi o vocalizzazione correlati con l'aggressività da dominanza o la territorialità
- orinazione dei maschi legata alla marcatura del territorio
- orinazione conseguente a disturbi fisiologici
- malattie gastro-intestinali che provocano vomito o diarrea

Le tabelle A, B, C, permettono un'analisi differenziale tra le manifestazioni legate all'ansia da separazione e altri problemi comportamentali relativi all'eliminazione, ai problemi distruttivi, e all'eccessiva vocalizzazione.

Per Pageat [30], la diagnosi differenziale dell'ansia da separazione va fatta anche con altre patologie come:

1. Le sociopatie
2. La sindrome da iperattaccamento dell'adulto
3. La depressione da involuzione

Terapia

Il trattamento dell'ansia da separazione è un problema alquanto complesso in quanto non ci si può concentrare unicamente sul soggetto malato, ma occorre tenere in considerazione tutto l'ambiente in cui l'animale è inserito, compreso il rapporto tra cane e proprietario.

I migliori risultati si sono ottenuti associando alla terapia farmacologica alcune tecniche di modificazione del comportamento [22], in quanto così facendo si sono ottenuti risultati migliori, in tempi più stretti.

L'associazione di un programma di modificazione comportamentale e della terapia farmacologica risulta la soluzione ideale per il trattamento dell'ansia da separazione, considerando che in questo modo i risultati sono più tempestivi e favoriscono, motivandola, la collaborazione del proprietario.

Esistono varie terapie di modificazione comportamentale [7], che vanno applicate e modificate secondo la situazione, alcune di queste possono anche essere utilizzate per prevenire alcuni fenomeni ansiosi, ovvero risultano buone regole di educazione del cane.

Importantissimo è riuscire a coinvolgere il proprietario, rendendolo partecipe del problema, spiegandogli l'origine e le modalità di tale disturbo. Occorre però particolare

attenzione a non sottolineare le eventuali mancanze o errori subiti fino a quel momento dal proprietario stesso, ma sottolineare, responsabilizzandolo, il suo ruolo nella buona riuscita della terapia.

Ecco le più comuni tecniche di modificazione comportamentale:

1. Punizioni e correzioni
2. Il confinamento
3. Corso di addestramento di base
4. Tecniche di esposizione al problema
5. L'adattamento
6. Tecnica del controcondizionamento

Per quanto riguarda la terapia farmacologica possiamo tenere in considerazione i seguenti farmaci:

Inibitori della ricaptazione della serotonina

Il sistema serotoninergico è un mediatore dell'apprendimento e del mantenimento delle risposte di paura negli animali e nell'uomo [8,34,42].

Quando viene stimolato un neurone serotoninergico viene rilasciato 5-HT nella fessura sinaptica.

La reazione con i recettori postsinaptici provoca la stimolazione del neurone corrispondente, mentre il legame con gli autorecettori, posti a livello presinaptico e somatodendritico, produce un feed-back negativo che inibisce l'ulteriore rilascio di 5-HT.

Dopo la fase di rilascio, la 5-HT è rimossa dalla fessura sinaptica attraverso un meccanismo di trasporto all'interno del terminale nervoso (presinaptico).

I composti che inibiscono la ricaptazione delle amine biogene, e quindi la loro degradazione nel neurone presinaptico, ne potenziano l'azione sulle terminazioni postsinaptiche.

Il meccanismo è stato spiegato in maniera semplicistica in quanto i neuroni serotoninergici presentano dei recettori di tipo differente, di cui è importante conoscere le funzioni per meglio comprendere gli effetti degli antidepressivi.

Attualmente la ricerca nel suo progredire, ha già individuato e clonato almeno 17 recettori 5-HT [6], per ragioni logistiche è possibile raggrupparli in 5 tipi, designati con le sigle 5-HT_{1,2,3,4} e 5, di cui noi tratteremo solo i primi 3.

I recettori 5HT-1, sono sia pre che post sinaptici; i primi sono quelli deputati alla ricaptazione della serotonina. Presentano affinità maggiore per gli agonisti della serotonina in presenza di cationi bivalenti come Ca⁺⁺, Ba⁺⁺ o Mn⁺⁺, mentre gli ioni K⁺ e Na⁺, inibiscono questo legame.

I recettori 5HT-2, hanno invece un'affinità più forte per gli antagonisti che non per la stessa serotonina. La stimolazione di questi recettori causa la contrazione dei muscoli lisci della trachea, dell'utero o dell'ileo, ma anche dei vasi sanguigni, giustificando l'utilizzazione degli agonisti nel trattamento di alcune affezioni vascolari come l'arterite, le trombosi o l'ipertensione arteriosa (ritanserina).

I recettori 5HT-3, sono dei siti inotropi, che partecipano alla trasmissione dell'eccitazione delle fibre della muscolatura liscia dell'ileo. La stimolazione di questi recettori aumenta la liberazione di acetilcolina nel plesso enterico e quella di noradrenalina a livello delle terminazioni ortosimpatiche.

L'inibizione della ricaptazione della serotonina è uno dei meccanismi d'azione più importanti degli antidepressivi. Le molecole note da più tempo, presentano in genere un'azione analoga sugli altri sistemi monoaminergici (*clomipramina*).

Al contrario, i composti più recenti come il *trazodone* o la *fluoxetina* agiscono abbastanza specificatamente sul meccanismo di ricaptazione della serotonina.

La clomipramina è presente sul mercato italiano con la denominazione farmaceutica di Clomicalm[®], disponibile in compresse con 3 diverse concentrazioni (5,20,80 mg) da utilizzare in base alla taglia del cane. E' indicato come *supporto terapeutico nei disordini di separazione* che si presentano sotto forma di manifestazioni distruttive, eliminazione inappropriata. Tale prodotto va utilizzato solo in associazione a tecniche di modificazione comportamentale [26].

I risultati di uno studio clinico multicentrico in cieco controllato con placebo, hanno mostrato che la clomipramina determina significativi miglioramenti nei cani con ansia da separazione quando viene utilizzata alla dose di 2 mg/kg per os due volte al giorno ed in associazione a tecniche comportamentali.

I miglioramenti sono risultati più pronunciati a queste dosi che alla dose più bassa (1 mg/kg per os due volte al giorno) con cui venne trattato un precedente gruppo di studio, nonché il gruppo trattato col placebo[22].

Alla dose più alta, inoltre, i risultati si sono raggiunti più velocemente, cosa che migliora sicuramente la "compliance" dei proprietari.

L'unico effetto collaterale attribuito all'uso della *clomipramina* durante un periodo di osservazione di 84 giorni è stato un vomito temporaneo, osservato nel 12,5% dei soggetti trattati al dosaggio più alto e dell'11% in quelli con dosaggio più basso.

La *clomipramina* attraverso il suo primo metabolita *demetilclomipramina* influenza anche la ricaptazione di noradrenalina, quindi presenta, nell'uomo, un profilo di effetti collaterali meno favorevoli rispetto ad altri antidepressivi [2].

La fluoxetina (Prozac®), fa parte degli S.S.R.I. (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors) e la sua azione sui disturbi ansiosi è sorprendentemente ampia.

La fluoxetina sembra avere un'azione specifica molto marcata sulla ricaptazione della serotonina. In vitro, occorre moltiplicare le dosi per 100 prima di osservare un'inibizione della ricaptazione delle altre monoamine. La somministrazione di questo antidepressivo, determina inoltre una diminuzione della sintesi della serotonina [6].

Avendo un'affinità particolare per i recettori 5HT-1, risulta virtualmente priva di effetti collaterali colinergici e cardiovascolari [38].

Quando il trattamento si prolunga per più giorni, si nota una diminuzione dei recettori 5HT-1 (down-regulation) ed è per questo motivo che durante i primi 15 giorni di cura si può notare una certa instabilità emotiva che si stabilizza poi in un secondo momento, migliorando sensibilmente le performance comportamentali e sociali degli animali trattati.

Grazie all'attività del suo primo metabolita, la *norfluoxetina* (ricaptatore di serotonina altrettanto potente e specifico della molecola madre), la *fluoxetina* è indicata anche per somministrazione orale. Le dosi consigliate per il cane sono di 1-1,5 mg/kg per os una volta al giorno [19,21,29].

In due ore circa il suo assorbimento risulta dell'85%, la presenza di cibo può farne ritardare l'assorbimento di circa 30 minuti [1].

Il farmaco, viene metabolizzato dal fegato ed escreto per via renale.

La concentrazione stabile (steady-state) viene raggiunta dopo 4-5 settimane dall'inizio del trattamento e possono essere necessari 1-2 mesi dopo la cessazione totale delle somministrazioni perché la sostanza venga completamente rimossa dall'organismo [33].

Ansiolitici

Il *bupirone* (Buspar®), fa parte di una nuova classe di ansiolitici derivati dall'*azapirodecanedione* e chimicamente distinti dal resto della categoria.

Questi composti hanno un'azione altamente specifica e non producono effetti collaterali indesiderati come sedazione, atassia o dipendenza [10,11].

L'azione del bupirone coinvolge diversi sistemi di trasmissione, anche se i recettori 5-HT₁ sembrano essere i maggiori interessati, il composto agisce anche come debole antagonista della dopamina [9,31].

Per descrivere la loro azione e distinguerla da quella dei farmaci meno specifici, è stato coniato il termine "ansioselettivi".

In un modello sperimentale di stress da separazione in ratti neonati, le proprietà ansiolitiche del bupirone sono risultate simili a quelle delle benzodiazepine [41].

Studi clinici che mettono a confronto il *bupirone* e il *diazepam*, confermano l'efficacia ansiolitica di entrambi questi farmaci nell'uomo [12,32], mentre le informazioni inerenti gli animali domestici, hanno solo il carattere di osservazioni cliniche.

Dodman [6] ha verificato l'efficacia del bupirone nel trattamento di varie paure dei piccoli animali, tra cui *l'ansia da separazione del cane, la fobia dei rumori, e la paura degli estranei*. Il suo effetto più che terapeutico è palliativo; quindi è necessario associarvi un'adeguata terapia comportamentale.

Nell'uomo sono state descritte potenziali reazioni avverse al trattamento con questo farmaco, tra cui nausea, sedazione, emicrania e vertigini; tali sintomi tuttavia si verificano in una percentuale di pazienti molto

più bassa rispetto a quelli rilevati nei trattamenti con diazepam e clorazepato [18,24].

Uno studio veterinario condotto su gatti [6] descrive effetti collaterali come:

1. Aumento dei comportamenti affettivi nei confronti del proprietario
2. Occasionali episodi di comportamento aggressivo intraspecifico
3. Transitoria agitazione subito dopo la somministrazione

Associazione di più psicotropi

Secondo Pageat [30], l'associazione di più psicotropi deve essere utilizzata il più raramente possibile.

Quando il profilo clinico obbliga a ricercare degli effetti che un solo psicotropo non può determinare, è opportuno rispettare alcune semplici regole:

1. Non associare due anticolinergici
2. Non associare un alfa-2 agonista e un beta bloccante
3. Evitare di associare due neurolettici dello stesso gruppo terapeutico
4. Evitare gli antagonisti come un neurolettico + selegilina

Conclusioni

In base a quanto è emerso da questo lavoro, si è giunti alla conclusione che una preparazione di base su tali patologie è ormai indispensabile per essere all'altezza del servizio richiesto dai nostri clienti. Tali problemi risultano di fondamentale importanza nella pratica clinica, in quanto se non trattati possono degenerare in vere e proprie patologie somatiche come ad esempio il granuloma da leccamento o le stereotipie.

Il veterinario deve definire un problema comportamentale differenziando il patologico da una maleducazione del cane, in modo da poter indirizzare il cliente e consigliarlo al meglio per ristabilire l'equilibrio originario del binomio cane-padrone, in modo da essere coerente con l'obiettivo: la cura ed il benessere psicofisico dei nostri pazienti.

Parole chiave: ansia, separazione, cane.

Key words: anxiety, separation, dog.

RIASSUNTO - L'ansia da separazione è una patologia comportamentale frequentemente riscontrabile nella pratica veterinaria. Si tratta di un disturbo ansioso che prima di essere identificato come tale deve essere differenziato da qualsiasi patologia di ordine fisico. Il veterinario deve ricondurre la sintomatologia ad un quadro clinico preciso, per poter applicare un protocollo terapeutico, il più possibile conforme al singolo caso. La terapia dell'ansia da separazione si basa su due punti fondamentali: le tecniche di modificazione del comportamento e la farmacologia. Le prime devono sempre essere associate alla terapia farmacologica, in quanto gli elementi di rinforzo da parte del proprietario sono molteplici, la seconda è di fondamentale importanza per arrivare prima ed in maniera più completa alla risoluzione del problema.

SUMMARY - The anxiety caused by separation is a behavioral pathology which can be easily found in the veterinary practice. This is a behavioral disorder that before being identified must be differentiated from any other physical pathology. The veterinarian must take off against the clinical symptoms in order to apply therapeutical methods conform to the single case as much as possible. The therapy for anxiety of separation is based on two fundamental points: technicals for behavioral changing and pharmaceutical. The first must always be associated with pharmaceutical therapy, since several elements come from the owner, the second one is of fundamental importance to clear up the problem earlier and in the best complete way.

Ringraziamenti: gli autori ringraziano il Dottor Bertini Simone per aver letto e commentato il manoscritto.

Bibliografia

1. ARONOFF G.R., BERGSTROM F., PROTRATZ S.T., et al.: Fluoxetine kinetics and protein binding in normal and impaired renal function - *Clin. Pharmacol. Ther.*, 36, 138-144, 1984
2. BALDESSARINI R.J.: Drugs and treatment of psychiatric disorders: depression and mania. In Harman J.G., et al: *The pharmacological basis of therapeutics*, 9th ed. - McGraw Hill, New York, 431-459, 1996
3. BORCHELT P.L.: Classification of animal behavior problems - *Vet. Clin. North Am. [Small Anim. Pract.]*, 12, 571-585, 1982
4. BOWLBY J.: *Attachement. Separation* - Basic Books, New York, 1969
5. CAMPBELL W.E.: *Psicologia canina. Come interpretare e correggere i problemi di comportamento del cane* - C.G. Edizione Medico Scientifiche, Torino, 1981
6. DODMAN N.H., LOUISE S.: *Farmacologia comportamentale veterinaria* - Masson, Milano, 2000
7. DODMAN N.H.: *Disturbi ossessivo-compulsivi del cane* - Atti del 40° congresso nazionale S.C.I.V.A.C., Montecatini, 2000
8. EICHELMANN B.: Catecholamines and aggressive behavior. In Usdin E.: *Neuroregulators and psychiatric disorders* - Oxford University Press, New York, 1997
9. EISON M.S., VAN DER MAELEU C.P., et al.: Interactios of the anxiolytic agent buspirone with central serotonin system - *Soc. Neuro. Abstr.*, 9, 436, 1983
10. GOA K.L.: Buspirone: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as an anxiolytics - *Drugs*, 32, 114-129, 1986
11. GOLDBERG H.: Buspirone hydrochloride: a unique new anxiolytic agent - *Pharmacotherapy*, 4, 315-324, 1984
12. GOLDBERG H., FINNERTY R.J.: Comparative efficacy of buspirone in two different studies - *Am. J. Psychiatry*, 43, 87-91, 1982
13. GREEN S.: *Animal models of anxiety* - Oxford University Press, 1991
14. HARLOW H.F.: The development of affectional patterns in infant monkeys. In Foss, B.M. (ed.): *Determinants of infant behavior* - Methuen, London, 1961
15. HETTS S.: *The effect of differential separation periods on separation distress in domestic dog puppies (Thesis)* - Fort Collins, Colorado State University, 1989
16. HOTHERSALL D., TUBER D.S.: *Psychopathology in Animals* - Academic Press, New York, 1979
17. KAKOLEWSKI J.W.: Psychopharmacology: clinical and experimental aspects. In Fox M.W.: *Abnormal behavior in animals* - Saunders, Philadelphia, 523-543, 1968
18. KNAPP J.E.: Clinical profile of buspirone - *Br. J. Clin. Pract.*, 38, 95-99, 1985

19. MARDER A.R.: Psychotropic drugs and behavioral therapy - Vet. Clin. North Am. [Small Anim. Pract.], 21, 329-342, 1991
20. McGRAVE E.: Diagnostic Criteria For Separation Anxiety in the dog - Vet. Clin. North Am. [Small Anim. Pract.], 4, 78-85, 1991
21. McKEOWN D.B.: Stereotypies in companion animals and obsessive-compulsive disorder. In Purina specialty review: Behavioral problems in small animals - Ralston Purina Company, 30-35, 1992
22. MILLS, HEATH, HARRINGTON: Proceedings of the First International Conference on Veterinary Behavioural Medicine - Birmingham, 1997
23. MOLINARIO P.V., DAOLIO S., CIONI M.: Guida ai problemi comportamentali del cane - Pet line Vetem, Milano, 2000
24. NEWTON R.E., CASTEN G.P., et al: The side effects profile of buspirone in comparison to active controls and placebo - J. Clin. Psychiatry, 43, 102-107, 1982
25. NOVARTIS: Per porre fine alla sofferenza dei disturbi dell'ansia da separazione - Novartis Animal Health, Varese, 2000
26. OPUSCOLO CLOMICAL - Novartis Animal Health, 2000
27. OSELLA M.C.: Epidemiologia dell'ansia da separazione in Italia - Atti del 40° congresso nazionale S.C.I.V.A.C., Montecatini, 2000
28. OVERALL K.L.: Clinical Behavioral Medicine for Small Animals - Mosby, St.Louis, 209-250, 1997
29. OVERALL K.L.: Practical pharmacological approaches to behavior problems. In: Behavioral Problems in Small Animals - Ralston Purina Company, 36-51, 1992
30. PAGEAT P.: Patologia comportamentale del cane - Le Point Vétérinaire Italie, Milano, 282-289, 1999
31. PEROUTKA S.J.: Selective interaction of novel anxiolytics with 5-hydroxytryptamine 1A receptors - Biol. Psychiatry, 20, 971-979, 1985
32. PETRACCA A., NISTIA C., et al.: Treatment of generalized disorder: preliminary clinical experience with buspirone - J. Clin. Psychiatry, 51, 31-39, 1990
33. PRODUCT MONOGRAPH: Prozac capsules and oral solution - Scarbotough, Ontario, 1996
34. RICKETTS R.W., GOZA A.B., et al.: Fluoxetine treatments of severe self-injury in young adults with mental retardation - Psychiatric Ann., 32, 865-869, 1993
35. SCOTT J.P., FULLER J.L.: Dog behavior: the genetic basis - University of Chicago Press, Chicago, 1965
36. SCOTT J.P., STEWARD J.M., DE GHETT V.J.: Separation in infant dogs: Emotional response and motivational consequences. In Scott J.P., Senay E. (ed.): Separation and Depression. Clinical and research aspects - American Association for the Advancement of Science, Washington, 1973
37. SIMPSON B.S.: Psychopharmacology for pets: indications and side effects - Convention notes from the 133rd Annual

- Convention of the American Veterinary Medical Association,
Louisville, 599-608, 1996
38. SOMMI R.W., CRISMON M.L.: Fluoxetine: a serotonine specific second generation antidepressant - Pharmacotherapy, 7, 1-15, 1987
 39. TAVOLA ROTONDA INTERNAZIONALE organizzata da: Novartis Animal Health, Birmingham, 1997
 40. VOITH, BORCHELT, PETER: Diagnosis and Treatment of Separation-Related Behavior Problems in Dogs - Symposium on Animal Behavior, New York, 1997
 41. WINSLOW J.T.: The infant rat separation paradigm: a novel test for novel anxiolytics - T.I.P.S., 12, 402-404, 1991
 42. ZUCKERMAN S.: Serotonin, impulsivity, and emotipnality - Behav. Brain. Sci., 5, 98-99, 1986

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELL'OSTEOSARCOMA DEL CANE: VALUTAZIONI ISTOLOGICHE ED IMMUNOISTOCHIMICHE.

A. Luppi, A.M. Cantoni, A. Corradi, E. Cabassi ⁰

Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Parma.

Premessa

I tumori ossei benigni e maligni primitivi sono stati accuratamente studiati nel cane dove costituiscono un'entità neoplastica relativamente comune. La differenza nel rapporto comparativo tra neoplasie ossee primitive nell'uomo e nel cane sono da imputare sia alle diversità biologiche interspecifiche, sia alle non accurate ricerche necroscopiche effettuate nel cane, che rendono spesso i dati disponibili non completamente veritieri.

L'osteosarcoma o sarcoma osteogenetico è la più comune neoplasia maligna primitiva dello scheletro dell'uomo e degli animali domestici. Piuttosto rara da osservare in alcune specie, nel cane l'osteosarcoma rappresenta l'80-85% dei tumori ossei. In questa specie colpisce più frequentemente i soggetti di 5-7 anni d'età, di sesso maschile, di razze di taglia medio-grande (boxer, san bernardo, alano, pastore tedesco e setter irlandese).

Lo studio degli aspetti eziopatogenetici, epidemiologici e morfologici dell'osteosarcoma del cane, ha evidenziato numerose analogie con la stessa patologia nell'uomo. Negli ultimi anni, inoltre, l'utilizzo delle tecniche immunocito-istochimiche ha permesso di dimostrare caratteri comuni della neoplasia nelle due specie, anche dal punto di vista della biologia molecolare. Per questo motivo l'osteosarcoma del cane assume un ruolo molto importante, per la possibilità di utilizzare questa specie come modello sperimentale per l'uomo.

2. Epidemiologia

L'osteosarcoma (OSA) colpisce soprattutto animali appartenenti a razze di grossa taglia (boxer, san bernardo, alano, pastore tedesco e setter inglese) che presentano un rischio 60-185 volte maggiore rispetto alle razze di piccola taglia (1) (Tab.1).

Tab. 1: Incidenza dell'osteosarcoma nel cane in relazione al peso corporeo dell'animale (28).

RAZZE	PESO CORPOREO	INCIDENZA
Giganti	>40kg	29%
Grossa taglia	27-40kg	55%
Media taglia	13-27kg	11%
Piccola taglia	<13kg	5%

Gli animali colpiti hanno età compresa tra pochi mesi e 18 anni (media di 7 anni e mezzo circa), con una maggiore incidenza nei soggetti maschi (55%) rispetto alle femmine (45%). A quest'ultima regola fa eccezione il san bernardo, nel quale invece si evidenzia una maggiore incidenza nelle femmine rispetto ai maschi (15).

Nel cane il 24% degli OSA colpisce in genere lo scheletro assiale (il 50% a livello di ossa del cranio ed il restante 50% a livello di vertebre e costole) (3); mentre il coinvolgimento dello scheletro appendicolare è piuttosto elevato (più del 70% dei casi), come riportato nella tabella 2.

Tab.2: Incidenza a livello di scheletro appendicolare dell'osteosarcoma nel cane in relazione al peso corporeo dell'animale (28).

RAZZE	PESO CORPOREO	COINVOLGIMENTO DELLO SCHELETRO APPENDICOLARE
Giganti	>40kg	95%
Grossa taglia	27-40kg	79%
Media taglia	13-27kg	67%
Piccola taglia	<13kg	41%

Altre sedi di localizzazione sono le epifisi distali e prossimali del femore e della tibia, nonché le costole. Un'incidenza minore viene osservata a livello del rachide, delle ossa del cranio, delle scapole, dei metacarpi, metatarsi e ossa del bacino (17).

In uno studio condotto da Liu et al. su 183 cani colpiti da osteosarcoma i segmenti ossei maggiormente coinvolti sono risultati: il femore (20,4%), l'omero (19,5%), il radio (19,2%), la tibia (9,3%), il cranio (7,6%), le vertebre (6,5%), le coste (4,9%), la scapola (4,4%), l'ulna (4,4%), il bacino (3,3%) ed il metacarpo (2,2%) (17).

Theilen and Madewell indicano come siti maggiormente coinvolti da processi osteosarcomatosi l'omero prossimale, il radio e l'ulna distali e le porzioni distali e prossimali della tibia e del femore (28).

In uno studio condotto da Wolke e Nielsen, riportato da Moulton, il 68% degli osteosarcomi appare localizzato a livello di radio (23%), omero (19%), tibia (14%) e femore (14%).

Il rapporto tra localizzazione appendicolare anteriore e posteriore è un altro dato molto importante e sembra dipendere dalla razza: alano 6:1, san bernardo 2.3:1, setter irlandese 1.7:1, boxer 1:1 (28).

Sulla base dei dati riportati da Buracco, l'osteosarcoma del cane si localizzerebbe prevalentemente a livello di arto anteriore (47%), arto posteriore (29%), cranio e mandibola (11%) ed a livello di altre sedi (13%) (3).

3. Eziopatogenesi

Nell'uomo come in diverse specie animali è stata riconosciuta l'importanza di fattori predisponenti l'insorgenza dei tumori ossei. Le anomalie scheletriche, i corpi estranei, le radiazioni ionizzanti, le molecole oncogene, le infezioni virali, e la componente genetica sarebbero tutti elementi importanti nel determinismo di queste neoplasie.

Nell'uomo e negli animali certe **malformazioni e malattie scheletriche** (c.d. lesioni precancerose) potrebbero predisporre all'insorgenza di neoplasie ossee. Sempre nell'uomo è stato osservato come esostosi multiple o osteocondromi possano modificarsi in condrosarcomi nel 5-11% dei pazienti; mentre la malattia di Paget sembra predisporre a neoplasie ossee come l'osteosarcoma. Torna utile ricordare che nel cane e nel gatto alcune malformazioni o lesioni tumorali rappresentano il potenziale punto di partenza per l'instaurarsi di processi neoplastici come l'osteosarcoma e il condrosarcoma.

Anche la presenza di **corpi estranei** quali impianti metallici, schegge e trapianti ossei giocherebbe un ruolo determinante nell'insorgenza di queste neoplasie (28). Il periodo di intervallo fra osteosintesi ed insorgenza della neoplasia è in genere di 5-6 anni, con dati estremi di 6 mesi e 12 anni (3). Nell'uomo sono stati descritti casi di emangioendotelioma, endotelioma ed osteosarcoma, in pazienti con protesi metalliche lasciate in loco per la correzione di fratture (23). Anche nel cane è stata ripetutamente dimostrata l'insorgenza di tumori ossei in corrispondenza di focolai di frattura trattati con impianti metallici, non rimossi dopo la guarigione (25). Le ipotesi sul potere cancerogeno degli impianti metallici sono diverse e sarebbero da imputare alle caratteristiche tossiche del materiale utilizzato, agli effetti delle proprietà di superficie, al potenziale fisico-chimico creato da diversi metalli in contatto fra loro, alla risposta immunitaria dell'organismo nei confronti dell'impianto.

Altri fattori predisponenti possono essere complicazioni dovute all'allentamento della protesi e processi di non unione o di unione ritardata dei monconi di frattura (25).

Fenomeni corrosivi del materiale utilizzato per l'impianto avvengono con ogni tipo di metallo e la tossicità dei prodotti derivati varia secondo la composizione dell'impianto stesso.

Il cobalto, il cadmio, il nickel e le leghe di cobalto, di cromo e di molibdeno sono in grado di indurre neoplasie maligne ossee negli animali domestici. Lo zinco, il tungsteno, il ferro, il rame, il cromo, il berillio, il manganese e il molibdeno, nella loro forma pura non si ritiene siano cancerogeni, tuttavia, non si esclude che sali di questi metalli o loro leghe possano avere questo effetto.

Le **radiazioni ionizzanti** sono in grado di determinare l'insorgenza di neoplasie ossee come l'osteosarcoma, il condrosarcoma, il fibrosarcoma e l'emangiosarcoma (28).

La somministrazione sperimentale di radionuclidi come ^{220}Ra , ^{226}Ra , ^{224}Ra , ^{239}Pu , ^{229}Th , ^{90}Sr ha provocato l'insorgenza di neoplasie ossee in cani di razza beagle.

Il ruolo oncogeno di alcune **molecole** nell'insorgenza dell'osteosarcoma, è stato dimostrato per il metilcolantrene, l'ossido di berillio (che sarebbe in grado di indurre la formazione di osteosarcomi nel coniglio) ed il silicato di berillio e di zinco. L'aflatossina B₁ e la procarbazine si sono rivelate responsabili dell'insorgenza di osteosarcomi in diverse specie di scimmie (28).

Nell'uomo e negli animali è stata ampiamente dimostrata la responsabilità di alcuni **virus** nell'insorgenza di neoplasie ossee (1,3,24). Fra questi citiamo il polyomavirus e l'SV40 in grado di determinare tumori ossei nel gatto, inoculato alla nascita e negli Hamsters siriani. Il virus del sarcoma murino appartenente ai Retrovirus tipo C è in grado di provocare processi osteosarcomatosi nei topi e negli hamsters. Altri virus tipo C denominati FBJ, FBR e RFB sono stati isolati nel corso di processi esostosici osteocondromatosi e nel tumore a cellule giganti dell'osso nel gatto (1,28).

Le **mutazioni genetiche** sono state riconosciute nell'uomo come un fattore fondamentale nell'insorgenza dell'osteosarcoma. La sovraespressione del gene cellulare MDM₂ è stata indicata come responsabile nella genesi di alcuni osteosarcomi perché questa andrebbe a legare e ad inattivare la proteina p53 (che in condizioni normali è capace di monitorare l'integrità del DNA durante la divisione cellulare) con l'arresto delle funzioni apoptotiche (18).

In uno studio riportato da Mendoza è stato dimostrato che la localizzazione ed il tipo di mutazioni a carico di p53 in cani affetti da osteosarcoma scheletrico, sono praticamente identiche a quelle osservate nell'uomo (18).

Nell'uomo e nel cane è stato rilevato che numerosi osteosarcomi si sviluppano nelle **zone di maggiore accrescimento osseo**, dove l'attività mitotica cellulare è più elevata (alla base della placca di accrescimento femorale, dove si forma la spugnosa primaria o a livello dell'osso pagetico). Nel cane tali sedi sarebbero in corrispondenza delle cartilagini di accrescimento (radio distale e omero prossimale).

L'elevato numero di osteosarcomi descritti a carico della parte distale del radio, soprattutto nelle razze giganti, sarebbero da collegare al maggior carico cui sono sottoposti gli arti anteriori. Nei cani di piccola taglia, a conferma di questa ipotesi, la localizzazione dell'osteosarcoma si presenta diversamente ripartita (8).

4. Schemi Classificativi

La classificazione dei tumori primitivi dell'osso e quindi dell'osteosarcoma fa riferimento allo schema proposto dal WHO (Misdorp e Van Der Heul,1974) in cui i tumori ossei sono classificati secondo il tipo cellulare o tissutale che esprimono (Tab.3).

Tab.3: *Classificazione istologica delle neoplasie ossee degli animali domestici. Misdorp e Van Der Heul nel 1974 (19).*

TUMORI FORMANTI OSSO	Osteoma Osteoma osteoide e osteoblastoma Osteosarcoma Osteosarcoma juxtacorticale (osteosarcoma parostale)
TUMORI FORMANTI CARTILAGINE	Condroma Osteocondroma (esostosi osteocartilaginea) Tumore multilobulare dell'osso Condrosarcoma
TUMORE A CELLULE GIGANTI	-
TUMORI INTERESSANTI IL MIDOLLO OSSEO	Mieloma Altri
TUMORI VASCOLARI	Emangioma Emangiosarcoma
TUMORI MISTI	Fibrosarcoma Liposarcoma Osteoliposarcoma (mesenchimoma maligno) Adamantinoma delle ossa lunghe Sarcoma indifferenziato
TUMORI METASTATICI	-
TUMORI INCLASSIFICABILI	-
LESIONI SIMIL-TUMORALI	Cisti ossee solitarie (cisti ossee semplici o unicamerale) Cisti ossee aneurismatiche Cisti ossee juxtacorticali (cisti ossee subcondrali) Displasia fibrosa Miosite ossificante Tumore bruno da iperparatiroidismo Cisti epidermide delle falangi Altri

Nel 1984 Moulton ha formulato una classificazione basata sulla benignità o malignità delle neoplasie ossee e sulla loro localizzazione a livello osseo (neoplasie centrali o periferiche), gettando le basi per la una nuova classificazione istologica proposta da Slayter e pubblicata dall'AFIP nel 1994, in cui l'osteosarcoma, in base agli aspetti istomorfologici, viene suddiviso in vari sottotipi (Tab.4) (26).

Tab.4: *Classificazione istologica delle neoplasie ossee degli animali domestici. M.V.Slayter et al. 1994 (26).*

Tumori benigni		Osteoma Fibroma ossificante Myxoma della mandibola Osteoccondroma Osteoccondromatosi felina Condroma Emangioma
Tumori maligni		
	Centrali	Osteosarcoma (poco differenziato, osteoblastico non produttivo, osteoblastico produttivo, condroblastico, fibroblastico, teleangectasico, a cellule giganti) Condrosarcoma Fibrosarcoma Emangiosarcoma Tumore a cellule giganti dell'osso Tumore multilobulare dell'osso
	Periferici	Condrosarcoma periostale Fibrosarcoma periostale Fibrosarcoma mascellare (cane) Osteosarcoma periostale Osteosarcoma parostale
	Tumori Vari	Liposarcoma Mesenchimoma maligno Altri
	Tumori del midollo osseo	Mieloma Linfoma
Lesioni simil-tumorali		Displasia fibrosa Cisti ossee solitarie Cisti ossee juxtacorticali Cisti epidermoidi delle falangi Miosite ossificante

Nelle classificazioni riportate non compaiono alcune entità neoplastiche relativamente rare, come ad esempio il fibroma desmoplastico, talvolta descritte in letteratura (9).

La classificazione dell'osteosarcoma nell'uomo, basata sulla sede primitiva di origine, ha permesso la suddivisione di questa neoplasia nei seguenti sottotipi: convenzionale (o midollare); parostale (juxtacorticale); periostale; intracorticale ed extrascheletrico (interessante i tessuti molli) (23).

La maggior parte degli **osteosarcomi convenzionali** insorge nella cavità midollare delle estremità metafisarie delle ossa lunghe degli arti, coinvolgendo frequentemente la parte distale del femore e quella prossimale della tibia (60% dei casi), la parte prossimale del femore, la cavità acetabolare e l'ischio (15% dei casi) e l'estremità prossimale dell'omero (10% dei casi). Mandibola e mascella sono risultate coinvolte nell'8% dei casi. L'osteosarcoma convenzionale appare come una massa infiltrante, di colore bianco grigiastro, che spesso presenta aree emorragiche e zone di rammollimento. Circa il 50% degli osteosarcomi contiene una quantità rilevante di sostanza osteoide e pertanto il tessuto neoplastico può presentarsi duro e stridente al taglio. Circa un quarto di queste neoplasie nell'uomo presenta una predominante differenziazione in senso condroide, dove il tessuto neoplastico mostra un aspetto opaco e di colore grigio-bluastro (4).

Nel cane l'osteosarcoma convenzionale o intramidollare è la forma maggiormente descritta, ha sede metafisaria, solo talvolta diafisaria ed è stato riscontrato frequentemente in conseguenza a processi di intolleranza a protesi o ad impianti metallici utilizzati per la correzione delle fratture (25).

L'osteosarcoma parostale insorge in sede juxtacorticale in genere a livello metafisario e costituisce una lesione ben differenziata con trabecole ossee irregolari ben formate. Si tratta di una rara entità patologica che nel cane si può sviluppare a livello delle diafisi dello scheletro appendicolare o delle ossa piatte mentre nell'uomo, dove questa neoplasia costituisce il 2% di tutti gli osteosarcomi, colpisce soprattutto la porzione distale del femore. L'aspetto radiologico è caratterizzato da masse lobulate mineralizzate, talvolta con aspetto a spazzola, disposte perpendicolarmente alla corticale (2).

L'osteosarcoma periostale origina dalla superficie dell'osso, può coinvolgere i tessuti molli circostanti e la corticale, che in certi casi può essere parzialmente infiltrata dal processo neoplastico con interessamento del canale midollare. L'osteosarcoma periostale dev'essere differenziato dal condrosarcoma o dal fibrosarcoma periostale, che come l'osteosarcoma appena descritto, presentano la medesima localizzazione (7).

L'osteosarcoma intracorticale rappresenta un'entità neoplastica rara, origina in seno alla corticale per poi coinvolgere, nella maggior parte dei casi, la midollare ed i tessuti molli adiacenti. L'importanza di questo tumore risiede nella sua difficile differenziazione, sul piano radiografico, da un quadro di osteomielite.

L'osteosarcoma extrascheletrico è un tumore mesenchimale raro, che può essere distinto in due sottocategorie: l'osteosarcoma della mammella (MGO) e l'osteosarcoma di altri tessuti molli (STO) (16,21).

Nel cane l'osteosarcoma mammario rappresenta circa l'1% di tutte le neoplasie maligne della ghiandola mammaria, si localizza soprattutto a livello di mammelle caudali (64% dei casi), colpisce animali anziani (età media 10 anni circa) e con peso medio intorno ai 23 kg (14,16).

Classificazione istologica dell'osteosarcoma

In base alle varianti istologiche l'osteosarcoma del cane è diversificato in sei vari sottotipi (poco differenziato, osteoblastico, condroblastico, fibroblastico, teleangectasico ed a cellule giganti).

L'osteosarcoma poco differenziato è caratterizzato da cellule neoplastiche maligne formanti osteoide e spicole di tessuto osseo neoplastico, che si possono presentare con aspetto simile alle piccole cellule reticolari del midollo osseo o apparire come grandi elementi cellulari mesenchimali pleomorfi che ricordano le cellule osservabili nei sarcomi indifferenziati (foto 8).

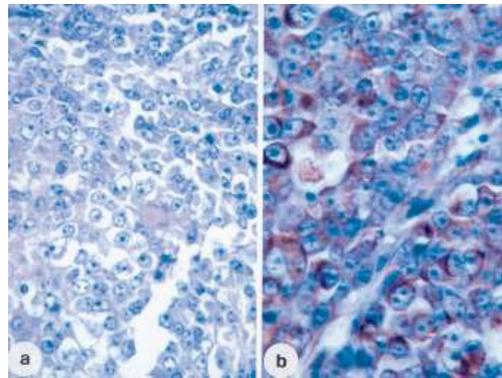


Foto 8. Cane: osteosarcoma poco differenziato. Le sezioni istologiche mostrano una popolazione di elementi osteoblastici atipici, poco differenziati. E.E. 400X (a). Gli elementi neoplastici risultano positivi alla vimentina, 600X (b).

Nell'osteosarcoma osteoblastico si evidenzia la proliferazione di osteoblasti anaplastici e gruppi di cellule fusate atipiche, precursori delle cellule osteogeniche. Sulla base della quantità di matrice ossea prodotta è possibile classificare questo gruppo di neoplasie in tre sottocategorie: *l'osteosarcoma osteoblastico non produttivo*, nel quale si osservano aree di osteolisi associate ad una lieve risposta da parte del periostio; *l'osteosarcoma osteoblastico moderatamente produttivo*, nel quale, anche radiograficamente si osservano quadri di distruzione e produzione di tessuto osseo (in certi casi poco o nulla mineralizzato); *l'osteosarcoma osteoblastico produttivo* dove si osserva l'abbondante produzione di matrice neoplastica sia in seno al tessuto osseo normale, sia sulla sua superficie (26) (foto 1,2 e 3).

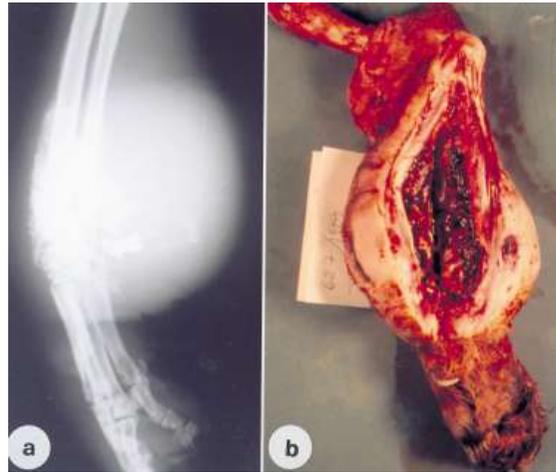


Foto.1. Cane: osteosarcoma del radio. L'aspetto radiografico è caratterizzato da fenomeni di reazione periostale a "denti di pettine" e di calcificazione dei tessuti molli (a). L'aspetto macroscopico della porzione distale del radio è caratterizzata da una consistente neoformazione estesa ai tessuti duri e molli (b). (La radiografia è stata gentilmente concessa dall'Istituto di Radiologia Sperimentale e dall'Istituto di Clinica Chirurgica Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma).

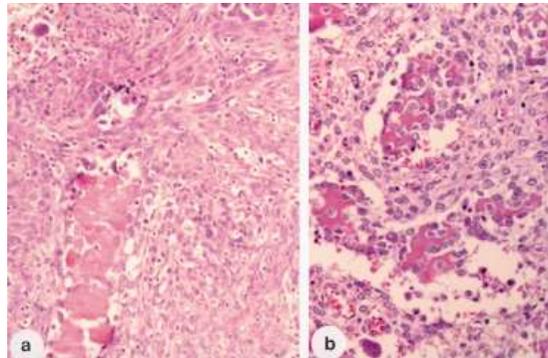


Foto.2. Cane: osteosarcoma osteoblastico. Si osserva la proliferazione di osteoblasti atipici (a) e la presenza di matrice osteoide neoformata nel contesto della popolazione cellulare (b). E.E. (a) 200x e (b) 400X.

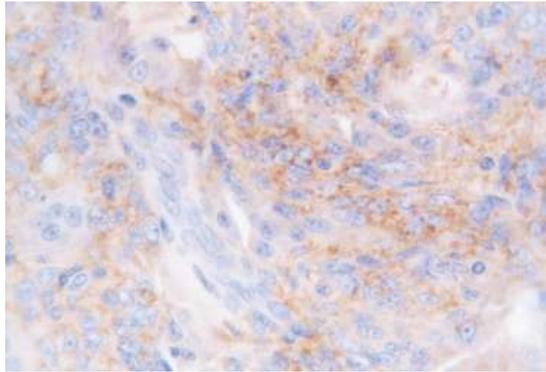


Foto.3. Cane: osteosarcoma osteoblastico. Presenza di cellule neoplastiche fortemente positive all'osteocalcina.
600X

Nell'osteosarcoma condroblastico si osserva la produzione di una matrice ossea e cartilaginea che spesso non si presentano nettamente separate.

A questo proposito, per il suo duplice aspetto, questa neoplasia puo' ingenerare seri problemi diagnostici quando la diagnosi istopatologica dev'essere effettuata su campioni ottenuti da piccoli prelievi biotici (26) (foto 5 e 6).

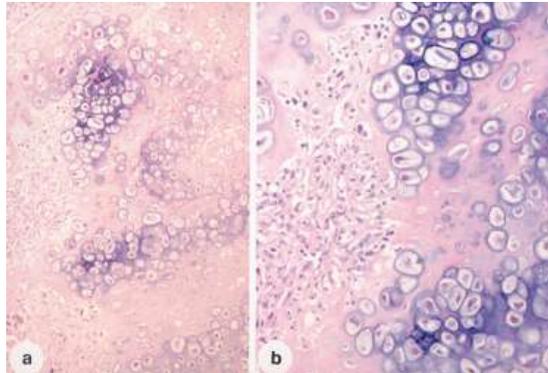


Foto 5. Cane: osteosarcoma condroblastico. Proliferazione di osteoblasti atipici ed aree di tessuto cartilagineo neoplastico. E.E. (a) 200X e (b) 400X.

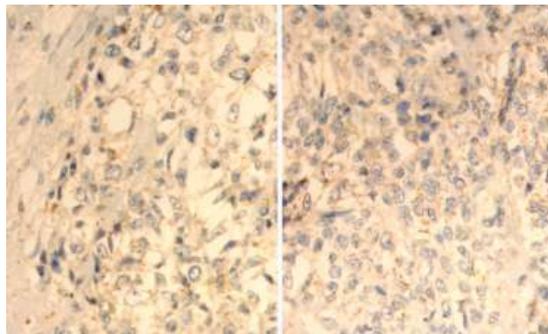


Foto 6. Cane: osteosarcoma condroblastico. Presenza di cellule neoplastiche debolmente positive all'osteocalcina. 400X.

Nell'osteosarcoma fibroblastico si osserva un'iniziale lesione litica seguita da fenomeni produttivi, quando le cellule mesenchimali neoplastiche acquisiscono la capacità di produrre matrice ossea. Nelle lesioni recenti le cellule fusate neoplastiche presentano aspetti morfologici sovrapponibili a quelli osservati nel fibrosarcoma centrale ed il tessuto osseo neoformato è difficilmente dimostrabile. Nelle lesioni avanzate invece si osserva un'abbondante quantità di matrice ossea neoformata da parte delle cellule neoplastiche. La quantità ed il grado di mineralizzazione dell'osteide neoplastica possono essere determinati con successo tramite l'esame radiografico (26) (foto 7).

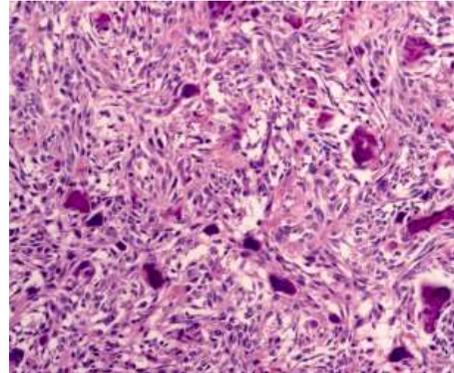


Foto 7. Cane: osteosarcoma fibroblastico. Le sezioni istologiche mostrano una popolazione di osteoblasti atipici prevalentemente di forma fusata che circondano foci di sostanza osteoide calcificata. E. 200X.

Nell'osteosarcoma teleangectasico si evidenziano lesioni aggressive ed osteolitiche accompagnate da formazioni cistiche, ripiene di materiale ematico, difficilmente differenziabili, dal punto di vista macroscopico, dalle lesioni descritte nell'emangiosarcoma. Microscopicamente si osservano cellule mesenchimali osteogeniche pleomorfe e solo piccole quantità di tessuto osteoide neoformato. Gli spazi ematici si presentano circondati da cellule mesenchimali neoplastiche e non da endotelio, come si osserva invece nell'emangiosarcoma. Nell'uomo si contano 40 casi di questo sottotipo (cui si associa in genere una prognosi meno favorevole rispetto agli altri osteosarcomi) ogni 1000 casi di osteosarcoma (26).

Nell'osteosarcoma a cellule giganti si osservano quadri sovrapponibili all'osteosarcoma non produttivo, eccezion fatta per la presenza di vaste zone occupate da cellule giganti neoplastiche; tale riscontro impone di effettuare diagnosi differenziale nei confronti del tumore a cellule giganti dell'osso (26).

6. Aspetti clinici e prognostici

Sintomatologia

Le neoplasie ossee dal punto di vista clinico, presentano aspetti variabili, dipendenti non solo dal comportamento piu' o meno aggressivo, ma anche dalla loro localizzazione.

Nell'osteosarcoma i primissimi segni della malattia sono caratterizzati da tumefazione, intensa dolorabilità, zoppicatura e precoce amiotrofia della parte coinvolta. Alla palpazione generalmente si provoca dolore e questo aumenta se il processo neoplastico coinvolge anche il periostio.

Con il passare del tempo si osserva quindi l'atrofia muscolare della parte colpita e l'aumento del volume e della consistenza dei linfonodi tributari. Le lesioni di vecchia data tendono ad essere meno dolorose di quelle recenti e talvolta sono complicate da fratture patologiche che possono essere osservate soprattutto negli osteosarcomi osteolitici a rapida crescita.

A livello di scheletro assiale gli osteosarcomi costali, della volta cranica, dell'arco zigomatico e della mascella possono essere precocemente osservati come aumento delle dimensioni del segmento osseo colpito. In caso di neoplasie localizzate a livello del bacino, oltre alla deformazione della parte, possono essere presenti costipazione, tenesmo e produzione di feci nastriformi.

Quando una neoplasia ossea si sviluppa primitivamente a carico delle cavità o dei seni nasali si possono osservare disturbi respiratori associati sovente a quadri di epistassi unilaterale, anche se il materiale che fuoriesce dalle narici può assumere i caratteri dell'essudato purulento.

Il coinvolgimento della colonna vertebrale non si manifesta repentinamente con particolari segni clinici, mentre costante è la presenza del dolore.

Fattori prognostici

Localizzazione

La prognosi negli animali colpiti da osteosarcoma dipende dal tipo di coinvolgimento scheletrico (scheletro assiale o appendicolare), dal peso corporeo e dal trattamento terapeutico cui l'animale è stato sottoposto. Il sesso, l'età, la razza, il grado ed il sottotipo istopatologico, le dimensioni del tumore ed il protocollo di chemioterapia eventualmente utilizzato sembrano essere fattori prognostici meno significativi.

Tab. 5: *Tempo medio di sopravvivenza in cani con osteosarcoma assiale.*
(Da Hammer et al. 1995)(12).

LOCALIZZAZIONE	N° DI ANIMALI ESAMINATI	TEMPO MEDIO DI SOPRAVVIVENZA IN GIORNI
Mandibola	12	165
Mascella	5	120
Colonna vertebrale	4	55
Scapole	3	240
Coste	3	159
Bacino	1	30

L'osteosarcoma appendicolare ha generalmente una prognosi meno favorevole rispetto alla localizzazione mandibolare; animali sottoposti a sola terapia chirurgica hanno presentato, un anno dopo il trattamento, l'assenza di sintomi clinici nell'11,5% (localizzazione appendicolare) e nel 61,6% dei casi (localizzazione mandibolare) (13,27) (tab.5).

Taglia degli animali

I cani di grossa taglia colpiti da osteosarcoma presentano un decorso clinico negativo rispetto a quelli di piccola taglia e questo può essere dovuto ad un comportamento maggiormente aggressivo della neoplasia nei primi rispetto ai secondi. Altre cause possono essere il ritardo nella diagnosi le grandi dimensioni della neoplasia, associate ad una incompleta escissione chirurgica della stessa (30).

Gradazione

Nonostante il sottotipo istologico non venga abitualmente considerato come fattore prognostico occorre ricordare che nel cane, così come nell'uomo, l'osteosarcoma teleangectasico può avere un comportamento biologico più aggressivo rispetto ad altri sottotipi.

La gradazione dell'osteosarcoma riportata da Straw et al. è un fattore prognostico di grande interesse. Il grado istologico, variabile da I a III, è direttamente correlato con il tempo di sopravvivenza degli animali colpiti da osteosarcoma sia appendicolare, sia assiale. Il grado può essere ottenuto valutando alcune caratteristiche istologiche della neoplasia, ad ognuna delle quali viene assegnato un valore parziale. Sommando i valori parziali si ottiene un "total score" che ci indica il grado istologico della neoplasia (Tab.6 e 7) (27).

Tab. 6: Sistema di assegnazione dei valori parziali per la gradazione dell'osteosarcoma nel cane. Da Straw 1996 (27).

PARAMETRI	DESCRIZIONE	VALORE
Pleomorfismo nucleare	Nessuno	0
	Medio	1
	Moderato	2
	Marcato	3
Mitosi (n° di mitosi; 10 campi a 400x)	1-10	1
	11-20	2
	21-30	3
	> 30	4
Quantità di tessuto necrotico (%)	Assenza	0
	< 15%	1
	15-50%	2
	> 50%	3

Tab. 7: Valori totali nella valutazione del grado istologico dell'osteosarcoma del cane. Da Straw 1996 (27).

VALORE TOTALE	GRADO ISTOLOGICO
1-5	I
6-8	II
9-10	III

Parametri ematochimici

Nei pazienti colpiti da osteosarcoma assume notevole importanza, dal punto di vista prognostico, l'attività sierica della fosfatasi alcalina. Diversi studi condotti in cani colpiti da osteosarcoma appendicolare, hanno permesso di valutare, in ambito pre-operatorio l'attività della fosfatasi alcalina totale (TALP) e di quella osso-specifica (BALP) (10,30).

Nell'osteosarcoma del cane alti livelli sierici di TALP e BALP sono indice di prognosi poco favorevole (valori dell'attività della TALP superiori a 110 U/L sono correlati ad un breve intervallo di sopravvivenza). L'attività dell'ALP riflette il grado di differenziazione osteogenica delle cellule e quindi l'osteosarcoma costituito da cellule ben differenziate (osteoblastico) produce minor ALP rispetto a forme di osteosarcoma meno differenziato.

Poiché le cellule neoplastiche presenti nell'osteosarcoma sono poco differenziate, rispetto ai normali osteoblasti, non sorprende che, sia nell'uomo sia nel cane, in presenza di questa neoplasia si osservino elevati livelli dell'attività sierica dell'ALP. Dopo l'intervento chirurgico di asportazione del tumore primario e l'inizio del trattamento chemioterapico si evidenzia sia nell'uomo sia nel cane, nei primi 40 giorni successivi all'operazione, un significativo decremento dell'attività sierica dell'ALP (10).

Metastasi

Circa il 90-95% dei cani colpiti da osteosarcoma presenta micrometastasi al momento della diagnosi e pertanto l'amputazione, quando possibile, dimostra scarsa efficacia, con una media di sopravvivenza degli animali intorno a 3-4 mesi. Nella maggior parte dei casi gli animali sono sottoposti ad eutanasia per la comparsa di metastasi polmonari, anche se l'osteosarcoma è potenzialmente in grado di metastatizzare in qualsiasi apparato od organo.

I linfonodi regionali non sempre sono direttamente coinvolti e, quando questo si verifica rappresenta generalmente un evento tardivo (3)(tab.8).

Tab.8: Variabili (accertate o presunte) che influiscono sulla prognosi (30).

Fattori che non influiscono sulla prognosi	Fattori correlati a prognosi fausta	Fattori correlati a prognosi infausta
Amputazione o intervento conservativo	Localizzazione mandibolare	Giovane età
Sesso	Tumori superficiali (juxtacorticali)	Metastasi al momento della prima visita
Razza	Basso grado istologico	Dimensioni
Variante istologica		Elevati livelli sierici di fosfatasi alcalina?
Localizzazione (eccetto mandibola)		

8. Sistema TNM.

La stadiazione delle neoplasie ossee degli animali domestici viene attuata tramite un sistema comprendente solo due delle tre categorie normalmente utilizzate per neoplasie localizzate in altre sedi: la T (basata sull'esame clinico, chirurgico-patologico e radiografico) e la M (basato sull'esame chirurgico-patologico e sugli esami radiografici al torace). La categoria T valuta l'estensione del tumore primario, mentre la categoria M prende in considerazione l'assenza o la presenza di metastasi distanti dal sito primario. Questo sistema fornisce un ausilio al clinico nella valutazione degli aspetti terapeutici e prognostici ed un importante mezzo nello scambio d'informazioni fra i ricercatori, nel continuo studio della patologia neoplastica animale.

TUMORE PRIMARIO	METASTASI
T0 Non si evidenzia il tumore primario.	M0 Non si evidenziano metastasi distanti dal sito primitivo.
T1 Tumore confinato all'interno della cavità midollare o della corticale.	M1 Metastasi distanti dal sito primitivo di neoplasia sono osservate. Specificare dove questa o queste sono localizzate.
T2 Il tumore si estende oltre il periostio.	

Hammer A.S. nel 1995 propose un sistema di stadiazione dell'osteosarcoma delle ossa piatte o irregolari, modificando lo schema TNM del WHO (12).

T (Tumore - diametro)

T1 - 0-2 cm

T2 - 2-5 cm

T3 - > 5 cm

N (Linfonodi)

N0 - Non si evidenzia coinvolgimento linfonodale

N1 - Coinvolgimento linfonodale locale

N2 - Coinvolgimento linfonodale distante

M (Metastasi)

M0 - No metastasi

M1 - Metastasi presenti

- Casistica personale

Nel decennio 1990-2000 sono pervenuti presso il nostro Istituto 53 neoplasie ossee provenienti da prelievi autoptici (4 casi), da exeresi chirurgica con amputazione (20 casi) e da esami bioptici (29 casi).

L'esame istopatologico ha permesso di classificare le 53 neoplasie ossee in 20 osteosarcomi, 11 condrosarcomi, 5 sarcomi indifferenziati, 4 condromi, 2 fibrosarcomi, 2 fibromi, 2 tumori multilobulari dell'osso, 1 osteoma, 1 osteocondroma, 1 mieloma, 3 carcinomi squamocellulari ed 1 carcinoma mammario metastatico.

Nella tabella 9 sono riportate le razze, il sesso, l'età, la localizzazione anatomica e la diagnosi istologica dei 20 osteosarcomi osservati nel decennio 1990-2000.

Tab.9: Classificazione istologica degli osteosarcomi pervenuti al nostro Istituto nel decennio 1990-2000.

Razza, Sesso, Età	Localizzazione	Diagnosi istologica
Pastore tedesco F. 10a	Omero	Osteosarcoma teleangectasico
Pastore tedesco F. 5a	Oso frontale	Osteosarcoma condroblastico
Pastore tedesco M. 10a	Omero	Osteosarcoma a cellule giganti
Pastore tedesco M. 8a	Vertebra L2	Osteosarcoma osteobl. prod.
Rottweiler F. 8a	Femore	Osteosarcoma osteobl. prod.
Rottweiler F. 7a	Seni frontali	Osteosarcoma osteobl. prod.
Rottweiler M. 9a	Radio-ulna	Osteosarcoma osteobl. prod.
P. maremmano F. 10a	Omero	Osteosarcoma osteobl. prod.
P. maremmano M. 7a	Cresta occipitale	Osteosarcoma condroblastico
Boxer M. 7a	Omero	Osteosarcoma a cellule giganti
Boxer M. 7a	Cavo orale	Osteosarcoma fibroblastico
Boxer M. 7.5a	Femore	Osteosarcoma condroblastico
Cocker F. 10a	Radio-ulna	Osteosarcoma osteobl. prod.
Labrador retriever M. 7a	Gengiva	Osteosarcoma osteobl. prod.
Fox terrier M. 11a	Omero	Osteosarcoma osteobl. prod.
Meticcio M. 10a	Femore	Osteosarcoma condroblastico
Meticcio M. 10a	Tibia	Osteosarcoma a cellule giganti
Setter irlandese F. 1.5a	Omero	Osteosarcoma poco diff.
Doberman M. 2a	Femore	Osteosarcoma poco diff.
Mastino napoletano M. 2a	Tibia	Osteosarcoma fibroblastico

Dall'osservazione della tabella emerge che l'età degli animali affetti da osteosarcoma va da un minimo di 18 mesi ad un massimo di 11 anni, con un valore medio di 7,45 anni (tab. 9). Le razze maggiormente colpite sono: pastore tedesco (4 casi), rottweiler (3 casi), boxer (3 casi), pastore maremmano (2 casi) e meticcio (2 casi).

Nella casistica raccolta è stata rilevata una prevalenza del sesso maschile (12 casi) rispetto al sesso femminile (8 casi), con un rapporto tra i sessi di 1,5:1.

Anche per quel che riguarda il sito anatomico d'insorgenza si osserva come gli osteosarcomi sono localizzati per il 70% a livello di scheletro appendicolare, (omero, 6 casi; radio-ulna, 2 casi; femore, 4 casi; tibia, 2 casi), con maggior interessamento degli arti anteriori. Il restante 30% si presenta invece localizzato in corrispondenza dello scheletro assiale ed in particolare a livello di cranio (4 casi) e di vertebre (2 casi).

Dal 1998 sulle neoplasie ossee pervenute nel nostro Istituto e soprattutto sugli osteosarcomi (8 casi), oltre agli esami istomorfologici di routine, sono stati condotti studi citologici ed immunocito-

istochimici.

I campioni prelevati, sono stati sottoposti, quando necessario, a decalcificazione utilizzando un prodotto decalcificante del commercio (Decalcifier II Surgipath) a base di acido cloridrico, EDTA ed acqua. Successivamente i campioni sono stati inclusi in paraffina, sezionati al microtomo e colorati con ematossilina-eosina.

Per le indagini immunocito-istochimiche si è utilizzato un panel di anticorpi costituito da vimentina (Dako 1:50 e Menarini, clone V9, 1:200), S100 (Dako 1:400), osteocalcina (Biogenesis 1:400), citocheratina AE1/AE3 (Dako 1:50) e CD68 (Dako, Clone PG-M1, 1:200).

Gli 8 osteosarcomi ulteriormente classificati come osteosarcoma osteoblastico (2 casi), osteosarcoma a cellule giganti (2 casi), osteosarcoma condroblastico (2 casi), osteosarcoma fibroblastico (1 caso) e osteosarcoma poco differenziato (1 caso), all'esame immunohistochimico hanno permesso l'osservazione dei seguenti quadri:

Nei due **osteosarcomi osteoblastici** le cellule neoplastiche hanno mostrato intensa positività alla vimentina e all'osteocalcina, mentre nessuna reazione è stata osservata nei confronti del CD68, CK AE1/AE3 ed S100. Positività più intensa è stata riscontrata in corrispondenza degli osteoblasti più differenziati mentre la matrice ossea ha mostrato scarsa espressione dell'anticorpo.

Nei due **osteosarcomi a cellule giganti**, si è potuta rilevare una certa positività all'anticorpo vimentina, mentre nessuna reazione è stata osservata nei confronti di osteocalcina, CD68, CK AE1/AE3 e S100.

Negli **osteosarcomi condroblastici** è stato interessante osservare una costante positività all'anticorpo vimentina, come per gli altri sottotipi istologici già descritti e, in corrispondenza delle aree a differenziazione condrocitaria, una maggior reattività alla proteina S100 dei condrociti rispetto agli elementi condroblastici, maggiormente immaturi e localizzati ai margini delle aree condrocitarie. Nessuna reazione all'anticorpo S100 è stata invece riscontrata a carico degli elementi osteoblastici presenti nel contesto del tessuto neoplastico, che mostrano una debole positività nei confronti dell'anticorpo osteocalcina. Costantemente negativa è stata la risposta degli elementi neoplastici al CD68 ed alla CK AE1/AE3.

Nell'unico **osteosarcoma fibroblastico** è stata osservata una marcata positività per l'anticorpo vimentina, debole positività nei confronti dell'osteocalcina e nessuna reazione nei confronti dell'S100, CD68 e CK AE1/AE3.

Nell'**osteosarcoma poco differenziato** marcata positività è stata osservata nei confronti della vimentina mentre l'espressione dell'osteocalcina è stata costantemente molto debole. Sempre negativa è stata la risposta degli elementi neoplastici nei confronti dell'S100, CD68 e CK AE1/AE3

Tab. 10: Risultati dell'indagine immunohistochimica condotta su 8 osteosarcomi diagnosticati presso l'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Parma nel triennio 1998-2000.

RAZZA	LOCALIZZAZIONE	DIAGNOSI ISTOLOGICA	RISULTATI IMMUNOISTOCHEMICA
Pastore tedesco 8a., M.	Vertebra L2	Osteosarcoma prod. ost.	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 + CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 - Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -
Pastore tedesco 10a., M.	Omero	Osteosarcoma cellule giganti	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 - CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 - Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -
Meticcio, 10 a., M.	Tibia	Osteosarcoma cellule giganti	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 - CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 - Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -
P. maremmano 7a., M.	Cresta occipitale	Osteosarcoma condroblastico	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 deb. + CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 + Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -
Mastino napoletano 2 a., M.	Omero	Osteosarcoma fibroblastico	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 deb. + CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 - Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -

			Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 deb. + CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 + Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -
Mastino napoletano 2 a., M.	Omero	Osteosarcoma fibroblastico	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 deb. + CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 - Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -
Doberman 2a., M.	Tibia	Osteosarcoma poco differenziato	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 deb. + CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 - Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -
Boxer, 7,5a., M.	Femore	Osteosarcoma condroblastico	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 deb. + CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 + Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -
Cocker, 10a., F.	Radio-Ulna	Osteosarcoma osteoblastico produttivo	Vimentina (Dako) 1:50 + Vimentina (Menarini) 1:200 + Osteocalcina (Biogenesis) 1:400 + CD68 (Dako) 1:200 - S100 (Dako) 1:400 - Citocheratina AE1/AE3 (Dako) 1:50 -

9. Conclusioni

La casistica degli osteosarcomi riportata nella ricerca da noi condotta è risultata sovrapponibile a quella descritta in altri lavori sia per quel che riguarda l'età, le razze e il rapporto tra i sessi degli animali colpiti (1,17,22,28,29).

La localizzazione delle neoplasie, prevalentemente a livello di scheletro appendicolare, con coinvolgimento preponderante dell'arto anteriore (omero e radio-ulna) e dell'arto posteriore (femore e tibia), è stata del tutto sovrapponibile ai dati disponibili in letteratura (1,3,17,22,28,29).

La suddivisione in sottotipi istologici, secondo la classificazione proposta da Slayter et al. (1994), ha permesso di selezionare i campioni per il successivo studio immunocitochimico, di effettuare valutazioni comparative con i corrispondenti preparati citologici e di interpretare in modo più preciso i relativi quadri macroscopici.

Lo studio immunocitochimico, basato soprattutto sull'espressione di marker osteoblastici e condrocitari, quali osteocalcina ed S100, ha permesso di ottenere risultati di un certo interesse.

L'espressione dell'osteocalcina, da parte delle cellule neoplastiche presenti negli 8 casi testati, ha dato risultati sovrapponibili a quelli descritti nell'osteosarcoma dell'uomo, dove la massima espressione dell'anticorpo viene osservata negli osteosarcomi osteoblastici ed in minor misura negli altri sottotipi (5,6,11). La debole positività riscontrata nell'unico osteosarcoma poco differenziato è in linea con i risultati riportati nell'uomo, nel quale l'osteocalcina viene espressa soprattutto dagli osteosarcomi c.d. "low grade" ed in minor misura da quelli particolarmente sdifferenziati (20).

Negli osteosarcomi condroblastici le cellule condrocitarie hanno mostrato immunoreattività alla proteina S100, mentre gli elementi condroblastici hanno mostrato scarsa reazione all'anticorpo, analogamente a quanto descritto nell'uomo (5,6).

L'osteosarcoma nel cane, dal punto di vista morfologico, non differisce sostanzialmente da quello umano, con il quale ha anche in comune i quadri clinici e numerosi aspetti eziopatogenetici.

Lo studio immunocitochimico da noi condotto con l'utilizzo degli anticorpi osteocalcina ed S100 ha permesso di valutare la notevole somiglianza tra l'osteosarcoma dell'uomo e quello del cane anche dal punto di vista molecolare. I dati disponibili in letteratura relativi all'espressione dell'osteocalcina e dell'S100 nell'osteosarcoma dell'uomo, sono risultati sovrapponibili con quelli da noi ottenuti, anche per quel che riguarda i singoli sottotipi istologici.

Queste osservazioni, che necessiteranno in futuro di ulteriori ed approfonditi studi (utilizzando altri anticorpi come il PCNA, p53, osteonectina ecc.) permettono di confermare e di rafforzare, le già numerose informazioni che indicano l'osteosarcoma del cane come un importante modello nello studio dell'osteosarcoma dell'uomo.

Key words: Osteosarcoma, Immunohistochemistry, Dog, Osteocalcin.

RIASSUNTO - Con il presente lavoro gli autori hanno voluto prendere in considerazione alcuni aspetti eziopatogenetici, classificativi ed anatomoistopatologici sull'osteosarcoma del cane. Riportano inoltre l'esperienza personale, relativa a casi di osteosarcoma venuti alla loro osservazione, descrivendo in modo particolare gli aspetti istopatologici ed immunostochimici soprattutto con l'impiego dell'anticorpo osteocalcina. I dati ottenuti riaffermano la notevole somiglianza della patologia nel cane e nell'uomo, confermando che l'osteosarcoma del cane può essere utilizzato come modello nello studio di questa neoplasia nell'uomo.

SUMMARY - The AA. describe aetiologically aspects, histologically and immunohistochemically features of the primitive osteosarcoma in dog. In the Department of Animal Health, Section of Veterinary Anatomic Pathology from 1998 to 2000 pathologists have diagnosed and histologically classified, using AFIP taxonomy, 8 primary osteosarcomas of bone: osteoblastic osteosarcoma (2 cases), chondroblastic osteosarcoma (2 cases), giant cell type osteosarcoma (1 case), fibroblastic osteosarcoma (1 case), poorly differentiated osteosarcoma (1 case). All osteosarcomas were immunohistochemically tested vs. anti-vimentin, anti-cytocheratin AE1-AE3, anti-osteocalcin, anti-S100 and anti-CD68. The immunohistochemical results were very interesting: the expression of osteocalcin was strongly in the osteoblastic osteosarcomas and slightly in the chondroblastic osteosarcomas, as well as in the poorly differentiated osteosarcoma and in the fibroblastic osteosarcoma. In giant cell type osteosarcomas the osteocalcin expression was not detected. These results are very similar with those described in man's osteosarcoma and the osteosarcoma of dog can be used to study this neoplasm in human being.

RINGRAZIAMENTI: Si ringrazia il Dott. Poletti dell'Istituto di Anatomia Patologica Umana dell'Università di Padova per la preziosa collaborazione e la Sig.ra Paola Gianelli dell'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Parma per l'importante lavoro svolto.

Bibliografia

1. Alexander J.W. and Patton C.S. (1983) Primary Tumors of the Skeletal System. *Vet. Clin. North Am. Small Anim.* 13 (1), 181-195.
2. Buracco P. et al. (1992): Neoplasie di origine periostale nel cane: tumore multilobulare dell'osso (condroma rodens) e sarcoma parostale (osteosarcoma juxtacorticale). *Veterinaria* 1, 5-14.
3. Buracco P. (1995): Bone tumors. In *Spontaneous Animal Tumors: a survey. Proceedings of the first world conference on Spontaneous Animal Tumors.* pp. 431-436.
4. Cabassi E. (1997): Tumori ossei. In *Diagnostica istologica dei tumori degli animali.* Edito a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia. pp. 71-83.
5. Chano T. et al. (1995): The identity of proliferating cells in bone tumors with cartilaginous components: evaluation by double-immunohistochemical staining using proliferating cell nuclear antigen and S100. *Eur. J. Histochem.* 39 (1), 21-30.
6. Chano T. et al. (1996): Analysis of the presence of osteocalcin, S100 protein, and proliferating cell nuclear antigen in cells of various types of osteosarcomas. *Eur. J. Histochem.* 40 (3), 189-198.
7. Cook J.L. et al. (1995): Periosteal osteosarcoma in the long head of the triceps in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 31 (4), 317-320.
8. Cooley D.M., Waters D.J. (1997): Skeletal neoplasms of small dogs: a retrospective study and literature review. *J. A. Hosp. Assoc.* 33 (1), 11-23.
9. Corradi A. et al. (1995): Desmoplastic fibroma in a Great dane?. In *Spontaneous Animal Tumors: a survey. Proceedings of the first world conference on Spontaneous Animal Tumors.* pp. 393-396.
10. Ehrhart N. et al. (1998): Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma: 75 cases (1990-1996). *J.A.V.M.A.* 213, (7), 1002-1006.
11. Fanburg J.C. (1997): Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in the diagnosis of osteosarcoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 108 (4), 464-473.
12. Hammer A.S. et al. (1995): Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. *Journal Am. Anim. Hosp. Assoc.* 31 (4), 321-326.
13. Heyman S.J. et al. Canine axial skeletal osteosarcoma: a retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Vet Surg.* 1992, 21, 304-310.
14. Kuntz C.A. et al. (1998): Extraskelatal osteosarcomas in dogs: 14 cases. *J. Am. Hosp. Assoc.* 34 (1), 26-30.
15. La Rue S.M. and Withrow S.J. (1991): Tumors of the Skeletal system. In *Clinical Veterinary Oncology.* 234-252.
16. Langenbach A. et al. (1998): Extraskelatal osteosarcomas in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986-1996). *J. A. Hosp. Assoc.* 34 (2), 113-120.
17. Liu S.K. et al. (1977): Primary and secondary bone tumors in the dog. *J. small Anim. Pract.* 18, 313-326.
18. Mendoza S. et al. (1998): Status of the p53, Rb and MDM2 genes in canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* 18 (6A), 4449-4453.
19. Misdorp W. and Von der Heul R.O. (1976): Tumors of bones and joints. *Bull. WHO.* 53, 265-282.
20. Park Y.K. et al. (1995): Osteocalcin expression in primary bone tumors in situ hybridization and immunohistochemical study. *J. Korean Med. Sci.* 10 (4), 263-268.
21. Patnaik A.K. Canine extraskelatal osteosarcoma and chondrosarcoma: a clinicopathologic study of 14 cases. *Vet Path.* 1990, 27: 1, 46-55.
22. Pool R.R. (1990): Tumors of bone and cartilage. In Moulton J.E. ed. *Tumors in domestic animals* 3rd ed. Berkeley University of California Press, 157-230.
23. Rosenberg A. (1999): Bone, Joints and Soft Tissue Tumors. In Robbins, *Pathologic Basis of Disease*, sixth edition. 28, 1215-1246.
24. Sekiguchi M. et al. (1996): BK virus-induced osteosarcoma (Os515) as a model of human osteosarcoma. *Anticancer Res.* 16 (4A), 1835-1842.
25. Sinibaldi K.R. et al. (1982): Osteomyelitis and neoplasia associated with use of the Jonas intramedullary splint in small animals. *J.A.V.M.A.* 181 (9), 885-890.
26. Slayter M.V. et al. (1994): *Histological Classification of Bone and Joint Tumors of Domestic Animals.* Armed Forces of Pathology American Registry of Pathology Washington D.C. Second Series, Vol. 1, 1-49.
27. Straw R.C. et al. (1996): Canine mandibular osteosarcoma: 51 cases (1980-1992). *Journal of the American Animal Hospital Association.* 32, 257-262.
28. Theillen G.H. and Madewel B.R. (1987): Tumors of the Skeleton. In *Veterinary Cancer Medicine*, II edition. Cap 17, 471-497.
29. Withrow S.J. (1998): Osteosarcoma. *Vet. Q.* 20 (1), 19-21.
30. Withrow S.J. and Buracco P. (1997): Osteosarcoma. In *Atti del 35° Congresso SCIVAC di Aggiornamento Permanente dei Veterinari per Animali da Compagnia: Aggiornamenti in Oncologia.* Ferrara, 24-26 Ottobre 1997, 205-216.

ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI: NORMATIVA E PROBLEMATICHE INERENTI

L. Lucidi*

*Dottoranda in: Disciplina Nazionale ed Europea sulla produzione ed il controllo degli alimenti - XIV Ciclo

Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

Le biotecnologie vengono definite come: "Ogni tecnologia che utilizza organismi viventi (batteri, lieviti, cellule animali e vegetali) o loro componenti subcellulari purificati (organelli, enzimi) al fine di ottenere quantità commerciali di prodotti utili, per migliorare le caratteristiche di piante o animali o per ottenere microrganismi per determinati usi specifici". Sono dunque un mondo altamente multidisciplinare che coinvolge settori disparati: l'agricoltura, la zootecnia e la veterinaria (piante e animali transgenici più produttivi e resistenti alle malattie ed agli stress ambientali), l'ambiente (trattamento dei rifiuti e depurazione delle acque), la farmacologia e la medicina (farmaci, vaccini e terapia genica), l'industria chimica farmaceutica e alimentare (produzione di antibiotici, vitamine, amminoacidi, enzimi, zuccheri). Tuttavia non rappresentano un campo completamente nuovo in quanto, già da tempo, si sono sfruttate le attività fermentative dei microrganismi per la produzione di bevande, pane e formaggi. Queste ultime sono state indicate con il termine di *biotecnologie tradizionali* per differenziarle dalle *biotecnologie innovative o avanzate* che hanno portato, mediante l'ingegneria genetica, alla produzione di OGM (Organismi Geneticamente Modificati) (1).

A riguardo della manipolazione genica è significativa la definizione fornita dal governo inglese: "Produzione di nuove combinazioni di materiale ereditabile, ottenute mediante inserzione di molecole di acido nucleico di qualunque provenienza (DNA), in un organismo ospite nel quale tali molecole di DNA non sono presenti naturalmente ma che, una volta acquisite, possono propagarsi indefinitamente" (2). Gli OGM sono animali, vegetali o batteri ai quali sono stati aggiunti artificialmente uno o più geni ricavati da svariati esseri viventi. In natura esistono delle ben determinate barriere per cui ogni specie si è evoluta in modo indipendente dalle altre e contiene un corredo genetico originale. Tale corredo genetico può essere alterato inserendovi un gene estraneo, senza determinare ripercussioni negative sull'organismo ricevente (solitamente un batterio o un lievito) e senza alterare i segnali che lo precedono e lo seguono e che hanno la funzione di permetterne la corretta espressione.

Una delle prime applicazioni dell'ingegneria genetica ha riguardato il trasferimento di geni tra specie vegetali non incrociabili. Da almeno 10.000 anni le piante coltivate vengono modificate mediante selezione dei semi o incroci intraspecifici per renderle sempre più adatte alle esigenze dell'uomo.

Con la tecnica del DNA ricombinante si possono trasferire, senza incrocio, geni da una pianta all'altra; ad esempio da un fagiolo ad un girasole per ottenere un olio ad alto contenuto proteico (2). Nell'ambito dell'industria alimentare vi sono ceppi ingegnerizzati di batteri per produrre alfa amilasi, chimosina ed altri enzimi utilizzati nei processi industriali dei prodotti da forno e caseari; essi consentono un miglior controllo dei prodotti e un aumento della stabilità del sapore e della consistenza (3).

Sul mercato sono già presenti numerosi vegetali quali soia, mais, tabacco (in un futuro non remoto anche barbabietole da zucchero, riso e grano); sono inoltre allo studio modifiche non solo per aumentarne la resa e la resistenza a condizioni ambientali estreme e agli attacchi di virus e parassiti ma anche per accrescerne le qualità nutrizionali tramite variazioni della composizione in grassi, carboidrati e proteine (4-5). E' innegabile che le tecniche di manipolazione genetica permettano di risolvere numerosi problemi; tuttavia la sperimentazione, sempre più imponente, ha completamente diviso l'opinione pubblica in "sostenitori" ed "oppositori".

In Europa, infatti, i campi sperimentali (campi in cui viene autorizzato l'impiego controllato di OGM) sono circa 1504 (Tabella 1) (6) e solo 4 sono i prodotti autorizzati dalla Comunità Europea per la messa in commercio (Tabella 2) (7).

Tabella 1. Campi sperimentali di OGM in Europa - Ottobre 1999

Francia	458
Italia	250
Gran Bretagna	178
Spagna	162
Paesi Bassi	117
Germania	100
Belgio	99
Svezia	52
Danimarca	34
Grecia	19
Finlandia	16
Portogallo	12
Irlanda	4
Austria	3
Totale	1504

Tabella 2 - Prodotti autorizzati dalla Commissione Europea per l'immissione in commercio

PRODOTTO	PROPRIETA'	NOTIFICANTE	DECISIONE CE
Tabacco	Resistenza erbicida bromoxinil	Sneita	94/385/CE
Colza	Resistenza erbicida glufosinato	Plant Genetic System	96/158/CE 97/392/CE 97/393/CE
Soia	Resistenza erbicida glifosato	Monsanto	96/281/CE
Mais	Resistenza insetti ed erbicida glufosinato	Novartis	97/98/CE

In Italia i campi sono 250 e ben 589 sono le sperimentazioni autorizzate (il mais e la barbabietola da zucchero sono le coltivazioni geneticamente modificate più diffuse) che si concentrano principalmente tra le province di Bologna, Cremona, Bergamo e Ferrara alle quali si contrappongono le regioni denominate "OGM-free" quali Sardegna, Calabria, Abruzzo, Trentino Alto Adige e Valle d'Aosta.

In concomitanza all'incremento di tali produzioni, si è manifestato un atteggiamento di diffidenza nei confronti dell'impiego delle biotecnologie nell'area alimentare, caratterizzato da una certa confusione e da una informazione incompleta, sovente associata a reazioni emotive negative.

Notevoli perplessità e preoccupazioni sugli effettivi rischi per la salute e sull'osservanza dei principi fondamentali di igiene e sicurezza, relativi alla produzione ed al consumo di tali derrate alimentari, sono state sollevate dal superamento delle tradizionali barriere biologiche tra specie diverse e dalla consapevolezza che questi alimenti entrano nella nostra dieta.

Tali malumori hanno sottolineato la necessità di istituire una normativa atta a regolamentare la produzione e la commercializzazione di OGM ed in grado di garantire un metodo analitico di ricerca ufficiale ed uniforme.

La Direttiva CE 90/220 (8) stabilisce le regole per l'emissione deliberata nell'ambiente di OGM a scopo di ricerca e sviluppo (parte B) o per il mercato (parte C).

Analizzando i *considerando* si comprende come lo scopo principale della presente Direttiva sia quello di tutelare la salute umana ed ambientale da eventuali rischi derivanti dall'emissione deliberata di OGM e che tali sperimentazioni non possano essere evitate, in quanto tappa fondamentale per lo sviluppo di nuovi prodotti, ma anzi debbano essere garantite. Proprio perché eventuali differenze tra le norme già vigenti o in elaborazione negli Stati Membri possono provocare disuguaglianze e problemi nella realizzazione di un mercato unico, si vieta agli Stati di proibire, limitare od impedire l'emissione sul mercato di prodotti geneticamente modificati conformi alla Direttiva a meno che non vi siano sospetti di nocività. In tal caso sarà compito dello Stato stesso informare la Commissione Europea e gli altri Stati Membri della pericolosità del prodotto.

E' evidente come si sia ritenuto importante, a livello comunitario, intervenire in modo da limitare e controllare le attività degli sperimentatori e l'emissione deliberata di OGM.

Da rimarcare che numerosi Stati Membri, Italia compresa, pur mostrandosi preoccupati e sensibili ai diversi problemi inerenti le biotecnologie, si sono limitati ad adeguare il proprio diritto interno alla Direttiva CE (D.L. 92/93) (9).

L'iter burocratico per l'immissione sul mercato di tali prodotti è complesso e richiede una valutazione preventiva del rischio e l'autorizzazione da parte dell'autorità competente. E' compito del richiedente dimostrare che la sperimentazione è andata a buon fine, tramite apposita documentazione che attesti la mancanza di rischi per la salute e l'ambiente. Solo in questo caso può richiedere l'autorizzazione all'immissione in commercio.

Particolare è il fatto che nell'Unione Europea sia prevalso l'atteggiamento di imporre regolamentazioni di tecnologia, collegate a meccanismi di notifica e autorizzazioni; gli USA, al contrario, si basano sulla sicurezza e qualità degli alimenti indipendentemente dalla tecnologia usata. I due diversi approcci non hanno messo in luce differenze significative relative alla sicurezza d'uso, ma è risultata lampante la lentezza con cui l'Unione Europea autorizza i prodotti geneticamente modificati.

Una volta superata la fase sperimentale, la Direttiva non forniva più alcuna restrizione né indicazione particolare; ciò comportava una promiscuità che impediva la raccolta differenziata, l'applicazione di un *trace-back* o l'esclusione di OGM da certi settori (agricolture biologiche).

L'etichettatura era infatti applicata solo nell'ultimo anello della catena alimentare lasciando liberi da vincoli i grandi importatori o produttori (Usa, Canada, Argentina) o trasformatori.

Il Regolamento CE 258/97 (10) si applica nell'ipotesi di immissione sul mercato della Comunità di "nuovi" prodotti o ingredienti alimentari, dove il concetto di "nuovo" è riferito sia al contenuto alimentare sia alle tecniche di produzione.

Erroneamente il termine *novel food* viene impiegato come sinonimo di cibi geneticamente modificati pur contemplando sei categorie delle quali solo due riguardano gli OGM. Sono esclusi gli additivi, disciplinati dalla Dir 89/107/CEE (11), gli aromi (Dir 88/388/CEE) (12), i solventi di estrazione (Dir 88/344/CEE) (13).

Lo scopo fondamentale del Regolamento è di proteggere il consumatore, favorire la libera circolazione dei prodotti ed evitare la concorrenza sleale.

Per valutare la sicurezza d'uso di un prodotto il Regolamento si basa sul principio della "sostanziale equivalenza". Se il prodotto in questione è simile ad uno naturale già esistente, per ciò che concerne la composizione ed il valore nutritivo, il metabolismo e il tenore di sostanze indesiderabili, si seguono i medesimi criteri di commercializzazione utilizzati per quello naturale, presentando una semplice comunicazione alla Commissione Europea (Tabella 3).

Tabella 3 - Pomodoro FLAVR SAVR™, *Lycopersium esculentum* con il gene che rallenta la perdita di consistenza del frutto. Non si constatano differenze significative dei tenori di proteine, vitamine e minerali.

Componente	Range normale	Transgenici	Controllo
Proteine (g)	0.82	0.75 - 1.14	0.53 - 1.05
Vitamina A (UI)	192 - 1667	330 - 1600	420 - 2200
Tiamina (µg)	16 - 80	38 - 72	39 - 64
Riboflavina (µg)	20 - 78	24 - 36	24 - 36
Vitamina B6 (µg)	50 - 150	86 - 150	10 - 140
Vitamina C (µg)	8.4 - 59	15.3 - 29.2	12.3 - 29.2
Niacina (µg)	0.3 - 0.85	0.43 - 0.70	0.43 - 0.76
Calcio (µg)	4 - 21	9 - 13	10 - 12
Magnesio (µg)	5.2 - 20.4	7 - 12	9 - 13
Fosforo (µg)	7.7 - 53	25 - 37	29 - 38
Sodio (µg)	1.2 - 32.7	2 - 5	2 - 3

Nel caso in cui tale principio non venga rispettato, la messa in commercio avverrà solo dopo valutazione e approvazione di tutti gli Stati Membri (art. 6) adottando una etichettatura supplementare. In etichetta devono essere indicate le caratteristiche o le proprietà alimentari del prodotto (ad esempio composizione, valore nutritivo, destinazione d'uso, presenza o assenza di OGM), che lo rendono non più equivalente ad uno già esistente e che quindi potrebbero avere ripercussioni sulla salute di talune categorie di consumatori (bambini, anziani, allergici) o dare luogo a preoccupazioni etiche.

E' interessante notare che da una Direttiva si è passati ad un Regolamento, direttamente applicabile, onde evitare modifiche o divagazioni degli Stati Membri.

L'iter di valutazione è complesso; nessun prodotto, infatti, notificato nell'ambito del Regolamento, è stato ancora autorizzato per il consumo umano o animale. Sono in commercio solo prodotti di trasformazione di alcuni OGM, vale a dire olio di colza, farina, amido e sciroppo di glucosio derivati dal mais.

Il concetto di "sostanziale equivalenza", nato in sede OCSE nel 1986 e rielaborato da FAO e OMS nel 1996, è una guida empirica per definire quei prodotti che non presentano problemi di sicurezza tali da richiedere una valutazione esaustiva, caso per caso, come quella prevista dal Regolamento dei *novel food*. Tuttavia è già stato messo in discussione poichè considerato insoddisfacente o perché applicato "tout court" dalle autorità competenti.

I sostenitori degli OGM, in base agli studi effettuati in ambiente confinato su tali alimenti, non hanno messo in luce alcun reale rischio per la salute umana e quindi ritengono che non dovrebbero essere considerati pericolosi fino a prova contraria; gli oppositori sostengono la necessità di una assoluta sicurezza, che tenga conto anche degli effetti a lungo termine, prima della messa in commercio. In altri termini si oppone il principio della "massima precauzione", accolto dall'Unione Europea, a quello della "sostanziale equivalenza".

A questo punto però ci si è resi conto della necessità di avere delle norme comunitarie uniformi anche per regolamentare quei prodotti messi in commercio, conformemente alla Direttiva CE 90/220, anteriormente al Regolamento CE 258/97.

Con il Regolamento CE 1139/98 (14), si obbligano a tale etichettatura differenziale anche i prodotti e gli ingredienti derivati interamente o parzialmente da soia (Decisione CE 96/281) (15) e mais geneticamente modificati (Decisione CE 97/98) (16) per colmare la discrepanza che si era venuta a creare tra la Direttiva 90/220 CE ed il Regolamento CE 258/97.

L'etichettatura sembra a questo punto l'unico strumento valido, reclamato anche dalle associazioni dei consumatori, per garantire una certa trasparenza dei prodotti geneticamente modificati.

Il progredire delle biotecnologie dai cosiddetti OGM di I^a generazione, caratterizzati da *input traits*, (modifiche insite nella pianta o nel microrganismo), a OGM di II^a generazione, *output traits*, (modifiche rivolte a dare vantaggio all'utilizzatore finale) e addirittura ai cosiddetti *functional foods* nell'ambito del settore farmaceutico, ha costretto diversi ambiti sociali, politici, economici e scientifici ad adattarsi velocemente a cambiamenti e sviluppi altrettanto rapidi.

Le preoccupazioni dei consumatori sono aumentate e la normativa si è dovuta aggiornare continuamente, non tanto per garantire la sicurezza di tali prodotti, altrimenti non reperibili in commercio, quanto piuttosto per tutelare la libertà di scelta dell'acquirente.

Con il Regolamento CE 50/2000 (17) si estende, di conseguenza, l'obbligo di etichettatura agli additivi ed aromi contenenti DNA o proteine geneticamente modificate. La loro presenza deve essere indicata in etichetta con la dicitura "prodotto con soia o mais geneticamente modificato"; per gli additivi si deve far seguire al nome la dicitura "derivato da --.geneticamente modificato".

Gli obblighi non sussistono nel caso non si rilevino più proteine o DNA modificate che possono essere state distrutte dalle successive fasi di lavorazione industriale.

Il problema si focalizza sulla sensibilità dei metodi di analisi utilizzati in quanto la "non presenza" di un OGM può essere una "non rilevabilità".

Con il Regolamento CE 49/2000 viene fissato un limite, pari all'1% dei singoli ingredienti, di presenza di OGM.

Viene pertanto riconosciuta l'impossibilità di escludere una contaminazione da materiale geneticamente modificato, seppur accidentale, degli alimenti, durante le diverse fasi della filiera.

Al di sotto di tale limite non sussistono, ancora una volta, obblighi di etichettatura sebbene spetti al produttore dimostrare di aver preso tutte le misure necessarie per evitare le *cross contaminations*.

Nonostante l'intenzione di appianare le divergenze tra oppositori e sostenitori il Regolamento mette in luce tutta una serie di nuove problematiche attualmente ancora in via di risoluzione, quali la ricerca di metodi analitici validi ed uniformi nei diversi Stati Membri e tali da poter individuare la famosa soglia dell'1%; la metodica di prelievo del campione da analizzare e, non meno importante, l'impossibilità di evitare contaminazioni crociate in ogni fase della filiera nonostante siano in preparazione dei prodotti con la dicitura "non contiene OGM".

Il traguardo dell'etichettatura pone nuovi dubbi sui reali requisiti di qualità dei prodotti e sul rispetto delle norme igienico-sanitarie che devono essere applicate durante tutta la produzione.

E' importante comunque fornire al consumatore non solo un adeguato sistema normativo, supportato da un efficiente organo di controllo svincolato da pressioni esterne e da interessi personali, ma anche una corretta informazione scientifica al fine di permettere una scelta consapevole e libera dall'influenza dei mass-media, prendendo in considerazione i rischi ed i benefici prospettati dall'avvento delle biotecnologie.

Parole chiave: biotecnologie, OGM, alimenti, legislazione.

Key words: biotechnology, OGM, foods, legislation.

Riassunto - L'avvento delle biotecnologie ed il loro utilizzo nell'ambito dell'alimentazione ha sollevato notevoli dubbi e paure. Il consumatore teme per la propria salute e per l'ambiente e, per tale ragione, vuole essere tutelato. L'Autore ha preso in considerazione la normativa inerente i prodotti contenenti organismi geneticamente modificati e le problematiche relative ad una completa e soddisfacente applicazione di essa.

Abstract - The increase of biotechnology and their use in the field of food industry caused considerable remarks and alarm for the future. The consumer is afraid of its health and environment; for this reason he expect to be protected from the legislation. The Author examined laws concerning products containing GMO and problems related to their whole application.

Résumé - L'augmentation des biotechnologies et leur emploi dans l'industrie alimentaire a soulevé nombreux doutes dans l'opinion publique. La catégorie des consommateurs a peur pour sa santé et pour l'environnement et, pour cette raison, veut être protégé par la loi. L'Auteur a examiné la législation qui concerne les produits contenant OGM et les problèmes liés à leur application.

Bibliografia

1. Poli G. In: "Biotecnologie: principi e applicazioni dell'ingegneria genetica", UTET, 1997.
2. Poli G., Dall'Ara P. Biotecnologie: scienza del futuro. *Alimenta*, 9, 183-190, 1997.
3. Cantarelli C. Biotechnology in the food industry: an overview. *Italian Journal of Food Science*, 1, 9-24, 1990.

4. Consonni G., Gavazzi G. Alcune considerazioni sulle piante transgeniche. In: "OGM nei formulati alimentari", Cd-Rom, ARS Ed. Informatiche s.r.l., 2000.
5. Poli G., Riva F. Biotecnologie: Scienza del futuro. In: "OGM nei formulati alimentari", Cd-Rom, ARS Ed. Informatiche s.r.l., 2000.
6. Commissione U.E. *JRC*, Ottobre 1999.
7. Gelosa L. Alimenti transgenici e sicurezza umana ed ambientale. *Industrie Alimentari*, 39, 13-16, 2000.
8. Direttiva CE 90/220 del 23.04.90 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 117 del 08.05.1990.
9. Decreto Legge 92/93 del 03.03.93 In: Gazzetta Ufficiale Supplemento Ordinario, serie generale n° 78 del 03.04.1993.
10. Regolamento CE 258/97 del 27.01.97 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 43 del 14.02.1997.
11. Direttiva CEE 89/107 del 21.12.88 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 40 del 11.02.1989.
12. Direttiva CEE 88/388 del 22.06.88 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 184 del 15.07.1988
13. Direttiva CEE 88/344 del 13.06.88 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 157 del 24.06.1988.
14. Regolamento CE 1139/98 del 26.05.98 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 159 del 03.06.1998.
15. Decisione CE 96/281 del 03.04.96 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 107 del 30.04.1996.
16. Decisione CE 97/98 del 23.01.97 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 31 del 01.02.1997.
17. Regolamento CE 50/2000 del 10.01.00 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 6 del 11.01.2000.
18. Regolamento CE 49/2000 del 10.01.00 In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L n° 6 del 10.01.2000.

ALIMENTI PER L'INFANZIA: PANORAMICA DEGLI ASPETTI LEGALI

Pizzin G.°

*° Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine
Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Parma.*

Introduzione

La necessità di fare il punto sulla situazione normativa attualmente in vigore in Italia in materia di prodotti destinati ad una "alimentazione particolare", con particolare attenzione a quelli destinati ai lattanti ed ai bambini, mi ha portato ad analizzare il contesto sociale ed economico europeo, nonché mondiale, dove questi alimenti si stanno affermando come prodotti di consumo di massa. In Italia questi prodotti, nati come risposta alle mutate situazioni sociali ed economiche dell'era industriale, sono stati un fisiologico risultato della rapidissima evoluzione scientifico-tecnologica, nonché ideologica, del nostro paese, dove molte delle antiche abitudini hanno cessato di esistere: fra queste anche il modo con il quale vengono allevati e cresciuti i bambini, non più con materie prime direttamente approvvigionate dalla madre e successivamente preparate per la somministrazione dalla medesima, ma utilizzando prodotti pronti per l'uso confezionati dalla grande industria. Le mani e l'esperienza ancestrale delle madri sono state "sostituite" e affidate all'esperienza e alla capacità del produttore dell'industria alimentare.

I primi alimenti "artificiali" per lattanti, di cui si ricordi la diffusione al pubblico, sono stati prodotti nel 1835 (latte vaccino condensato Newton), come concreta risposta ad esigenze patologiche dell'allattamento al seno: assenza di latte della madre, patologie della madre o intolleranza al latte vaccino proposto come alternativa all'allattamento al seno. Questi alimenti si sono imposti

poi come preziosissimo supporto a situazioni che altrimenti avrebbero avuto un esito infausto per il bambino.

Accolti quindi dai pediatri come "terapia" in molte situazioni nutrizionali difficili, sono stati successivamente introdotti non più come ausili, ma come sostituti dell'allattamento naturale. Stessa sorte è toccata agli alimenti impiegati nello svezzamento, seconda fase estremamente delicata per l'accrescimento di un individuo, che, dapprima utilizzati con estrema cautela, sono oggi abitualmente somministrati ai bambini soprattutto come primario apporto proteico della dieta.

Tutte scelte, queste, che stanno condizionando il mercato di questi alimenti che, nonostante la diminuita natalità (in Occidente) induca a pensare ad un decremento della domanda di questi prodotti sul mercato, stanno rappresentando invece per le aziende produttrici un'opportunità estremamente interessante. La massiva richiesta di autorizzazioni alla produzione di questi prodotti, infatti, ha indotto il Ministero della Sanità a fornire ulteriori indicazioni riguardo le modalità di presentazione delle richieste con l'emanazione della Circolare 17 luglio 2000, n.11.

La velocità con la quale le conoscenze scientifiche e tecnologiche condizionano la produzione di questi alimenti è tale da rendere necessario un adeguamento altrettanto rapido della normativa, per evitare che essa rimanga inadeguata alle nuove realtà imprenditoriali che soffrirebbero nella concorrenza con prodotti di altri paesi, più veloci ed efficienti nel regolamentare produzione e commercializzazione di prodotti ritenuti da sempre particolarmente delicati, sia per la tipologia di utenza alla quale vengono destinati, sia per la loro stessa natura.

Normativa internazionale: attività del Codex Alimentarius in materia di alimenti

per l'infanzia

La necessità di regolamentare adeguatamente il settore degli alimenti destinati all'infanzia è da sempre stata oggetto dell'attenzione della comunità internazionale e, attraverso la commissione Codex Alimentarius della FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION e della WORLD HEALTH ORGANIZATION, è stato elaborato un insieme di norme, di codici d'uso, di direttive e di raccomandazioni, cui tutti gli Stati membri della FAO/WHO hanno aderito, da utilizzarsi come punto di riferimento normativo in materia di produzione e commercializzazione degli alimenti destinati all'infanzia. L'obiettivo, duplice, era rappresentato dall'esigenza di facilitare gli scambi dei prodotti a livello mondiale e, nel contempo, di proteggere la salute dei bambini.

IL Volume 4 del Codex Alimentarius Commission raccoglie le raccomandazioni sulla nutrizione e la descrizione dei cibi destinati ad "un'alimentazione particolare", includendo in questa definizione gli alimenti destinati ai neonati e ai bambini e le relative norme igieniche di produzione; in questo volume sono riportate le norme di etichettatura di questi prodotti (CODEX-STAN 146-1985), i principi generali per l'aggiunta dei nutrienti essenziali nei cibi (Codex Alimentarius Commission Guideline 09-1987, emendata nel 1989 e nel 1991), gli standard per le "infant formula" (CODEX STAN 72-1981, emendati nel 1983, nel 1985 e nel 1987), norma per gli standard sugli alimenti diversificati dell'infanzia "canned baby foods" (CODEX STAN 73-1981, emendato nel 1985, nel 1987 e nel 1989), standard per gli alimenti a base di cereali per lattanti e bambini nella prima infanzia (CODEX STAN 74-1981, emendato nel 1985, nel 1987, nel 1989 e nel 1991, e attualmente in corso di ulteriore revisione) e infine gli standard per le formule di proseguimento (CODEX STAN 156-1987, emendati nel 1989).

In questo volume possiamo inoltre trovare le linee guida

per la produzione di preparati alimentari di complemento destinati a lattanti a partire da sei mesi fino ad un anno e a bambini da uno a tre anni (Codex Alimentarius Commission Guideline 08-1991).

Il testo riporta anche le raccomandazioni internazionali delle norme igieniche per la produzione di alimenti per i neonati e i bambini, (Codex Alimentarius Commission-Recommended Code of Practice 21-1979).

Per quanto concerne l'attività di analisi e di campionamento, il volume 13 del CODEX ALIMENTARIUS rappresenta il riferimento metodologico seguito dai laboratori internazionali di analisi e controllo. Il contenuto dei volumi del Codex Alimentarius è allo studio, da parte di esperti, presso il Ministero della Sanità, per capirne lo spirito e la corretta modalità di applicazione nella nostra normativa.

Normativa europea: legislazione comunitaria

La storia recente dell'attività legislativa dell'Unione Europea ha portato ad una concreta e organica regolamentazione della materia qui considerata solo a partire dagli anni Settanta, con l'emanazione della Direttiva 77/94/CEE, con la quale si sono definiti i prodotti dietetici e gli alimenti per la prima infanzia come "prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare". Tale direttiva in Italia non ha avuto attuazione con un provvedimento autonomo, ma è stata recepita limitatamente agli aspetti concernenti l'etichettatura con il D.P.R. 18 Maggio 1982, n. 322: "Attuazione della Direttiva 79/112/CEE, relativa all'etichettatura dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale ed alla relativa pubblicità, nonché della Direttiva 77/94/CEE, relativa ai prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare". Il suddetto D. P.R. 322/82 è stato abrogato dal Decreto Legislativo 27 Gennaio 1992, n. 109, che disciplina l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari, ed

è pertanto applicabile anche ai prodotti destinati ad un'alimentazione particolare per quanto non espressamente previsto dalla normativa di settore. Tale decreto è stato modificato dal Decreto Presidente Consiglio dei Ministri 6 Febbraio 1996, n. 175, per quanto concerne gli allegati I e II, quindi alla legislazione non è seguito il recepimento completo della direttiva; si dovrà attendere il 1989 con l'emanazione della normativa "orizzontale": Direttiva 89/398/CEE, da considerarsi la prima direttiva recepita dall'ordinamento giuridico nazionale in materia di "prodotti alimentari destinati ad una alimentazione particolare". Da qualche anno, alla luce del principio della sussidiarietà, si discute in ambito comunitario sulla opportunità di dare seguito all'impegno, assunto con la direttiva quadro 89/398/CEE, di emanare tutte le direttive specifiche programmate. Al momento attuale risultano regolamentate le prime quattro delle nove categorie previste nella Direttiva 89/398/CEE. Le formule per lattanti, formule di proseguimento e altri alimenti per l'infanzia sono tra quelle regolamentate. Queste norme specifiche sono state considerate irrinunciabili e prioritarie, in quanto riguardano prodotti destinati a gruppi potenzialmente vulnerabili della popolazione, per i quali rappresentano la totalità, o una parte considerevole, della razione alimentare per periodi durevoli. La Direttiva 89/398 è stata poi modificata dalla Direttiva 96/84/CE del 19 Dicembre 1996, la quale fissa le modalità per poter immettere in commercio con una *autorizzazione temporanea* prodotti che, per aspetti legati al progresso scientifico e tecnologico, si discostino dai requisiti fissati dalle direttive specifiche, in attesa di una eventuale modifica della norma. Ancora più recentemente la direttiva 89/398 è stata modificata dalla Direttiva 1999/41/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 7 Giugno 1999, con la variazione dell'elenco degli alimenti oggetto di direttive specifiche.

Definita in modo orizzontale la regolamentazione di suddetta materia, si è ovviamente passati, nel tempo, a definire dal punto di vista legislativo, in modo

particolare, la lista degli alimenti considerati nella normativa orizzontale, concretizzatasi con l'emanazione della Direttiva verticale 91/321/CEE

La Direttiva 91/321/CEE del 14 Maggio 1991, avente come oggetto "gli alimenti per lattanti e gli alimenti di proseguimento", è la prima "direttiva verticale" che abbia stabilito e fissato i criteri di composizione e di etichettatura dei sostituti del latte materno; è rimasta in uso per cinque anni ed è stata successivamente modificata con la Direttiva 96/4/CE, che ha così introdotto modifiche riguardanti:

1. i criteri per segnalare nell'etichettatura di una formula per lattanti, destinata a soggetti a rischio familiare di allergia alle proteine del latte, il suo ridotto potere allergenico e antigenico;
2. i criteri per l'aggiunta di alfa-linoleico e di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena;
3. la possibilità di introdurre nucleotidi e il loro impiego;
4. la possibilità di introdurre il selenio tra gli oligoelementi, e i limiti di impiego.

A questa prima modifica è seguito un ulteriore adeguamento con una Direttiva della Commissione 1999/50/CE del 25 Maggio 1999, che prevede importanti limiti riguardanti gli antiparassitari, che non devono essere presenti in quantità superiori a 0,01mg/kg di prodotto pronto; inoltre alcuni antiparassitari elencati all'allegato IX (in via di definizione) della presente Direttiva *non devono* assolutamente essere presenti. Vengono inoltre considerati "residuo di antiparassitario" sia il residuo del prodotto fitosanitario considerato, sia i suoi metaboliti e i prodotti della sua degradazione rilevati negli alimenti per lattanti o alimenti di proseguimento. Si ricorda ancora che in quest'ultima direttiva si accenna alla necessità di fissare, "ove sia necessario", criteri microbiologici che a tutt'oggi non sono ancora stati

chiaramente definiti.

Con una seconda normativa "verticale", Direttiva 96/5/CEE datata 16 Febbraio 1996, si è completata la regolamentazione delle categorie di alimenti per la prima infanzia, elencate già, per quanto attiene il nostro ordinamento, sempre nell'allegato I del Decreto Legislativo 111/92, fissandone i criteri di composizione e di etichettatura sia per gli alimenti a base di cereali che per i baby-foods. Gli adeguamenti successivi a queste "regole base" si sono concretizzati il 2 Giugno 1998 con l'emanazione della Direttiva 98/36/CE, con la quale si sono modificati gli allegati della 96/5/CE per quanto concerne alcuni degli aspetti nutrizionali, e ancora più recentemente con una Direttiva della Commissione 1999/39/CE, con la quale si viene definendo il concetto di "residuo antiparassitario", dal punto di vista giuridico, come "residuo di un prodotto fitosanitario rilevato negli alimenti a base di cereali e negli alimenti destinati ai lattanti e ai bambini, ai sensi dell'articolo 2, paragrafo 1, della Direttiva 91/414/CEE, compresi i suoi metaboliti e i prodotti della sua degradazione o reazione". In questa norma si afferma per la prima volta che è necessario stabilire i livelli massimi delle sostanze che non devono essere presenti in quantità tali da poter nuocere alla salute dei lattanti o dei bambini, sia negli alimenti a base di cereali che negli altri alimenti, destinati ai lattanti, pronti per essere consumati o ricostituiti in base alle indicazioni del fabbricante. In questi alimenti *non devono* essere presenti infatti *residui di antiparassitari* in quantità superiori a 0,01 mg/kg, ad eccezione delle sostanze i cui livelli specifici di residui figureranno nell'allegato VII, che è ancora in fase di definizione. Si specifica inoltre che i fitosanitari elencati nell'allegato VIII, che comunque non sono ancora stati specificati e sono in fase di definizione da parte della commissione, non devono essere utilizzati nella coltivazione dei prodotti agricoli destinati alla produzione di alimenti a base di cereali e di altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini. Anche in questa Direttiva la necessità di considerare il problema microbiologico di queste derrate alimentari si

ritrova in una piccola nota che così recita "ove necessario verranno definiti i "*criteri microbiologici*". Per il momento ci si attiene a criteri d'igiene di produzione e commercializzazione di detti prodotti in uso sul territorio nazionale.

La normativa comunitaria per questa materia si completa con la Direttiva 92/52/CEE del Consiglio, del 18 Giugno 1992, sugli alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento destinati all'esportazione verso Paesi terzi; tale direttiva, per le formule per lattanti e le formule di proseguimento esportate al di fuori dell'Unione Europea, ammette delle deroghe per quanto riguarda i criteri di composizione, quando quest'ultima risulti comunque conforme alle disposizioni fissate per tali prodotti dalle analoghe norme del Codex Alimentarius.

Un altro aspetto normativo importante per questi prodotti riguarda sia l'etichettatura che la regolamentazione dell'additivazione dei prodotti in questione.

Le norme dell'etichettatura pongono in risalto la chiara volontà del legislatore di tutelare l'allattamento al seno ed assicurare che l'utilizzazione dei sostituti del latte materno avvenga in modo corretto e solo in caso di necessità, cioè di impossibilità a comportarsi diversamente. Di grande rilievo sono state le Direttive 89/395/CEE e 89/396/CEE in tema di etichettatura, presentazione e pubblicità dei prodotti alimentari, alla base di ulteriori definizioni e precisazioni per quanto riguarda gli alimenti per lattanti e gli alimenti di proseguimento nonché per gli alimenti a base di cereali e i baby food.

La disciplina europea per ciò che concerne l'impiego degli additivi alimentari nella preparazione e nella conservazione degli alimenti si è concretizzata con l'emanazione delle Direttive 94/34/CE, 94/35/CE, 94/36/

CE, 95/2/CE, 95/31/CE, recepite in Italia con un unico regolamento, emanato con un Decreto del Ministero della Sanità del 27 Febbraio 1996 n. 209. Con l'emanazione delle Direttive 96/83/CE, 96/85/CE e della Decisione 292/97/CE si è aggiornata ulteriormente la disciplina sugli additivi alimentari, per la preparazione e la conservazione delle sostanze alimentari, e si può tranquillamente presumere che vi potranno essere ulteriori cambiamenti su tale argomento nel breve periodo, considerando la vasta gamma di nuovi composti proposti all'industria per i miglioramenti tecnologici di produzione.

Normativa nazionale

I prodotti oggetto di questa legislazione rientrano nell'attuale definizione di alimenti destinati ad un'alimentazione particolare (secondo il D. L.vo n. 111/92), intendendo con questo termine alimenti che, per la loro particolare composizione o per il particolare processo di fabbricazione, presentano le seguenti caratteristiche:

1. si distinguono nettamente dai prodotti d'uso corrente;
2. sono adatti all'obiettivo nutrizionale indicato;
3. sono commercializzati in modo da indicare che sono conformi a tale obiettivo.

Questi alimenti devono rispondere alle esigenze nutrizionali particolari delle seguenti categorie:

- a. persone il cui processo d'assimilazione o il cui metabolismo è perturbato;
- b. persone che si trovano in condizioni fisiologiche particolari, in forza delle quali possono trarre benefici particolari dall'assunzione controllata di talune sostanze negli alimenti;
- c. lattanti o bambini nella prima infanzia, in buona salute. Con la definizione "lattanti", dal

punto di vista giuridico, si indicano i bambini d'età inferiore a 12 mesi; con la definizione "bambini nella prima infanzia", i bambini d'età compresa da un anno fino a tre anni.

I suddetti prodotti possono essere caratterizzati dall'indicazione "dietetico" o "di regime", eccetto gli alimenti indicati al punto 3), dove tale indicazione è assolutamente vietata. La categoria di utenza alla quale mi riferisco in questo testo è quella del punto c), vale a dire quella dei lattanti, cioè soggetti d'età compresa tra zero e un anno, e bambini nella prima infanzia, cioè soggetti d'età compresa tra uno e tre anni.

Evoluzione cronologica della normativa nazionale

In Italia per quasi quarant'anni, i prodotti per la prima infanzia sono stati disciplinati, assieme ai prodotti dietetici, dalla Legge 23 Marzo 1952, n. 327 e dal suo regolamento d'esecuzione, D.P.R. 30 Maggio 1953 n. 570. Le disposizioni di quest'ultimo, fino al momento dell'applicazione del D.P.R. 19 Gennaio 1998, n. 131, erano rimaste in vigore per l'integrazione e l'esecuzione del Decreto Legislativo 111/92 in quanto compatibili, ai sensi dell'art. 18 del Decreto Legislativo medesimo.

Con l'adozione della Direttiva CEE 89/398 del 3 Maggio 1989, relativa al riavvicinamento delle legislazioni degli stati membri concernenti i prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare, ed il recepimento della stessa in Italia con il decreto legislativo 27 Gennaio 1992, n. 111 (G.U. 17/2/1992) n. 39, si è aperta la fase d'armonizzazione comunitaria e revisione della normativa nazionale di questo settore; in Italia, pertanto, oltre al citato Decreto Legislativo n. 111 del 1992, i provvedimenti che disciplinano questo settore sono i seguenti:

- Circ. Min. San. 22/3/1980 n. 27 - Vigilanza sulla

produzione e sul commercio degli alimenti per la prima infanzia e dei prodotti dietetici.

- Circ. Min. San. 22/3/1984 n. 27 - Vigilanza sulla produzione e sul commercio degli alimenti per la prima infanzia e dei prodotti dietetici.

- Circ. Min. San. 18/1/1988 n. 6 - Stabilimenti di produzione di prodotti dietetici e di alimenti per la prima infanzia.

- D.P.R. 24/1/1991, n. 56 - Regolamento recante modificazione al D.P.R. 30 Maggio 1953, n. 578, concernente il regolamento di esecuzione della legge 29 marzo 1951, n. 327 sulla disciplina della produzione e vendita di alimenti per la prima infanzia e di prodotti dietetici.

- Circ. Min. San. 9/2/1991, n. 5 - Vigilanza sulla produzione e sul commercio degli alimenti per l'infanzia e dei prodotti dietetici.

- D.L.vo 25/1/1992, n. 74 - Regolamento recante modificazione al D.P.R. 30 Maggio 1953, n. 578, concernente il regolamento di esecuzione della legge 29 marzo 1951, n. 327 sulla disciplina della vendita di alimenti per la prima infanzia e di prodotti dietetici (recentemente abrogata come da art. 10 del D.P.R. 131 del 19/01/1998).

- D.L.vo 27/1/1992, n. 109

- D.M. 20/8/1992 - Nuove tariffe delle tasse concessioni governative.

- D.M. 14/02/1991 (è attualmente sostituito dal D.M. 10/07/2000).

- D.L.vo 16/2/1993, n. 77.

- D.M. 19/7/1993 - Tariffe e diritti spettanti al Ministero

della sanità.

- D.M. 9/12/1993 - Elenco stabilimenti autorizzati alla produzione e al confezionamento degli alimenti destinati ad un'alimentazione particolare.

- D.M. 14/2/1994, n. 225 - Regolamento recante modificazioni al D.M. 31 Marzo 1965 concernente la disciplina degli additivi consentiti nelle preparazioni e per la conservazione.

- D.M. 21/2/1994 - Elenco dei prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare per i quali viene confermata l'autorizzazione alla commercializzazione ai sensi dell'art. 16 comma 3 del decreto legislativo 27 Gennaio n. 111.

- D.M. 21/2/1994 - Revoca di autorizzazione relativa alla produzione a scopo di vendita di prodotti destinati ad un'alimentazione particolare.

- D.M. 06/4/1994, n. 500 - Regolamento concernente l'attuazione delle direttive 91/321/CEE del 14 Maggio 1991 sugli alimenti di proseguimento e 92/52/CEE del Consiglio del 18 Giugno 1992 sugli alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento destinati all'esportazione verso Paesi terzi.

- D.M. 27/10/1994, n. 759 - Additivi.

- DPR 14/7/1995 n. 132 - Atto di indirizzo e coordinamento alle regioni e provincie autonome sui criteri uniformi per l'elaborazione dei programmi di controllo ufficiale degli alimenti e bevande.

- Decreto Presidente Consiglio dei Ministri 6/2/1996, n. 175 - Regolamento di attuazione della direttiva 93/102 recante modifica della direttiva 79/112/CE concernente l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale.

- D.M. 27/2/1996, n. 209 - Regolamento concernente la disciplina degli additivi consentiti nella preparazione delle sostanze alimentari in attuazione delle Direttive (94/34, 94/35, 95/2 e 95/31) CE.

- D.L.vo 19/3/1996, n. 241 - Disciplina sanzionatoria delle Direttive 91/321/CEE e 92/52/CEE in materia di alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento.

- D.M. 14/10/1996 - Elenco degli stabilimenti autorizzati alla produzione e al confezionamento degli alimenti destinati ad un'alimentazione particolare.

- D.M. 29/1/1997 - Misure di protezione nei confronti dell'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) per quanto riguarda gli alimenti per l'infanzia.

- D.M. 19/12/1997 - Attuazione delle raccomandazioni della Commissione dell'Unione Europea n. 96/290/CE del 17 Aprile 1996 e 97/77/CE del 8 Gennaio 1997 relative ad un programma coordinato di controllo ufficiale dei prodotti alimentari per gli anni 1996 e 1997.

- DPR 19/1/1998, n. 131 - Regolamento di esecuzione del Decreto Legislativo 27 Gennaio 1992, n. 111, in materia di prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare.

- Decreto Ministero della Sanità 30/04/1998, n. 250 - Regolamento recante aggiornamento del decreto ministeriale 27 Febbraio 1996, n. 209, concernente la disciplina degli additivi alimentari consentiti nella preparazione e nella conservazione delle sostanze alimentari, in attuazione delle direttive n. 96/83/CE e n. 96/85/CE e della decisione 97/292/CE.

- D.M. 1/6/1998, n. 518 - Regolamento recante norme di attuazione della Direttiva 96/4/CEE che modifica la Direttiva 91/321/CEE sugli alimenti per lattanti e gli alimenti di proseguimento.

- DPR 7/4/1999, n. 128 - Regolamento recante norme per l'attuazione delle Direttive 96/5/CE e 98/36/CE sugli alimenti a base di cereali e altri destinati a lattanti e a bambini.

- Circolare 17 luglio 2000, n. 11 Min. San. - Prodotti soggetti a notifica di etichette.

Conclusioni

Il nostro ordinamento giuridico, come del resto quello degli altri Stati membri dell'UE, ha subito importanti cambiamenti, sia con l'applicazione di regolamenti comunitari, che con l'attuazione di direttive, incidendo in taluni casi anche profondamente sull'applicazione delle norme nazionali. Anche in questo specifico settore dell'alimentazione destinata all'infanzia le sostanziali modifiche delle regole di produzione e commercializzazione hanno determinato dei cambiamenti nei comportamenti delle aziende più propense ad occuparsi di queste produzioni, sia per lo snellimento delle procedure autorizzative che per la severità dei controlli di dette produzioni.

Le direttive adottate nell'ambito della politica di riavvicinamento delle legislazioni nazionali degli Stati membri hanno anche contribuito a frenare molte iniziative nazionali dirette alla creazione di ostacoli agli scambi (vedi controversie sugli additivi e sulle modalità di vendita - *sentenza della Corte di Giustizia emessa nella causa n. C-391/92*), evitando così che venisse meno l'attuazione dell'art. 30 del Trattato di Roma.

Sempre nel pieno rispetto delle deroghe previste nell'art. 36 del medesimo, che, come ricordato, "ammette restrizioni al libero scambio [-]", con questi presupposti di base, e considerando che ancora ogni singolo Stato è Sovrano, ci si trova ora, dal punto di vista giuridico, in una difficile fase di transizione e di revisione di tutto il corpo normativo nazionale, anche perché le realtà che si sono dovute affrontare, nel

processo di uniformazione delle normative di ogni singolo stato membro, sono molteplici ed estremamente difforni tra loro (De Giovanni, G. 1999).

Dall'analisi della normativa risulta anche chiaro che molte sono ancora le lacune legislative in materia di garanzia igienico-sanitaria del prodotto in esame; è auspicabile pertanto, da parte degli organi competenti, una doverosa regolamentazione e la definizione di tutte le molecole, di sintesi e non, la cui presenza non sia consentita nei prodotti da somministrare ai lattanti e ai bambini, nonché dei limiti consentiti per i contaminanti biologici potenzialmente patogeni. Come pure, naturalmente, la regolamentazione dell'impiego degli Organismi Geneticamente Modificati, chiarendo l'attuale possibilità di impiego in questi alimenti (attualmente nella percentuale dell'1%).

Concludendo, quindi, possiamo affermare che la normativa, seppure così vasta nella sua stesura, presenta delle lacune che, vista la delicatezza dell'argomento, dovrebbero essere affrontate con una certa sollecitudine.

Parole chiave: alimenti, lattanti, bambini, normativa.

Key words: foods, infant, children, regulation, law.

Mots clé: aliments, nourrissons, enfants, lois.

Riassunto - Gli alimenti destinati ai lattanti e ai bambini hanno gradualmente sostituito l'allattamento naturale e hanno cambiato l'alimentazione del bambino durante lo svezzamento. L'aumento delle conoscenze scientifiche e tecnologiche condiziona la produzione di questi alimenti rendendo necessario un adeguamento della normativa. L'autore tratta l'evoluzione della normativa europea e italiana che disciplina la produzione industriale e la commercializzazione di questi prodotti.

Summary - *Infant and baby foods: an overview of legal aspects.* Infant and baby foods gradually substituted breast-feeding and changed the diet of the baby during the period of weaning. The growth of

scientific and technologic knowledge affects the production of this kind of foods and makes it necessary to upgrade the regulation. The author treats the evolution of european and italian law which regulate industrial production and commercialization of such products.

Résumé - *Aliments pour l'enfance: coup d'oeil aux aspects légal*. Les aliments objet de ce travail, ont graduellement modifié soi l'allaitement que l'alimentation pendant le sevrage. Les nouvelles acquisitions scientifique et technologique sont on train de conditionner la production de ces aliments et de la même façon la lois qui vont la réglé. L'auteur à ici considéré l'évolution des lois en vigoeur en Europe et Italie en ce qui concerne la production et la commercialisation des denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons (les enfants âgés de moins de douze mois), et aux enfants en bas âge (les enfants âgés de un à trois ans).

Bibliografia

Il materiale bibliografico è a disposizione presso l'autore.

ASPETTO TECNICO-NORMATIVO DELLA GESTIONE DEI RIFIUTI SANITARI IN AMBITO VETERINARIO

Signorini G.¹, Biagi G.²,
Bonardi S.¹, Nannipieri S.³

*¹Istituto Ispezione Alimenti Origine Animale -
Università di Parma*

*²Dipartimento di Clinica Veterinaria - Direttore
Prof. Fabio Carlucci*

³Veterinario Dirigente 1° livello - ASL 3 - Pistoia

Il lavoro spetta in parti uguali agli autori.
Lavoro eseguito con fondi di Ateneo dell'Università degli Studi di
Pisa.

Introduzione

In ambito veterinario, sia nelle aziende zootecniche che in qualsiasi struttura veterinaria, è notevole la quantità sia di residui di farmaci veterinari (farmaci scaduti, flaconi vuoti di sostanze iniettabili o di vaccini, da vivi ad attenuati a spenti, ecc.) sia di contenitori o barattoli contenenti premiscele per alimenti medicamentosi e/o farmaci veterinari prefabbricati, sia di residui diagnostici ed altri rifiuti la cui raccolta e smaltimento richiedono particolari precauzioni (quali ad esempio aghi, siringhe, bisturi, rasoi, garze, provette, abbigliamento ed indumenti monouso), sia di carcasse di animali delle più differenti specie morti durante il periodo di allevamento finalizzato ai più disparati scopi produttivi o durante i trasporti, se non deceduti in ambulatori o cliniche veterinarie.

Per quanto riguarda gli animali in produzione, morti per cause che li rendono inidonei al consumo umano, in genere vengono attualmente ceduti dietro pagamento a strutture idonee finalizzate alla riutilizzazione industriale della materia prima, e non allo smaltimento, in quanto l'allevatore non è in grado di procedere alla

trasformazione diretta di questo materiale. Tutto l'altro materiale è rifiuto, e più specificatamente rifiuto speciale pericoloso e come tale deve essere smaltito secondo precise regole.

La Legislazione

Il Decreto Legislativo (D. Lgs.) n. 508 del 14 dicembre 1992, fatte salve le norme sanitarie e di polizia veterinaria riguardanti l'eradicazione ed il controllo delle malattie degli animali e la produzione di alimenti composti per animali contenenti prodotti animali, stabilisce le norme sanitarie e di polizia veterinaria da applicare ai procedimenti di eliminazione e/o trasformazione dei rifiuti di origine animale per distruggere gli agenti patogeni eventualmente in essi presenti, nonché alla produzione per gli animali di alimenti di origine animale con metodi atti ad evitare che essi possano contenere agenti patogeni ed all'immissione sul mercato di rifiuti di origine animale destinati a fini diversi dal consumo umano.

Il Decreto dà la definizione di rifiuti di origine animale (carcasse o parti di animali o pesci o prodotti di origine animale giudicati non idonei al consumo umano diretto a norma delle leggi vigenti, esclusi gli escreti degli animali e i rifiuti di cucina e dei pasti. Il termine "giudicati" presuppone un giudizio comunque sfavorevole emesso da un veterinario che ha determinato la sottrazione dei prodotti al consumo umano) e li differenzia in materiali ad alto rischio ed a basso rischio. Sono materiali ad alto rischio:

- tutti gli animali, di diverse specie, tenuti a scopi di produzione agricola, morti ma non macellati per consumo umano, compresi quelli nati morti o da aborto;
- gli animali abbattuti in seguito a disposizioni di polizia veterinaria;
- rifiuti, sangue compreso, provenienti da animali che, all'ispezione in sede di

macellazione, hanno presentato sintomi clinici o segni di malattie trasmissibili all'uomo;

- tutte le parti di animali macellati che non sono state presentate alla visita post-mortem (fanno eccezione cuoi, pelli, zoccoli, penne, piume, lana, pelame, corna, sangue);
- le carni, di qualsiasi specie animale, in stato di deterioramento e quindi potenziale rischio per la salute dell'uomo e degli altri animali;
- animali e carni, di qualsiasi specie animale, prodotti a base di carne, prodotti lattiero-caseari e altri prodotti di origine animale provenienti da Paesi terzi non conformi ai requisiti sanitari previsti dalle normative comunitarie per l'importazione;
- animali da reddito morti durante il trasporto, a meno che non siano stati sottoposti alla macellazione di emergenza per ragioni di benessere;
- rifiuti di origine animale contenenti residui di sostanze potenzialmente pericolose per la salute dell'uomo o degli animali e latte, carne o prodotti di origine animale che, per la presenza di tali residui, non sono adatti al consumo umano;
- pesci con sintomi clinici o segni di malattie trasmissibili all'uomo o ai pesci.

Tali materiali possono essere sottoposti a trasformazione solo in stabilimenti di trasformazione ad alto rischio, riconosciuti dal Ministero della sanità o, in alternativa, devono essere eliminati mediante incenerimento o sotterramento su decisione della autorità sanitaria locale. Questo sistema di eliminazione è attuato:

- quando si paventa la possibilità che durante il trasporto si propaghino i rischi di una malattia epizootica che ha colpito, o si sospetta abbia colpito, gli animali;
- quando si ritiene che gli animali siano affetti da malattie gravi, o si sospetta che lo siano, o

contengano residui pericolosi per la salute umana ed animale e resistenti ad un trattamento termico insufficiente;

- quando si valuta che lo stabilimento di trasformazione di materiali ad alto rischio sia sottoposto a carichi di lavoro eccessivo per la presenza diffusa di una malattia epizootica;
- quando si accerta che i rifiuti provengono da luoghi di difficile accesso o che la quantità e la distanza dallo stabilimento non giustificano la raccolta stessa.

Qualora si ricorra al sotterramento, questo deve essere effettuato, previo trattamento con apposito disinfettante, in terreno adeguato per evitare contaminazione di falde freatiche o danni all'ambiente e ad una profondità sufficiente ad impedire l'accesso ai carnivori.

I materiali a basso rischio sono tutti quei rifiuti di origine animale diversi da quelli precedentemente elencati, a meno che essi, a giudizio del servizio veterinario della ASL, comportino rischi particolari di diffusione di malattie ad animali o all'uomo. Rientrano in questa categoria anche cuoi, pelli, zoccoli, penne, piume, lana, pelame, corna, sangue, pesce catturato in alto mare destinato alla produzione di farina di pesce e le frattaglie fresche di pesce provenienti da stabilimenti che fabbricano prodotti a base di pesce destinati al consumo umano. Vale la pena di sottolineare che miscugli di tali materiali devono essere trattati insieme ai materiali ad alto rischio. Anche gli stabilimenti di trasformazione che trattano materiale a basso rischio devono essere riconosciuti dal Ministero della sanità dimostrando di rispondere a specifiche norme igieniche in modo da garantire le operazioni di trasformazione ed i requisiti dei prodotti finali.

Il D. Lgs. n. 508/92 è corredato di due allegati che stabiliscono, il primo, le "Norme igieniche per la raccolta ed il trasporto dei rifiuti di origine animale", ed il secondo, le "Norme di igiene imposte agli stabilimenti di

trasformazione di rifiuti di origine animale". L'autorità competente esige la compilazione di registri e di documenti che accompagnino tali materiali durante il trasporto fino al luogo in cui sono eliminati. Il modello del documento che deve scortare i rifiuti di origine animale ad alto o basso rischio è riportato nel Decreto Ministeriale 26 marzo 1994 "Raccolta e trasporto di rifiuti di origine animale" e deve riportare il numero progressivo, la data, la ragione sociale dello speditore, del trasportatore e del destinatario (per quest'ultimo è necessario anche il numero di riconoscimento se si tratta di stabilimento di trasformazione), il tipo e la quantità di rifiuto, la dichiarazione di avvenuto lavaggio e disinfezione dell'automezzo. Deve essere redatto in triplice copia, di cui una viene trattenuta dal produttore, una dal trasportatore ed una dal gestore dello stabilimento di trasformazione. Tale documento dovrà essere controfirmato da un veterinario ufficiale sia all'atto della partenza sia all'atto dell'arrivo se il trasporto dei rifiuti deriva dall'applicazione di misure di polizia veterinaria ed una copia deve essere consegnata al servizio veterinario dell'unità sanitaria locale di destinazione.

Il D. Lgs. n. 22 del 15 febbraio 1997 "Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio", o decreto Ronchi, detta le norme per la gestione dei rifiuti (definiti come qualsiasi sostanza od oggetto che rientra nelle categorie riportate nell'Allegato A e di cui il detentore si disfi o abbia deciso o abbia l'obbligo di disfarsi), classificati secondo l'origine in rifiuti urbani e rifiuti speciali (e fra questi rientrano quelli derivanti da attività sanitarie) e secondo le caratteristiche di pericolosità in rifiuti pericolosi e rifiuti non pericolosi.

Il 4 agosto 2000 sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana è stato pubblicato il D.M. n. 219 del 26 giugno 2000: "Regolamento recante la disciplina per la gestione dei rifiuti sanitari, ai sensi dell'articolo 45 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22" con lo scopo,

enunciato nell'art. 1 di disciplinare "la gestione dei rifiuti sanitari e degli altri rifiuti (e cioè rifiuti da esumazioni e da estumulazioni, nonché rifiuti derivanti da altre attività cimiteriali esclusi i rifiuti vegetali provenienti da aree cimiteriali) allo scopo di garantire elevati livelli di tutela dell'ambiente e della salute pubblica e controlli efficaci" e di adottare, da parte delle autorità competenti e delle strutture sanitarie, "iniziative dirette a favorire in via prioritaria la prevenzione e la riduzione della produzione dei rifiuti", ed in particolare i "rifiuti sanitari devono essere gestiti in modo da diminuirne la pericolosità, da favorirne il reimpiego, il riciclaggio e il recupero e da ottimizzare la raccolta, il trasporto e lo smaltimento".

Per rifiuti sanitari si intendono quei rifiuti che derivano da strutture pubbliche e private che svolgono attività medica e veterinaria di prevenzione, di diagnosi, di cura, di riabilitazione e di ricerca. Un elenco esemplificativo delle tipologie dei rifiuti sanitari ed una loro classificazione a seconda della composizione, del tipo e del regime giuridico cui sono sottoposti, è riportato nell'allegato I del presente decreto.

Il campo di applicazione riguarda i rifiuti sanitari non pericolosi, cioè quelli non riportati nell'allegato "D" del D. Lgs. n. 22/97; i rifiuti sanitari pericolosi non a rischio infettivo, cioè quelli elencati a titolo esemplificativo nell'allegato II compresi tra i rifiuti pericolosi dell'allegato "D" del D. Lgs. n. 22/97 (sostanze chimiche di scarto, rifiuti contenenti mercurio, amianto e metalli pesanti in genere, e tutte quelle sostanze che possono essere tossiche, nocive, irritanti, ecc.); i rifiuti sanitari a rischio infettivo (individuati dalle voci 18.01.03, più specificatamente di ambito umano, e 18.02.02, rifiuti di interesse più prettamente veterinario, indicati con codice CER o Catalogo Europeo dei Rifiuti dalla sigla 18.02.00, rifiuti della ricerca, diagnosi, trattamento e prevenzione delle malattie negli animali ed in particolare 18.02.02, rifiuti la cui raccolta e smaltimento richiede precauzioni particolari in funzione della

prevenzione di infezioni, e 18.02.04, sostanze chimiche di scarto), cioè provenienti da attività veterinaria e contaminati da agenti patogeni per l'uomo e gli animali o che siano venuti a contatto con qualsiasi liquido biologico secreto od escreto per i quali sia ravvisato, dal veterinario competente, un rischio di patologia trasmissibile attraverso tali liquidi; rifiuti sanitari assimilati ai rifiuti urbani, cioè vetro carta, cartone, plastica, imballaggi in genere, materiali ingombranti, spazzatura, indumenti monouso, gessi ortopedici ed infine rifiuti sanitari a solo rischio infettivo assoggettati a procedimento di sterilizzazione in base a quanto previsto dall'art. 45 del D. Lgs. n. 22/97; rifiuti sanitari che richiedono particolari sistemi di gestione, cioè farmaci scaduti o inutilizzabili compresi i farmaci ed i materiali antiblastici per uso umano o veterinario, organi e parti anatomiche non riconoscibili ed animali da esperimento, sostanze stupefacenti e altre sostanze psicotrope.

Conclusioni

Il D. Lgs. n. 22/97 è una norma a finalità ecologica emanata per assicurare un'elevata protezione dell'ambiente, per prevenire e ridurre la produzione e la pericolosità dei rifiuti, per incrementare la riduzione dello smaltimento finale dei rifiuti mediante il reimpiego, il riciclaggio ed il recupero. L'Allegato A riassume tutte le categorie di rifiuti, e fra queste quelle di interesse veterinario sono essenzialmente quattro (Q1: residui di produzione e di consumo appresso non specificati; Q3: prodotti scaduti; Q14: prodotti di cui il detentore non si serve più; Q16: qualunque sostanza o materia che non rientri nelle categorie sopra citate). Tutti questi gruppi di prodotti hanno in comune la definizione di "rifiuto" che viene data all'art. 6 del Decreto: *qualsiasi sostanza di cui il detentore si disfi o abbia deciso o abbia l'obbligo di disfarsi*. Inoltre, i rifiuti veterinari sono classificati (art. 7) rifiuti speciali in quanto derivano da attività sanitarie e di prevenzione e cura degli animali dell'azienda ed in base a quanto disposto dall'Allegato D (elenco di rifiuti pericolosi estrapolati dal Codice Europeo dei Rifiuti in

base alla loro natura o all'attività che li ha prodotti ed ai costituenti che possono renderli pericolosi) si conclude che tutti i rifiuti sanitari veterinari rappresentati da medicinali scaduti, da flaconi o contenitori con residui di prodotto, da materiale monouso oppure derivanti da attività diagnostiche o di prevenzione di malattie non possono essere che considerati rifiuti sanitari pericolosi.

Il D. Lgs. n. 508/92 è una norma a finalità esclusivamente sanitaria emanata con lo scopo di distruggere gli agenti patogeni che potrebbero inquinare l'ambiente se i rifiuti di origine animale non venissero eliminati in modo corretto, di evitare qualsiasi rischio di diffusione degli agenti patogeni sottoponendo a stretto controllo la trasformazione dei rifiuti di origine animale, ed infine di limitare l'utilizzo di alcune materie. Anche alla luce delle recenti disposizioni, ed a maggior ragione in forza di queste, i materiali ad alto rischio *possono essere trasformati soltanto in uno stabilimento di trasformazione ad alto rischio riconosciuto dal Ministero della sanità oppure devono essere eliminati mediante incenerimento o sotterramento* secondo precise disposizioni che stabiliscono i metodi consentiti e le modalità da rispettare per lo smaltimento.

Il Decreto n. 219/00 è una norma a finalità sia ecologica che sanitaria in quanto è stata promulgata con lo scopo *di garantire elevati livelli di tutela dell'ambiente e della salute pubblica ed efficaci controlli.*

Nello specifico i rifiuti disciplinati, di interesse veterinario, sono:

- a) rifiuti sanitari non pericolosi,
- b) rifiuti sanitari assimilabili ai rifiuti urbani,
- c) rifiuti sanitari pericolosi non a rischio infettivo,
- d) rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo,

e) rifiuti sanitari che richiedono particolari modalità di smaltimento.

I rifiuti sanitari in genere sono quelli derivanti da strutture pubbliche e private (meglio specificati negli allegati I e II del regolamento che stiamo considerando) che svolgono attività veterinaria di prevenzione, diagnosi e terapia.

I rifiuti sanitari non pericolosi sono quelli non compresi tra i rifiuti elencati nell'allegato D del D. Lgs. 22/97. I rifiuti sanitari pericolosi non a rischio infettivo sono indicati nell'allegato II, come pure nell'allegato D del D. Lgs. 22/97.

I rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo sono quelli individuati dalle voci 18.01.03 e 18.02.02 dell'allegato D del D. Lgs. 22/97 e comprendono rifiuti che provengono da ambienti di isolamento infettivo, ove vi sia rischio di trasmissione aerogena, ovvero siano venuti a contatto con sangue, feci, urina ed altri liquidi biologici. Sono tali i rifiuti provenienti da attività veterinarie contaminati da agenti patogeni per l'uomo o per gli animali. I rifiuti sanitari a solo rischio infettivo possono essere assimilati ai rifiuti urbani se vengono sottoposti ad un trattamento di sterilizzazione tale da garantire un abbattimento della carica microbica non inferiore a 10^{-6} ed effettuata secondo la norma UNI 10384/94.

La gestione dei rifiuti sanitari è un problema estremamente complesso, che interessa diversi aspetti e diverse competenze delle ASL e dei Comuni. In questo settore entrano infatti problemi quali l'ambiente, la farmacovigilanza, il pericolo di contaminazioni di tipo biologico.

Il Servizio veterinario delle ASL vigila sull'utilizzo del farmaco veterinario secondo quanto stabilito dal D. Lgs. n. 119/92 e successive modifiche: questa vigilanza si effettua con ispezioni periodiche negli ambulatori veterinari, nelle farmacie, nei grossisti di medicinali

veterinari e negli allevamenti. Nel corso di queste ispezioni viene verificato il movimento di farmaci, dal produttore all'utilizzatore finale e, nel caso degli ambulatori veterinari, viene verificata l'esistenza di una convenzione con una ditta riconosciuta per il trattamento dei rifiuti speciali (aghi, provette, medicazioni, materiale proveniente da interventi chirurgici, ecc.). Nelle farmacie e negli ambulatori il controllo sulla movimentazione dei farmaci comprende anche la verifica delle scadenze dei medicinali presenti; non esiste comunque la possibilità di verificare le metodiche di eliminazione dei farmaci scaduti, rotti incidentalmente o comunque deteriorati, in quanto le ditte abilitate al ritiro di tali prodotti non rilasciano una distinta del materiale prelevato, ma solo un'indicazione relativa al quantitativo.

Il problema risulta ancora più pressante per gli allevatori, per i quali la legge non prevede alcun tipo di smaltimento obbligatorio; i più sensibili al problema conferiscono tali medicinali alle farmacie dove sono presenti i raccoglitori appositi per gli scaduti, senza naturalmente avere nessun tipo di certificazione attestante lo smaltimento.

Questo crea una falla nel controllo della movimentazione del farmaco veterinario, rendendo possibili usi impropri od illeciti di alcuni farmaci; un esempio tipico è rappresentato dal piccolo allevatore con pochi animali che non utilizza interamente un flacone di vaccino multidose (farmaco che una volta aperto ha una breve durata) e che "regala" il resto della confezione ad un amico che ha anch'egli pochi animali. In questo caso ci troviamo di fronte ad una violazione di più norme (D. Lgs. n. 119/92, D. Lgs. n. 336/99, Regolamento di Polizia Veterinaria) che non è neanche avvertita come tale da coloro che la commettono e che sfugge completamente alle possibilità di controllo del Servizio Veterinario.

Il problema è di difficile soluzione in quanto il rilascio di un'apposita certificazione o l'obbligo di una

convenzione con ditte specializzate esiterebbe in un onere burocratico e finanziario insostenibile per la gran parte della zootecnia italiana, caratterizzata dalla presenza di piccoli allevamenti poco più che a carattere hobbistico e distribuiti su territori spesso marginali.

La grande sfida dei veterinari italiani, pubblici e privati, è quindi quella di far cambiare la cultura della gestione del farmaco veterinario, attraverso un'opera capillare di informazione ed educazione degli allevatori.

RIASSUNTO - Il lavoro tratta della legislazione vigente inerente lo smaltimento dei rifiuti in ambito veterinario. Si fa cenno, in particolare, al D. Lgs. 508/92, le cui finalità hanno esclusivamente carattere sanitario, al D. Lgs. 22/97, di impostazione prettamente ecologica, ed al D.M. 219/00 a finalità sia ecologica che sanitaria.

SUMMARY - The Authors focus their attention on the sanitary Laws concerning veterinary waste materials. The Italian laws D. Lgs. 508/92, D. Lgs. 22/97, and D. M. 219/00 are reported.

Legislazione citata

- Decreto Legislativo n. 508, 14/12/92 - GURI n. 305, 30/12/92
- Decreto Ministeriale 26 marzo 1994 - GURI n. 101, 03/05/94
- Decreto Legislativo n. 22, 05/02/97 - GURI n. 33, 15/02/97
- Decreto n. 219, 26/06/00 - GURI n. 181, 04/08/00

Il Decreto legislativo n. 155/97: le implicazioni per il servizio veterinario

Signorini G.¹, Biagi G.²,
Bonardi S.¹, Cini A.³,
Chiavaro E.¹

*¹Istituto Ispezione Alimenti Origine Animale -
Università di Parma*

*²Dipartimento di Clinica Veterinaria - Direttore
Prof. Fabio Carlucci*

³Veterinario Dirigente 1° livello - ASL - Prato

Il lavoro spetta in parti uguali agli autori.
Lavoro eseguito con fondi di Ateneo dell'Università degli Studi di
Pisa.

Introduzione

Le problematiche relative alla produzione e certificazione delle derrate alimentari hanno interessato già da diversi anni i veterinari, da sempre in prima linea in questo settore, e gli imprenditori, che per poter competere in ambito europeo hanno dovuto adeguare le proprie esigenze produttive sia alle rinnovate richieste del mercato che al dettato normativo comunitario.

Il veterinario rimane sempre e comunque l'unico professionista responsabile dell'igiene e della sanità delle materie prime. Diventa pertanto improrogabile definire e precisare una nuova cultura della qualità che si estende alle procedure di lavorazione, all'igiene del personale ad essa preposto, alla produzione di alimenti garantiti sotto il profilo qualitativo. Tali attività sono direttamente influenzate dalle esigenze del mercato (volontarietà) e da disposizioni legislative (cogenza) che definiscono il concetto di sicurezza degli alimenti dalla produzione fino all'utilizzazione finale.

Nel settore alimentare la qualità viene definita dalla

capacità di rispondere alle seguenti prerogative:
soddisfazione (organolettica), sicurezza (salubrità),
sanità (nutritiva) e servizio (prontezza d'impiego).

Il ruolo del veterinario pubblico appare quindi destinato ad evolversi in quello di supervisore e garante della capacità dell'impresa di gestire il rischio igienico-sanitario.

Evoluzione della normativa

La Direttiva n. 89/397/CEE, recepita dal Decreto Legislativo (D. Lgs.) n. 123/93, definisce i Controlli Ufficiali di Igiene delle Derrate Alimentari e fissa un cambiamento del ruolo dell'autorità preposta ai controlli che non agisce più solo in forma repressiva, ma contribuisce ad indirizzare l'attività dell'imprenditore attraverso le ispezioni, il prelievo di campioni da analizzare, il controllo dell'igiene del personale, l'esame dei documenti di registrazione, l'esame dell'esistenza di un sistema di verifiche messe in opera dall'impresa e dei risultati che ne conseguono. Si stabilisce altresì che l'insieme dei controlli debba essere applicato a tutta la filiera produttiva: dalla fabbricazione, alla lavorazione, all'immagazzinamento, al trasporto, alla distribuzione, al commercio, all'importazione nella comunità.

Dal 1° Gennaio 1993 il servizio veterinario non è più tenuto ad assicurarsi alla frontiera della qualità igienica dei prodotti comunitari ed i controlli all'origine devono ritenersi sufficienti a tale assicurazione nell'ambito di una uniformazione delle legislazioni dei diversi Stati membri e di una sempre crescente responsabilizzazione delle imprese. Tale concetto di responsabilità è stato inserito per la prima volta nelle Direttive n. 88/657/CEE (recepita in Italia con il DPR n. 227/92, relativo alle carni macinate ed alle preparazioni di carni) e n. 89/437/CEE (recepita in Italia con il D. Lgs. n. 65/93, relativo agli ovoprodotti) anche se tali norme si limitano ad esigere esami di laboratorio sui prodotti, misurazioni della temperatura e registrazione

dei risultati.

E' solo nel 1991 con la Direttiva n. 91/492 (recepita con il D. Lgs. n. 530/92, per quanto riguarda il settore dei molluschi eduli lamellibranchi) che si comincia ad affrontare il concetto delle buone pratiche di lavorazione. Nelle normative successive viene introdotto anche il termine "autocontrollo".

Le Direttive verticali n. 91/493 (recepita in Italia con il D. Lgs. n. 531/92, relativo al settore della pesca), n. 91/497 (recepita in Italia con il D. Lgs. n. 286/94, relativo al settore delle carni fresche) e n. 92/46 e n. 92/47 (recepite in Italia rispettivamente con la Circolare del Ministero della Sanità n. 41/92 e con il DPR n. 54/97, relative al settore latte) fissano le regole sanitarie per la produzione e l'immissione sul mercato dei diversi prodotti considerati, prevedendo anche la predisposizione di un programma di formazione all'igiene per il personale, pianificato in collaborazione con i controllori ufficiali. L'autorità pubblica dovrà verificare l'esistenza e l'osservanza di misure di autocontrollo messe in essere dalle imprese. Tali concetti sono esemplificati nella Direttiva quadro del Consiglio n. 93/43, relativa all'igiene delle derrate alimentari, che si pone come norma orizzontale che rende generale ed estende il concetto dell'autocontrollo a tutte le fasi produttive della filiera, per tutti gli alimenti, in tutte le imprese alimentari di qualunque dimensione, prevedendo programmi di formazione all'igiene per il personale addetto.

In ambito nazionale, la Circolare 28 Luglio 1995 n. 21 fissa le "Disposizioni riguardanti le linee guida per l'elaborazione dei manuali volontari di corretta prassi igienica in materia di derrate alimentari" e si rivolge agli operatori del settore, nel tentativo di contribuire ad elaborare dei manuali di corretta prassi igienica per ogni tipo di impresa che operi nel settore alimentare. Oltre le definizioni relative alla terminologia utilizzata nell'applicazione delle pratiche di autocontrollo, vengono fornite alcune raccomandazioni per

l'elaborazione dei Manuali di corretta prassi igienica che dovranno essere messi a punto dalle organizzazioni di operatori del settore, che si avvarranno della collaborazione di tecnici con competenze specifiche nel settore interessato. Dovranno anche essere valutati i dati epidemiologici e le conoscenze scientifiche circa lo stato igienico dei diversi prodotti allo scopo di individuare i pericoli di contaminazione e di valutare i rischi sanitari in relazione al settore specifico, mettendone in evidenza la gravità e la frequenza con cui si verificano. In questo modo sarà possibile individuare gli specifici punti critici di controllo e sviluppare le linee guida normative a seconda delle esigenze del settore produttivo considerato.

I Manuali di corretta prassi igienica saranno poi convalidati sia dagli operatori del settore che valuteranno la loro applicabilità ed utilizzazione, sia dall'autorità pubblica che richiederà l'approvazione del Ministero della Sanità; durante questa fase di valutazione gli operatori del settore possono far pervenire commenti ed eventuali proposte di verifica al Ministero stesso che provvede, su parere del Consiglio Superiore di Sanità, a validare, emendare o ritirare il manuale stesso. I manuali validati saranno trasmessi alla Commissione Europea e potranno essere aggiornati successivamente con procedura analoga a quella descritta per la loro prima validazione.

Decreto Legislativo n. 155/97

Il D. Lgs. n. 155/97 stabilisce le norme generali di igiene dei prodotti alimentari e le modalità di verifica dell'osservanza di tali norme. All' art. 2, fra l'altro, definisce l'igiene dei prodotti alimentari (l'insieme delle misure atte a garantire la sicurezza e la salubrità dei prodotti stessi precisando che tali misure interessano tutte le fasi successive a quella della produzione primaria comprendendovi oltre alla preparazione, trasformazione, fabbricazione, ecc., anche la somministrazione finale al consumatore); l'industria

alimentare (ogni soggetto che esercita una o più delle attività descritte al punto precedente); gli alimenti salubri (i prodotti destinati al consumo umano, ritenuti idonei dal punto di vista igienico).

Per quanto riguarda la corretta applicazione dell'autocontrollo (art. 3), il responsabile dell'industria deve garantire che tutte le fasi del processo produttivo siano effettuate nel rispetto delle norme igieniche ed a questo scopo individuare nella propria attività ogni possibile fase critica per la sicurezza degli alimenti.

Al fine della corretta applicazione del sistema HACCP vengono definiti l'analisi dei potenziali rischi per gli alimenti; l'individuazione dei punti in cui possono verificarsi dei rischi per gli alimenti; le decisioni da adottare riguardo ai punti critici individuati, cioè quei punti che possono nuocere alla sicurezza dei prodotti; l'individuazione ed applicazione di procedure di controllo e di sorveglianza dei punti critici; il riesame periodico, ed in occasione di variazioni di ogni processo o della tipologia di attività, dell'analisi dei rischi, dei punti critici e delle procedure di controllo e di sorveglianza.

Tutte le informazioni relative alla natura, la frequenza ed i risultati ottenuti in seguito all'applicazione della procedura suddetta, sono tenute a disposizione dell'autorità competente, da parte del responsabile dell'industria alimentare.

Il concetto della rintracciabilità del prodotto viene introdotto al comma 4 dell'art. 3, quando si stabilisce che in caso di constatazione di un rischio immediato per la salute umana in seguito alle procedure di autocontrollo, siano ritirati dal commercio tutti i prodotti ottenuti nelle medesime condizioni e siano informati di ciò le autorità competenti. I prodotti stessi saranno poi stoccati sotto la responsabilità dell'autorità sanitaria locale fino a che non verranno distrutti o destinati a fini diversi dal consumo umano o trattati in modo da

garantirne la sicurezza.

All'art. 4 viene consigliato l'uso dei manuali di corretta prassi igienica e dei principi generali di igiene del Codex Alimentarius al fine della corretta applicazione del sistema HACCP. Tali manuali possono essere elaborati sia dai settori dell'industria alimentare e da rappresentanti di altre parti interessate (autorità competenti e associazioni di consumatori) che dall'Ente Nazionale Italiano di Unificazione (UNI). Il Ministero della Sanità, verificatane la conformità, li trasmette alla Commissione Europea. Per quanto riguarda l'attuazione delle norme generali, le industrie alimentari possono tenere conto delle norme europee della serie EN 29000 o ISO 9000.

I controlli ufficiali (art. 5) andranno effettuati in conformità al D. Lgs. n. 123/93 tenendo conto dei manuali di corretta prassi igienica. Dovrà essere svolta una valutazione generale del rischio in relazione all'attività svolta dall'industria alimentare sottoposta a controllo al fine di stabilire se il responsabile dell'industria stessa abbia effettuato le previste operazioni di sorveglianza e di verifica. La valutazione del rischio collegato al consumo del prodotto in questione deve essere effettuata tenendo conto di tutte le fasi produttive, compresa l'utilizzazione finale da parte del consumatore.

La frequenza dei controlli dei locali è stabilita dal DPR 14 luglio 1995, ma può essere modificata in relazione ai rischi impliciti nella specifica attività.

Per il controllo dei prodotti di importazione si rimanda al succitato D.Lgs. n. 123/93.

All'art. 6 viene formulato l'intento di promuovere l'informazione sanitaria in materia di corretta alimentazione da parte del Ministero della Sanità attraverso campagne informative rivolte ai cittadini e di educazione all'igiene nelle scuole di concerto con il

Ministero della Pubblica Istruzione.

Vengono infine elencati nei capitoli dell'Allegato al presente Decreto i requisiti di idoneità per i locali di lavorazione dei prodotti alimentari, per il loro trasporto, per le apparecchiature e le attrezzature che con tali prodotti vengono a contatto, per la rimozione e/o il deposito dei residui della lavorazione, per i requisiti qualitativi delle acque destinate al consumo umano, per l'igiene del personale preposto alla lavorazione, per i requisiti indispensabili delle materie prime destinate alla produzione di derrate alimentari, ribadendo infine la necessità dell'opera di formazione professionale rivolta al personale di ogni grado dell'industria alimentare.

Decreto Legislativo n. 156/97

Il D. Lgs. n. 156/97 (art. 1) completa le disposizioni già stabilite dal D. Lgs. n. 123/93 relativamente al personale delle strutture cui compete il controllo ufficiale dei prodotti alimentari, i requisiti ed i sistemi di verifica dei laboratori che a tale controllo sono autorizzati, il sistema di mutua assistenza amministrativa e lo scambio di informazioni e le ispezioni congiunte in ambito europeo.

Ribadisce all'art. 2 la necessità da parte delle amministrazioni statali centrali e periferiche di individuare, fra le varie professionalità deputate al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, le tipologie più appropriate a seconda delle specifiche attività ispettive e di controllo analitico, favorendo nel contempo l'aggiornamento professionale e prevedendo un impiego razionale ed adeguato alle esigenze territoriali.

Stabilisce con l'art. 3 la necessità che i laboratori deputati al controllo ufficiale operino in conformità ai criteri della norma europea EN 45001 ed alle procedure standard previste dal D. Lgs. n. 120/92 (Allegato II, punti 3 e 8).

Suggerisce all'art. 4 i criteri da considerare per individuare tra i laboratori che effettuano il controllo ufficiale sugli alimenti quelli specializzati in procedure analitiche di particolare complessità.

La valutazione ed il riconoscimento di tali laboratori sono effettuati, in conformità a quanto disposto dall'art. 5, da organismi designati dalle amministrazioni dello stato a loro volta accreditati secondo la norma EN 45003. è prevista altresì (art. 6) la stretta collaborazione fra gli agenti delle amministrazioni statali con gli agenti specializzati incaricati dalla Commissione Europea nelle operazioni di valutazione dell'efficienza dei sistemi di controllo ufficiali stessi. In quest'ottica sono stabiliti all'art. 7 i principi di mutua assistenza amministrativa fra gli stati membri relativamente al reciproco scambio di informazioni in materia di procedure di controllo degli alimenti, all'applicazione delle norme sulla qualità ed alle sanzioni applicabili in caso di trasgressione delle disposizioni vigenti nel settore alimentare. Tali informazioni saranno trasmesse direttamente dal Ministero della Sanità o direttamente dall'autorità competente che ne dà comunicazione al Ministero stesso.

Con l'art. 8 viene infine ribadita la riservatezza delle informazioni fornite ai sensi dell'articolo precedente che sono coperte dal segreto professionale e commerciale.

Legge n. 526/99

Con l'art. 10 della legge (L.) n. 526/99 "Disposizioni per l'adempimento di obblighi derivanti dall'appartenenza dell'Italia alle Comunità europee - Legge comunitaria 1999" sono state apportate modifiche al D. Lgs. n. 155/97. In particolare si prescrive che il responsabile dell'industria alimentare, anche in assenza dei manuali di corretta prassi igienica, tenga a disposizione dell'autorità competente preposta ai controlli una documentazione dalla quale sia possibile evincere sia che si è proceduto alla individuazione delle fasi critiche

e delle relative procedure di controllo; devono essere disponibili anche le informazioni che riguardano l'applicazione delle procedure di controllo e di sorveglianza dei punti critici accompagnate dai risultati ottenuti.

Al D. Lgs. n. 155/97 viene aggiunto l'art. 3-bis "Procedure per il riconoscimento dei laboratori di analisi non annessi alle industrie alimentari". Vengono dettate le linee guida per ottenere, da parte di laboratori esterni, l'inserimento in elenchi predisposti dalle regioni o dalle provincie autonome e depositati presso il Ministero della sanità. Il responsabile del laboratorio presenta istanza diretta a dimostrare di essere in grado di svolgere controlli analitici idonei a garantire che le attività previste nella legislazione specifica sono effettuate in modo igienico, essendo dotato di strutture, strumentazione e personale conformi ai criteri generali stabiliti dalla norma europea EN 45001 ed alle procedure operative previste nel D. Lgs. n. 120/92. È compito del Ministero della Sanità stabilire i requisiti minimi ed i criteri generali per il riconoscimento dei laboratori esterni e dei laboratori disciplinati da norme specifiche che effettuano analisi ai fini dell'autocontrollo. Ferme restando le competenze delle regioni e delle provincie autonome, il Ministero può effettuare sopralluoghi per verificare la sussistenza dei requisiti nelle diverse strutture.

Il comma 2 dell'art. 8 (Sanzioni) del D. Lgs. n. 155/97 viene completamente sostituito. Si stabilisce che l'autorità incaricata del controllo indichi nel verbale di accertamento le carenze e le prescrizioni di adeguamento necessarie per assicurare il rispetto delle norme e, con provvedimento separato, proceda all'applicazione delle sanzioni previste se il responsabile dell'industria non ha provveduto ad adeguarsi alle prescrizioni impartite a seguito del primo controllo entro il termine di tempo prefissato, che comunque non può essere inferiore ai centoventi giorni.

Le regioni e le provincie autonome hanno il compito di

individuare le industrie alimentari nei confronti delle quali adottare, in base alla tipologia dell'attività, alle dimensioni dell'impresa ed al numero di addetti, misure dirette a semplificare le procedure di HACCP.

Inoltre, non possono essere esportati né commercializzati (anche se non costituisce commercializzazione la vendita diretta dal produttore, o consorzio di produttori o organismi ed associazioni di promozione di alimenti tipici al consumatore finale, nell'ambito della provincia della zona tipica di produzione) prodotti alimentari che richiedono metodi di lavorazione e locali, particolari e tradizionali, nonché recipienti di lavorazione e tecniche di conservazione essenziali per le caratteristiche organolettiche del prodotto, non conformi alle Direttive n. 93/43/CEE del Consiglio (14 giugno 1993) e n. 96/3/CE della Commissione (26 gennaio 1996).

Complementarietà e Interscambio degli Ambiti Cogente e Volontario nell'Ambito delle Attività Afferenti al Settore Alimentare

Un esempio di protocollo comportamentale da seguire da parte del veterinario ufficiale addetto alla verifica della conformità delle procedure di autocontrollo negli impianti di trasformazione dei prodotti alimentari di origine animale potrebbe essere il seguente.

1) Verifica delle condizioni generali degli stabilimenti

Il veterinario ufficiale deve effettuare controlli periodici a cadenza diversa a seconda della capacità produttiva dell'impianto e della sua tipologia per verificare le condizioni generali degli stabilimenti relativamente:

- al mantenimento delle condizioni igieniche dei reparti di lavoro;
- al mantenimento delle condizioni strutturali dei reparti in cui si effettuano le operazioni di manipolazione, preparazione e

- trasformazione delle materie prime;
- al mantenimento delle condizioni igieniche e strutturali dei locali di magazzinaggio delle materie prime e dei prodotti finiti;
- alla gestione dei dispositivi per la manutenzione igienica e la protezione delle materie prime e dei prodotti finiti nelle operazioni di carico e scarico.

2) Analisi dei risultati dell'autocontrollo

In seconda istanza si deve entrare nel vivo dell'opera di verifica attraverso l'analisi dei risultati dell'autocontrollo che dovranno evidenziare la qualificazione dei fornitori in relazione al tipo di produzione; la documentazione sulla rintracciabilità costante delle materie prime impiegate e del prodotto finito; la documentazione sul controllo di funzionalità delle attrezzature; la documentazione sulla gestione dei dispositivi per la protezione contro gli animali indesiderabili; la documentazione relativa alla gestione dei dispositivi e utensili che vengono a contatto con le materie prime o i prodotti finiti; la documentazione relativa alla gestione igienica degli impianti, delle attrezzature, dei servizi e del personale (con particolare riferimento ai problemi di carattere igienico e sanitario).

3) Verifica del processo generale di produzione

La verifica, infine, dovrà riguardare il processo generale di produzione attraverso i seguenti passaggi:

- a. controlli delle materie prime in arrivo;
- b. controlli delle materie prime immagazzinate/stoccate;
- c. controlli in processo;
- d. controlli dei prodotti finiti.

Tali controlli dovranno essere articolati in verifiche di tipo documentale, visivo ed analitico.

4) Gestione delle non conformità

In ultima analisi il veterinario ufficiale dovrà occuparsi del problema della gestione delle non conformità con particolare riferimento alle attrezzature, ai materiali, ed alle materie prime impiegate, alla verifica dei processi produttivi elaborando le eventuali azioni correttive, al controllo dei prodotti finiti procedendo eventualmente al loro sequestro e dunque al ritiro dal commercio di quelli non conformi.

Se in seguito al processo di verifica ufficiale dovessero emergere delle situazioni di mancata conformità alla normativa vigente, il veterinario ufficiale dovrà mettere in atto degli interventi correttivi al fine di eliminare le eventuali incongruenze emerse fra le premesse del manuale di autocontrollo ed i risultati effettivamente conseguiti. Queste possono riguardare i vari aspetti strutturali e produttivi dell'attività in esame; in particolare potranno essere rilevate delle non conformità rispetto alla vigente normativa, che non siano già state risolte favorevolmente su base volontaria dal produttore. Fra queste ricordiamo a titolo esemplificativo:

- *la non conformità delle strutture e del layout rispetto alle planimetrie presentate dalla ditta al momento della domanda di autorizzazione:* in questo caso si dovrà procedere necessariamente al rinnovo del riconoscimento CE se le variazioni riguardano la costruzione di nuove strutture non indicate in precedenza, oppure a modificare la planimetria esistente se le non conformità rilevate sono relative alla disposizione, l'innovazione o l'obsolescenza delle attrezzature presenti.
- La non conformità delle condizioni di manutenzione dei locali e delle attrezzature: i provvedimenti da parte del veterinario sono diversi, a seconda della gravità delle infrazioni rilevate. In particolare, in caso di

locali o attrezzature ritenuti non più idonei al tipo di attività potranno essere messe in atto una sanzione amministrativa o, nei casi più gravi, in cui sia stata compromessa la salubrità degli alimenti, la segnalazione all'Autorità Giudiziaria; allontanamento dai locali o dagli impianti di lavorazione delle sostanze alimentari; sequestro amministrativo o giudiziario degli ambienti e delle attrezzature o di parti di essi; temporanea sospensione dell'uso dei locali e/o dei macchinari e la notifica immediata delle prescrizioni da adottare per rimuovere le cause della non conformità.

- La non conformità delle materie prime utilizzate è una delle eventualità fra le più indesiderate che comporta interventi diversi a seconda della gravità delle discrepanze rilevate e, naturalmente del tipo di attività considerata. Se le materie prime provengono da aziende non registrate si dovrà procedere al loro sequestro, presupponendo che tali aziende non siano sottoposte ai controlli ufficiali, contemporaneamente sarà data immediata notizia dell'infrazione rilevata al servizio veterinario competente per i provvedimenti successivi. Si potranno rilevare, anche attraverso il controllo documentale, eventuali incongruità dei parametri igienici e sanitari rispetto a quelli previsti per legge; in questo caso si dovrà procedere alla segnalazione di tali difformità al servizio veterinario competente (qualora non vi abbia già provveduto il responsabile dello stabilimento in applicazione del piano di autocontrollo) per l'esecuzione delle analisi e dei provvedimenti successivi. In caso di conferma della non conformità occorre sospendere il conferimento della materia prima in oggetto e declassarla se possibile per altri usi consentiti. Nel caso che si rilevino eventuali caratteristiche qualitative inferiori a

quelle previste dagli standard di legge per un determinato prodotto, oppure la presenza di sostanze inibenti o farmacologicamente attive comunque indesiderate, qualora vi sia una conferma ufficiale di tali infrazioni, si potranno adottare le seguenti misure, a seconda della gravità dei casi: sospensione del conferimento delle materie prime in oggetto; loro sequestro e destinazione diversa dall'uso alimentare umano; eventuale distruzione dei prodotti; sequestro giudiziario della merce e segnalamento dell'accaduto all'Autorità Giudiziaria ai sensi della Legge 283/62.

5) Verifica finale

La fase finale delle operazioni di verifica riguarderà il processo produttivo nella sua totalità, attraverso la rilevazione di eventuali non conformità relative al personale, al processo di lavorazione ed al magazzinaggio dei prodotti finiti.

5a) Personale

Dovrà essere verificato il rispetto delle seguenti condizioni: presenza e validità del libretto sanitario; conformità dell'abbigliamento e delle condizioni igieniche; compatibilità delle condizioni di salute; rispetto delle GMP nell'espletamento delle mansioni affidate.

In caso di riscontro di non conformità alle suddette disposizioni, il veterinario ufficiale sarà tenuto, oltre al loro segnalamento al responsabile dello stabilimento, a mettere in atto i seguenti provvedimenti: impedire che la non conformità continui; allontanare il personale interessato dai luoghi di lavoro fino ad avvenuta regolarizzazione in caso di mancanza o non validità del libretto sanitario;

allontanare il personale interessato o farlo adibire a mansioni non a rischio di contaminazione a seconda della gravità dell'inadeguatezza delle condizioni di salute, richiedendo se del caso un controllo medico; disporre per l'adozione, da parte del responsabile dello stabilimento, di interventi idonei a sanare gli effetti negativi della non conformità ed a prevenirli in futuro attraverso la predisposizione di corsi di educazione all'igiene e la riesamina delle procedure adottabili; erogare le eventuali sanzioni previste nei diversi casi.

5b) Processo di lavorazione

Riguardo al processo di lavorazione si potranno rilevare eventuali non conformità relativamente all'impiego di prodotti alimentari nel processo di lavorazione, alle procedure di lavorazione, alla rispondenza dei prodotti finiti. Anche in questo caso il veterinario ufficiale dovrà farsi garante della sicurezza e dell'attendibilità delle procedure aziendali al fine di certificare la salubrità degli alimenti prodotti, predisponendo azioni correttive attraverso il segnalamento delle irregolarità rilevate al responsabile dello stabilimento affinché sia impedito il ripetersi della non conformità, siano rintracciati e sequestrati gli alimenti contaminati o comunque inadatti, sia predisposto un riesame delle procedure, siano effettuati se necessario controlli analitici nell'ambito dell'autocontrollo o in forma ufficiale, eventualmente disporre la distruzione dei prodotti o la destinazione ad usi diversi da quello alimentare umano, infine, nei casi previsti dalla legge, porre la merce sotto sequestro giudiziario e segnalare il fatto all'Autorità Giudiziaria.

Valutazioni conclusive

Dall'esame delle normative in vigore e dalla loro integrazione con i criteri di assicurazione della qualità messi in atto in ambito privato deriva un radicale cambiamento per quel che riguarda il controllo igienico sanitario delle derrate di origine animale. Tale processo conduce ad un'assunzione diretta di responsabilità da parte degli imprenditori circa la garanzia dei criteri di qualificazione dei propri prodotti e rivaluta significativamente la figura del controllore ufficiale che al fine di garantire la salute pubblica da semplice verificatore amplia il suo campo d'azione estendendolo a quello di "consulente" della qualità.

In sintesi possiamo così riassumere le linee d'intervento dei Servizi veterinari delle ASL nel controllo delle industrie alimentari: essi verificano che il titolare abbia definito un manuale di autocontrollo sotto forma di documento scritto; ne accertano l'idoneità a garantire la sicurezza degli alimenti nel rispetto dell'autonomia dell'impresa; prescrivono, se necessario, degli adeguamenti; effettuano controlli periodici per valutarne il rispetto. Accertano inoltre che le operazioni di sorveglianza e di verifica previste dal manuale siano effettuate correttamente dal responsabile dell'autocontrollo, prestando particolare attenzione ai punti critici di controllo evidenziati nel piano.

Infine vengono informati e controllano le azioni correttive poste in essere in caso si verifichi un inconveniente non previsto ed il prodotto non sia stato ancora distribuito, oppure che sia stato commercializzato un prodotto potenzialmente pericoloso. In questi casi i Servizi si accertano che l'industria alimentare faccia quanto previsto in termini di definizione di nuove azioni correttive e di ritiro del prodotto già distribuito, segnalando comunque l'accaduto all'Autorità Giudiziaria in maniera circostanziata, precisando che non si tratta di notizia di reato.

I controlli ufficiali necessari a verificare la rispondenza dei prodotti vengono effettuati ai sensi della normativa vigente precedentemente all'emanazione del D. Lgs. n. 155/97.

RIASSUNTO - Le problematiche relative alla produzione e certificazione delle derrate alimentari coinvolgono i veterinari e gli imprenditori, che hanno dovuto adeguarsi, per le specifiche competenze, sia alle rinnovate richieste del mercato che al dettato normativo comunitario.
Gli autori prendono in esame i disposti dei Decreti Legislativi n. 155/97 e 156/97 e propongono un comportamento da seguire da parte del veterinario ufficiale addetto alla verifica della conformità delle procedure di autocontrollo negli impianti di trasformazione dei prodotti alimentari di origine animale.

SUMMARY - The problems concerning food-stuffs production and certificate involve the veterinaries and the entrepreneurs. They conformed their specific competences either to renew requests of the market or to European rules.
The Authors examine the rule of the Laws n. 155/97 and 156/97. They suggest a behaviour to the official veterinary employed in control of the compliance of self-control procedures in the systems of animal origin foodstuffs transformation.

Legislazione citata

- Decreto legislativo n. 120, 27/01/92 - GURI n. 40, 18/02/92
- Decreto legislativo n. 530, 30/12/92- GURI n. 7, 11/01/93
- Decreto legislativo n. 531, 30/12/92- GURI n. 7, 11/01/93 s.o.
- Decreto legislativo n. 65, 04/02/93 - GURI n. 64, 18/03/93 s.o.
- Decreto legislativo n. 123, 03/03/93- GURI n. 97, 27/04/93
- Decreto legislativo n. 286, 18/04/94- GURI n. 111, 14/05/94
- Decreto legislativo n. 155, 26/05/97 - GURI n. 136, 13/06/97
- Decreto Legislativo n. 156, 26/05/97 - GURI n. 136, 13/06/97
- Decreto Presidente Repubblica n. 227, 01/03/92,- GURI n. 66, 19/03/92 (^o1)
- Decreto Presidente Repubblica n.132, 14/07/95 - GURI n. 260, 07/11/95 s.o.
- Decreto Presidente Repubblica n. 54, 14/01/97 - GURI n. 59, 12/03/97 s.o

- Direttiva 88/657/CEE, 31/12/88 - GUCE L 382, 31/12/88 (°
2)
- Direttiva 89/437/CEE, 20/06/89 - GUCE L 212, 22/07/89
- Direttiva 91/492/CEE, 15/07/91 - GUCE L 268, 24/09/91
- Direttiva 91/493/CEE, 22/07/91 - GUCE L 268, 24/09/91
- Direttiva 91/497/CEE, 29/07/91 - GUCE L 268, 24/09/91
- Direttiva 92/46/CEE, 16/06/92 - GUCE L 268, 14/09/92
- Direttiva 92/47/CEE, 16/06/92 - GUCE L 268, 14/09/92
- Direttiva 93/43/CEE, 14/06/93 - GUCE L175, 19/07/93
- Direttiva 96/3/CE, 26/01/96 - GUCE L 21, 27/01/96
- Legge n. 526, 21/12/99,- GURI n. 13, 18/01/2000

(°1) abrogato dall'art.14 del DPR n. 309, 03/08/98, GURI n.199, 27/08/98

(°2) abrogata dall'art.23 della Direttiva 94/65/CE, GUCE L 368, 31/12/94

ALCUNI ASPETTI SUL CONTROLLO SANITARIO DEI FUNGHI COMMESTIBILI

Pier Giovanni Bracchi,[°] Emidio Borghi ^{°°}

[°] *Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti -
Università degli Studi di Parma*

^{°°} *Direttore Laboratorio Analytical di Borgo Val di Taro (PR)*

Introduzione

L'uomo ha sempre manifestato un grande interesse per i funghi sia per il ben noto pregio gastronomico di alcuni di essi, sia per la supposta o reale, ma sempre temuta, tossicità di altri. Le popolazioni americane precolombiane utilizzavano i funghi allucinogeni per le loro pratiche magiche, mentre già prima di Cristo i cinesi avevano inserito i funghi nella loro farmacopea. Sappiamo inoltre che i primi archibugi usavano come miccia la polvere essiccata del *Fomes fomentarius* (" fomes " significa appunto esca).

I funghi commestibili, di cui principalmente ci occuperemo in questa sede, sono componenti essenziali di una cucina di qualità, specialmente quelli spontanei, ma certo hanno scarso valore in termini di proteine, carboidrati, grassi e calorie ; tuttavia le loro proprietà organolettiche e chimico-bromatologiche sono di notevole importanza nel definirne la qualità ed i pregi (1).

Per la versatilità di utilizzazione nelle preparazioni gastronomiche più diverse , sono stati spesso chiamati " *carne vegetale* " , perchè i funghi, anche se costituiti di acqua per circa il 90% del peso fresco, presentano un contenuto di sostanze azotate pari al 2-4%; ma ciò non significa che si tratta di proteine in quanto il 40% di questa frazione è costituito da *micosina* - sostanza organica simile alla chitina - che non viene assorbita dal nostro organismo. Per questo motivo il valore nutritivo dei funghi è, tutto sommato, limitato ed è impensabile utilizzarli in sostituzione della carne (8,10).

Commercializzazione e controllo dei funghi epigei freschi e conservati

Alcune specie fungine pregiate costituiscono un prodotto commerciale di notevole importanza. In Italia, nel 1999, ne sono stati raccolti 19.000 ql. per un valore di circa 37 miliardi di lire (ISTAT, 2000).

La produzione nazionale è però insufficiente per vari motivi :

a) *scarsa conoscenza dei funghi da parte dei raccoglitori e consumatori che mirano,*

quasi esclusivamente, al consumo del solo porcino fresco;

b) scarsa incentivazione all'insegnamento della micologia nella scuola da parte degli

Enti delegati;

c) basso costo dei prodotti provenienti da Paesi Terzi e quindi graduale abbandono del

mercato locale

d) scarsa tutela dei boschi ed errate pratiche forestali: l'invasione del " Pinus nigra "

- pino nero - sui crinali appenninici ne è una prova.

Esaminiamo per primo il caso dei funghi secchi che costituiscono il prodotto più commercializzato. Solo per i funghi secchi occorre importare circa il 98 % di quanto richiesto dal mercato interno per una spesa complessiva di oltre 3000 miliardi all'anno (sono circa 500 le aziende confezionatrici che si rivolgono all'estero).

In commercio sono ora ammessi e reperibili funghi secchi " spontanei" e di " coltivazione" ed è bene chiarire questi termini. Il fungo spontaneo di bosco o di prato è un prodotto legato (simbionte, parassita, saprofita) all'ambiente naturale da cui trae nutrimento e, conseguentemente, la contaminazione.

Il fungo coltivato (saprofita) cresce su substrati preparati dall'uomo e quindi è più controllato della miriade di funghi spontanei che crescono in aree non idonee (la montagna e la collina restano comunque ancora i luoghi ideali di crescita ed offrono i veri prodotti genuini " *di bosco* ").

Gustare questo alimento senza correre rischi di intossicazioni è un piacere alla portata di tutti purché si segua un comportamento prudente.

Non si devono raccogliere i funghi lungo le strade molto trafficate, nelle aree industriali, presso impianti inceneritori, depuratori, centrali termiche : questi funghi sono contaminati da metalli pesanti ed altri tossici ambientali pericolosi per la salute umana. Il problema già oggetto in passato ed anche recentemente di nostre ricerche (3,9) è ormai divenuto materia di usuale indagine presso tutte le ARPA nazionali.

Il controllo dei vari inquinamenti (chimico, fisico, microbiologico, particellare) resta però ancora un fatto episodico ed occasionale sia per le Aziende che per le AUSL. In qualche relazione tecnica, a livello nazionale, si tende ad escludere il rischio microbiologico (" tanto cuociono ") e definiscono " chimico" il rischio fisico della radioattività.

Ricordiamo brevemente che il prodotto proveniente da Stati Esteri è provvisto di certificato fito-patologico che attesta l'assenza di infestanti (animali e/o vegetali e/o batteri nocivi per l'agricoltura, per il patrimonio forestale nazionale, per l'uomo e per gli animali) e dovrebbe subire alla frontiera o ai vari uffici doganali distaccati un primo controllo che attesti l'idoneità al commercio in Italia. Le certificazioni rilasciate dai Paesi Terzi, sono in genere valide ai fini di legge e quindi " sempre" utilizzate ai fini commerciali (esistono sempre specifici protocolli bilaterali). La visita di frontiera e doganale è in pratica un " visto d'ingresso" e del resto è impossibile che i sempre più rari funzionari delle dogane possano avere il tempo necessario per eseguire simili controlli difficili anche per esperti in patologia vegetale. Il "visto" rende comunque la merce idonea all'ingresso ed il commercio nello Stato italiano ; tra poco potremo avere la novità del " visto micologico" da parte dei Paesi Terzi che azzererebbe il punto 2 dell'Art. 6 del DPR 376/95.

Per quanto concerne le partite provenienti dai Paesi Terzi si possono individuare quattro problemi (D. Lgs. N° 155/97 : " rischi ") :

1) *le norme igieniche di raccolta e di confezionamento;*

2) *il rischio di importazione di infestanti nel territorio italiano;*

3) *la presenza di specie tossiche e velenose nelle partite destinate al commercio*

all'ingrosso che hanno solo certificazioni all'origine e che in Italia non vengono

normate dal DPR n° 376/95.

Del resto anche in Italia, prima della legge n° 352/93 il Ministero della Sanità aveva dedicato al problema solo una circolare (31.1.95), priva di un sostegno giuridico idoneo: D.Lgs., DM, DPR.

4) *le disinfestazioni : in quei Paesi infatti sono spesso ammessi prodotti che in Italia*

sono vietati (si usa quel che si trova sul mercato al momento ed in particolare il

solfo di carbonio).

La nuova normativa (DPR 376/95) prevede che il fungo conservato, importato e

non, subisca prima dell'immissione sul mercato due distinti controlli: il primo a cura del micologo dell'azienda confezionatrice ed il secondo a cura degli Ispettorati Micologici dei Servizi di Igiene Pubblica delle AUSL durante la normale vigilanza igienica sugli alimenti.

Evoluzione della normativa

Il controllo micologico oltre che dalle leggi nazionali è sancito dalle direttive CE che regolano l'igiene degli alimenti: il fungo è ovviamente una materia prima a rischio che deve essere controllata e monitorata. E' noto che le sostanze alimentari sono soggette al controllo da parte dello Stato a difesa della salute dei cittadini. La prima legge sulla tutela dell'igiene e della sanità pubblica risale al 1888 (Legge n° 5849). Altre norme furono emanate con R.D. 3 agosto 1890, n° 7045 - "*Regolamento speciale per la vigilanza igienica sugli alimenti, sulle bevande e sugli oggetti di uso domestico.*"

....omissis....XI Funghi.

A partire dagli anni ' 50 la legislazione alimentare ha subito un notevole incremento per lo sviluppo di tipo industriale che ha interessato il comparto agroalimentare.

Tipica di questo periodo è la ben nota Legge 283/62 con il relativo Decreto applicativo

(DPR n° 327/80), in particolare per l'alimento-fungo la Legge 23 agosto 1993, n° 352 : "*Norme quadro in materia di raccolta e commercializzazione dei funghi epigei freschi e conservati.*" ...omissis....

Il quadro definitivo lo offre ora il DPR n° 376/95 "*Regolamento concernente la disciplina della raccolta e della commercializzazione dei funghi epigei freschi e conservati.*"omissis....

In anni più recenti sono state promulgate altre leggi e regolamenti in materia di funghi ; ricordiamo per esempio il DM.n° 696/96 "*Regolamento concernente criteri e modalità per il rilascio dell'attestato di micologo.*" ,omissis.....ed il DM. 9 ottobre 1998 "*Menzioni qualificative che accompagnano la denominazione di vendita dei funghi secchi.*"omissis.....

Sia il DPR 376/95 che il successivo Decreto del 1998 entrano nelle specifiche tecniche in merito alle specie fungine da porre in vendita, fresche, essiccate o comunque trattate. Individuano le metodiche analitiche e i relativi limiti di tolleranza in riferimento sia ai funghi secchi sia a quelli in altro modo conservati.

Aspetti microbiologici: infezioni e tossinfezioni alimentari.

Volendo considerare il fungo, inteso come alimento, un possibile veicolo di agenti patogeni dobbiamo dapprima fare riferimento ad alcuni concetti fondamentali e distinguere le infezioni alimentari dalle tossinfezioni alimentari.

Nel caso delle infezioni l'alimento è veicolo di microrganismi patogeni che ad esso giungono per vie diverse tra le quali gioca un ruolo importante il ciclo fecale-orale oltre ad una più ampia possibilità di contaminazione dovuta all'habitat, all'origine e alla natura stessa dell'alimento. In questo caso però gli stessi microrganismi possono essere veicolati anche per altre vie (es. acqua). Sotto questo aspetto quindi anche il fungo non sfugge alla condizione di possibile veicolo di microrganismi patogeni, in particolare quelli ad eliminazione fecale, provenienti o dall'ambiente in cui il fungo cresce o da manipolazioni successive.

Dal punto di vista della sicurezza microbiologica si dovrebbe pertanto ipotizzare e verificare la presenza di patogeni nell'alimento-fungo : ma fino a che punto ciò è realizzabile considerando l'ampio numero di possibili contaminanti ? Non potendo adottare la ricerca di un unico microrganismo che funga da parametro-indice per tutti , una esauriente ricerca dei singoli patogeni è difficilmente praticabile.

Ci soccorre come sempre la pratica della bonifica termica (cottura) in quanto nella quasi totalità dei casi i funghi, freschi o essiccati, vengono consumati cotti.

Lasciamo il dubbio del rischio a coloro che, raramente, consumano funghi freschi crudi ma in questo caso essi vanno considerati alla stessa stregua e con lo stesso rischio di un qualsiasi alimento di origine vegetale consumato crudo per cui si dovranno utilizzare le comuni norme igieniche (pulitura, lavaggio, ecc.)

Le tossinfezioni alimentari, invece sono delle affezioni generalmente di tipo gastroenterico, dovute al consumo di alimenti contaminati da batteri: l'alimento stesso costituisce il substrato adatto per la crescita della popolazione microbica quando questa sia favorita da condizioni ambientali, e si possono raggiungere elevate cariche batteriche per unità di peso (10^8 - 10^9 /gr.).

In queste condizioni alcuni microrganismi sono in grado di elaborare anche prodotti del loro metabolismo che costituiscono i mediatori patogeni della tossinfezione (esotossine) il cui manifestarsi è possibile anche dopo alcune ore dall'ingestione dell'alimento contaminato (7).

Nel caso delle tossinfezioni alimentari, quindi, si possono configurare tre condizioni indispensabili che le caratterizzano:

1- *alimento come unico veicolo di trasmissione;*

2- *elevata carica batterica;*

3- *breve periodo di incubazione.*

Nel caso dell'alimento-fungo, è poco probabile che si verifichino le condizioni perché si possa parlare di tossinfezione alimentare quando si tratti di consumare funghi, freschi o essiccati, e peraltro cotti. Il fungo stesso per sua natura e per il suo stesso habitat, non sembra comportare in origine contaminazioni da parte di quei microrganismi che sono gli agenti delle classiche tossinfezioni alimentari. Una possibile obiezione potrebbe essere fatta a proposito del *Bacillus cereus* (e di qualche *Clostridium sp.*) qualora il fungo fosse componente di un alimento (sugo, brodo) non consumato subito, ma tenuto in condizioni tali da consentire la germinazione delle spore sopravvissute alla cottura a cui fa seguito uno sviluppo microbico rigoglioso.

Ciò potrebbe trovare una spiegazione nel fatto che il *Bacillus cereus* può trovarsi facilmente nell'ambiente come contaminante. Non si può certo parlare in questi termini quando si tratta di salmonella, stafilococco enterotossico, *Vibrio paraemoliticus*, ecc., essendo di altra natura gli alimenti in cui questi patogeni si insediano.

Se ciò avvenisse non si tratterebbe più soltanto di una contaminazione all'origine dell'alimento, ma più probabilmente di una contaminazione secondaria in seguito a trattamenti o manipolazioni errate: ciò riguarda le normali pratiche igieniche che non investono il problema fungo in sé.

Una considerazione particolare va fatta quando si tratta di consumare i funghi comunque conservati. In questo caso gioca un ruolo importante la intossicazione da *Clostridium botulinum*, tipica degli alimenti conservati. L'habitat del clostridio è terrigeno e quindi la possibilità di contaminazione del fungo è quanto mai probabile. Ciò pone una problematica del tutto particolare in sede di modalità di preparazione dell'alimento da conservare che, considerate le abituali pratiche domestiche di preparazione, a volte prescindono dal lavaggio dell'alimento ma prevedono solamente una accurata pulizia.

Da qui assume una importanza fondamentale il processo di bonifica che si ottiene mediante cottura con aggiunta di aceto: le spore e le forme vegetative del batterio risultano sensibili alla normale temperatura di cottura purché ciò avvenga a pH decisamente acido. A ciò si aggiunga che a pH acido viene inibita la produzione di tossina nell'alimento conservato da parte dei clostridi in forma vegetativa, provenienti da spore sopravvissute alla cottura. Ecco la ragione per cui si impone per legge (DPR n° .376 /95) un pH < 4.6.

Non deve essere inoltre trascurato il fatto che per la sicurezza della garanzia igienica del prodotto non è sufficiente il trattamento di bonifica, ma questo deve essere accompagnato da rigorose norme igieniche relative al confezionamento

(contenitori, coperchi, manualità) al fine di evitare ricontaminazioni secondarie.

Questi risultati scientifici sono stati coniugati con la pratica popolare di conservazione che nelle nostre montagne vanta una esperienza lontana nel tempo; casi di intossicazione botulinica dovuta al consumo di funghi preparati secondo tradizione e conservati sott'olio, pur se in teoria possibili, o non sono noti o sono estremamente rari.

Ci sembra il caso di fare un'ultima considerazione. Nella tossinfezione botulinica il quadro clinico è di tipo prevalentemente nervoso e perciò essa si differenzia dalle altre tossinfezioni alimentari; sindromi gastroenteriche, che talvolta insorgono a seguito del consumo di funghi e che possono essere scambiate per tossinfezioni alimentari, nella realtà più spesso sono dovute a ingestione di funghi di dubbia commestibilità. In questi casi però l'eziologia è diversa e assolutamente non microbica per cui ci sentiamo di assolvere l'alimento-fungo, fresco o essiccato, dall'essere origine di tossinfezioni alimentari, mentre manteniamo una doverosa riserva per i funghi comunque conservati, come peraltro per tutti gli alimenti conservati secondo manualità di tipo domestico.

L'ispezione dei funghi secchi

Agli inizi del secolo scorso nel Comune di Milano rari erano gli avvelenamenti dovuti funghi freschi, al contrario frequenti gli avvelenamenti per funghi secchi. Uno dei motivi era da imputare alla difficoltà di individuare le specie buone e permesse dopo che i funghi erano stati essiccati. La frequente presenza di funghi velenosi, misti a quelli commestibili poteva essere spiegata dalla popolare falsa credenza che i funghi velenosi, essiccandosi, perdessero la loro tossicità (6).

Oggi chi si accinge a controllare i funghi secchi, sia questi un professionista privato o un ispettore delle AUSL, deve innanzi tutto verificare se il prodotto è ben confezionato, sigillato ed etichettato secondo le norme: nel caso contrario si dovrà prenderne nota e provvedere secondo le competenze specifiche.

Le operazioni consigliate da eseguire possono così essere riassunte:

1) *controllo delle polveri sporali;*

2) *controllo delle foglie o fette;*

3) *controllo dello scarto nero;*

4) *riconoscimento delle sofisticazioni.*

Dobbiamo ricordare che la micologia moderna ha notevolmente diminuito l'importanza sistematica del colore della polvere

sporale, che era invece prioritario nel vecchio *Systema* di Fries ; oggi la tecnica ideale è l'osservazione microscopica delle spore con l'impiego dei coloranti consigliati dai testi classici ed in particolare col reattivo di Melzer per individuare la presenza di eventuali *spore amiloidi*. Va qui ricordato che le *spore amiloidi* si differenziano nettamente da quelle dei porcini, perchè assumono una colorazione bleu-nerastra ; le spore dei porcini assumono invece il colore di fondo del colorante, ma più chiaro. Le *spore amiloidi* poi, a seconda del genere di appartenenza, hanno forma, dimensione e caratteristiche diverse cosicchè un occhio ben allenato riesce ad individuare spesso il genere (4).

In Italia, si commercializzano prevalentemente funghi secchi porcini appartenenti al gruppo *Edulis* (*Boletus edulis*, *B. pinophilus*, *B. aestivalis* o *reticulatus*, *B. Aereus*) anche se la nuova normativa ammette altri funghi (la legge quadro n°. 352/93 all'art.18, c.2, ne vietava però la miscela tra di loro). ma mai in miscela tra di loro. Le spore di Boletaceae s.l. sono simili e ben difficilmente si potrà distinguere tra boleto e boleto, ma eventuali spore estranee conferiranno utili indicazioni.

E'utile soffermarci sul riconoscimento delle sofisticazioni. Questa operazione serve al controllo interno sul prodotto " all'origine " ed al controllo fiscale su buste o pacchetti o sul fungo sfuso esposto nei negozi. Il reato che si può configurare per chi vende come porcini funghi appartenenti ad altre specie di minor pregio è " la frode in commercio " ; reato molto grave per il buon nome di chi lavora nel campo alimentare. Se l'inquinante poi non è commestibile si potrebbero applicare, in caso di dolo palese, gli articoli 440-442-452 del C.P.P. Qualora l'inquinante (non tossico) sia limitato ad una sola fetta o a pochi grammi allora si può applicare quanto è previsto dalle sanzioni della legge 352/93 per la violazione dell'art. 5 del DPR 376/95. Una fetta può sfuggire involontariamente al controllo delle selezionatrici e quasi sempre il titolare o l'esperto micologo (che " visita " la materia prima in cartoni campionati) sono esenti dall'accusa di negligenza o, peggio di colpa o dolo.

Occorre anche un poco di " buon senso " nel controllo fiscale.

Tra le sofisticazioni più comuni dovute a negligenza segnaliamo, a titolo di esempio, quella provocata da una *boletacea*, non ascrivibile al gruppo *Edulis*: *Boletus calopus*. Se la si osserva superficialmente, la fetta di cappello essiccata è la più simile, a quella dei boleti del gruppo *Edulis* ed in particolare al prodotto " slavo " (Fig. 1). Si presenta come un *B.edulis* un po' vecchio; si può confondere con i porcini del " caldo " , ossia nati nella prima estate. L'elemento più distintivo è il gusto decisamente amaro, mentre anche l'analisi microscopica delle spore evidenzia la forma tipicamente " *guttulata* ". La presenza nella partita di *B.calopus* evidenzia poco rigore nella raccolta, dal momento che l'esemplare fresco non è confondibile con il *B.edulis*. Si rende quindi necessario il sequestro cautelativo e provvisorio di tutta la partita ogni volta che si riscontrano più fette di *B.calopus*. Per quanto riguarda le sofisticazioni più frequenti che si possono verificare per altre specie fungine (Fig.2) e per il tipo di analisi richieste (indagine microscopica delle spore, reazioni macrochimiche, ecc) rimandiamo all'opera di Borghi (5).



Figura 1 Funghi secchi originali "slavi" (*B. edulis*). Per il D.M. 9/10/98 sono considerati "speciali" (questa categoria merceologica).



Figura 2 Boletacea non ascrivibile al Gruppo Edulis: *Leccinum scabrum*.

Il *controllo sanitario* del fungo secco contribuisce ad integrare quello micologico, già esposto e si attua eseguendo le seguenti indagini:

- 1) *esame organolettico e merceologico*;
- 2) *esame fito-patologico*;
- 3) *esame chimico*;
- 4) *esame microbiologico*;
- 5) *esame radiometrico*.

La trattazione dei punti 1,2,3 e 4 è esaustiva nel lavoro di Borghi (5), perciò prendiamo qui in considerazione il punto 5. Queste indagini devono garantire il rispetto dei limiti fissati dalla CEE (Regolamento n° 737/90) in 600 Bq/Kg. Tale controllo viene eseguito solo presso laboratori pubblici autorizzati o presso alcuni centri universitari di ricerca. Gli altri

controlli dovrebbero, in attesa che venga applicata - finalmente ed integralmente - la Direttiva CEE n° 43/93, essere eseguiti da laboratori pubblici o privati autorizzati dalla regione.

Dopo l'incidente di Chernobyl, nei laboratori del nostro Istituto sono state effettuate dal 1986 sino ad oggi, ripetute indagini su campioni di funghi eduli raccolti sul nostro Appennino allo scopo di monitorare l'evoluzione della contaminazione da radionuclidi che ha interessato questo territorio (3, 9). Tra l'altro, una di queste indagini fornisce dati utili allo scopo di individuare l'origine geografica di alcune specie fungine pregiate.

I funghi comunque devono corrispondere alla qualità dichiarata in etichetta e nel caso questa non venisse confermata dall'addetto al controllo merceologico si parla di frode in commercio (D.lvo 25/01/92 n°74 ,pubblicità ingannevole).

L'ispezione ed il controllo sanitario dei funghi congelati e/o surgelati

Gli ispettori micologi dell'AUSL devono avere ben presente il D.lvo 155/97 sulla gestione delle temperature, le date di scadenza, le schede delle materie prime, ecc. L'esame della etichettatura è un fatto richiamato da varie norme e quando siano specificate alcune percentuali di prodotto più pregiato, occorre procedere al controllo di qualità. Il mercato nazionale del fungo congelato e/o surgelato è costituito in maniera preponderante da pochi funghi (alcuni di bosco, altri di coltivazione). I porcini dominano il mercato con la pezzatura intera, le fette, i cubetti.

In genere si tratta di prodotto d'importazione da Paesi Terzi (Bulgaria, Romania, Polonia, ex-Jugoslavia) che arriva in Italia già pronto per il confezionamento, trasportato da camion freezer appositamente attrezzati ed idonei.

Tra i porcini domina il *B.edulis* nei funghi dell'Europa del Nord/Est, mentre il *B.aestivalis* prevale in quelli dell'area balcanica, (pur una buona percentuale di *B.edulis* e, minore, di *B.pinophilus*).

Altri funghi di bosco ben commercializzati sono *Xerocomus badius* e *Suillus luteus* (Fig. 3 e Fig.5). La provenienza di questi è la più svariata (sempre area balcanica dell'Europa dell'Est e novità, Sud America, Cile in particolare). Tra i funghi di coltivazione prevale *Agaricus bisporus* insieme a *Pleurotus ostreatus*; sono poi presenti in percentuale minore *Pholiota nameko*, *Lentinus edodes*. Questi funghi coltivati servono per preparare miscele, con una dose di porcini che varia dal 4 all'8%, dosi che sono state calcolate e valutate da cuochi esperti ed in effetti servono per dare buoni piatti a prezzi accessibili.



Figura 3 Dx: *Xerocomus badius*. Centro: *Boletus edulis*. Sx: *Suillus luteus*.



Figura 4 Boletacea non ascrivibile al Gruppo Edulis: *Leccinum griseum*.



Figura 5 *Xerocomus badius*.

Il *controllo sanitario* deve integrare quello micologico e comprende , come per il fungo secco, i seguenti esami che l'ispettore dell'AUSL può richiedere in quanto sono parte integrante della scheda delle materie prime; gli esiti delle verifiche analitiche possono essere sostituiti dalle dichiarazioni di conformità che i fornitori dovranno esibire :

a) *rilievo della T° di conservazione;*

b) *esame organolettico e merceologico;*

c) *esame fito-patologico;*

d) *esame chimico;*

e) *esame microbiologico;*

f) *esame radiometrico.*

Per quanto riguarda il *controllo di qualità* bisogna ricordare che i funghi devono corrispondere alla qualità ed alla quantità dichiarata in etichetta (in particolare la percentuale di porcini che è quella che nobilita le varie miscele). Lo stato dei carpofori, la pezzatura, la percentuale tra teste e gambi, l'assenza di muffe e colorazioni anomale forniranno un altro contributo per la valutazione.

L'ispezione ed il controllo sanitario dei funghi sott'olio.

I prodotti più frequenti sul mercato nazionale sono i funghi all'olio di oliva, gli antipasti a base di funghi e gli antipasti con verdure e funghi. I porcini dominano il mercato con la pezzatura intera, il tagliato (in genere a metà), i cubetti o ritagli (per le ristorazioni e le pizzerie). In genere si tratta di prodotto d'importazione da Paesi Terzi (Serbia, Macedonia, Montenegro, Cina) che arriva in Italia già pre-selezionato, in salamoia.

Tra i funghi di bosco prevale il *B.edulis* e relativo Gruppo (*B.pinophilus* è il più ricercato perchè la famosa *testa nera* " fa più figura " nei vasi di vetro in cui viene confezionato il prodotto sott'olio; inoltre è mediamente più sano perchè è un fungo autunnale. *B.aereus* è troppo raro e non coprirebbe il mercato della " *testa nera* "). E' fiorente il commercio di altri funghi di bosco come *T.portentosum*, *C.cibarius*, *L.deliciosus*, *L.sanguifluus* (i famosi " *rositi* " del nostro meridione, dove è presente pure *T.orirubens*, la " *monachella silana* ") . La loro provenienza è la più svariata (Italia, Europa dell'Est, area balcanica e penisola iberica).

Tra i funghi di coltivazione prevale *Agaricus bisporus*, quindi *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota nameko*, *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea* (Fig. 6 e Fig.7). La provenienza di questi funghi può essere nazionale o UE (Spagna e Portogallo) per il prataiolo e l'orecchione mentre è del Sud-Est asiatico per gli altri funghi.

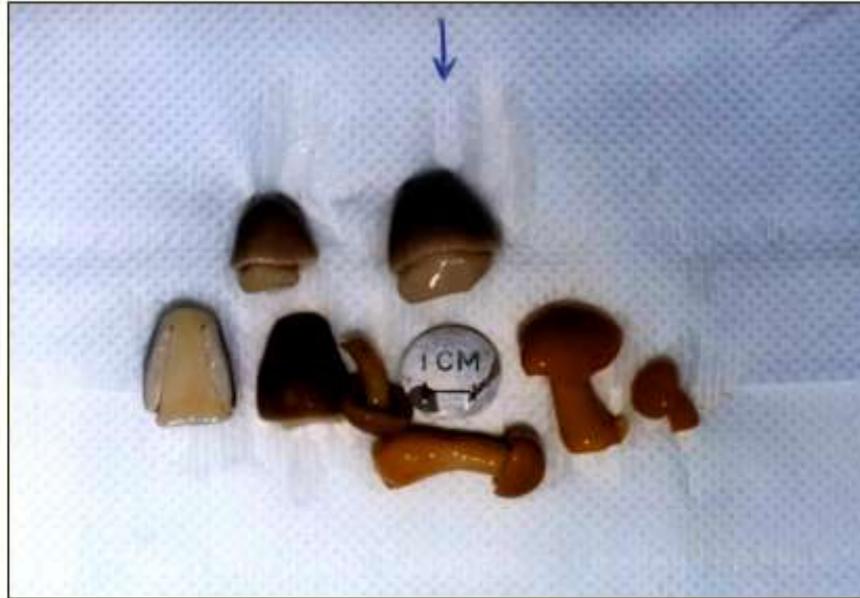


Figura 6 Sx: *Volvariella volvacea*. Dx: *Pholiota nameko* (salamoia).

Le miscele in commercio nel misto-funghi o "misto di bosco" prevedono dosi praticamente uguali per i funghi utilizzati siano essi coltivati o di bosco; negli antipasti misti il fungo è in genere presente in percentuale oscillante tra il 15 ed il 25 %.



Figura 7 *Lentinus edodes* (congelato)



Figura 8 Laboratorio confezionamento funghi della Ditta Calzolari di Borgotaro, prima in Italia a garantire, mediante imballaggi sigillati, la commestibilità e la specie botanica del prodotto (metà 800) (per gentile concessione della Ass. Emmanuelli, Borgo Val di Taro PR).

Per quanto riguarda il *controllo sanitario* del fungo sott'olio, si devono rilevare le modalità di conservazione ed effettuare le stesse indagini già riportate per i funghi congelati e/o surgelati (Direttive CE del 14/6/93). In modo particolare l'esame chimico deve garantire tra l'altro che il pH sia inferiore a 4.6 , inoltre sarà importante verificare se è avvenuto il trattamento termico idoneo a rendere inattive le eventuali spore del *C.botulinum*, come è imposto dal DPR del 14 luglio 1995 n° 376-art. 9.

E' molto importante in questo caso specifico la ricerca e la classificazione di eventuali ifomiceti (muffe) dal momento che questi tendono a svilupparsi spesso in prossimità di bolle d'aria che si possono formare durante il confezionamento e l'invasatura dell'olio.

Intossicazioni "non vere".

In questa breve rassegna abbiamo tralasciato le intossicazioni fungine dovute all'ingestione di specie velenose per le quali si rimanda ad un trattato di Bellù, medico ed esperto micologo (2). Ma può essere utile accennare alle cosiddette

intossicazioni "non vere", molto frequenti con manifestazioni anche drammatiche. Sono dovute al consumo di funghi commestibili allo stato fresco (compresi quelli più noti), ingeriti in determinate circostanze; è opportuno che il consumatore le conosca per prevenire episodi indesiderati.

Le circostanze più frequenti che si suppone, favoriscano l'insorgenza di una intossicazione "non vera" da funghi sono:

- a) *ingestione di una quantità eccessiva di funghi;*
- b) *masticazione insufficiente;*
- c) *abuso di grassi durante la cottura;*
- d) *cattivo stato di conservazione;*
- e) *funghi imbevuti di acqua;*
- f) *funghi più volte congelati e scongelati o conservazione inadeguata;*
- g) *motivi psicologici: ansia di avere ingerito funghi velenosi;*
- h) *altre cause.*

Si può quindi affermare che questo tipo di intossicazioni presentano in genere i soliti sintomi gastroenterici, ma spesso anche febbre o febbricola, evento quasi sempre del tutto assente nelle "vere" intossicazioni da funghi velenosi (2).

Concludendo: il controllo micologico oltre che dalle leggi nazionali è sancito dalle direttive CE che regolano l'igiene degli alimenti; il fungo è ovviamente una materia prima a rischio che deve essere costantemente controllata e monitorata. È evidente la lungimiranza di tutti coloro che hanno collaborato alla stesura ed all'approvazione della Legge 352/93 e del DPR 375/95 e delle direttive comunitarie: 89/397/CEE, 93/43/CEE e 96/3 CE. Infine, l'istituzione degli Ispettorati con scopi di informazione nei confronti della popolazione e di identificazione e controllo dei funghi, contribuisce alla prevenzione di fenomeni abbastanza comuni di intossicazioni con esiti a volte anche letali.

Parole chiave: funghi conservati, controllo sanitario.

Key words: conserved mushrooms, sanitary control.

RIASSUNTO : Il controllo sanitario dei funghi freschi e comunque conservati riveste un ruolo importante in seguito al notevole incremento del consumo di questo prodotto. Vengono riportate dettagliate istruzioni insieme agli aspetti tecnici per tutto ciò che riguarda le procedure da seguire per l'ispezione ed il controllo sanitario dei funghi secchi, congelati e/o surgelati e sott'olio. Viene pure descritta una sintesi del quadro normativo che si è evoluto in questi ultimi anni.

SUMMARY : *Some aspects on sanitary control of edible mushrooms.*

This paper is directed at providing essential information for industrial technologist involved in the production and processing of mushrooms as well as quality control in the mushroom industry and government agencies. The food analyst is confronted with providing proof of fraudulent substitution of more expensive mushrooms with cheaper ones. The Authors give detailed instructions for technical aspects of inspection and microscopic and chemical examination of significant characters. Special advice are reported for all important fungi used for conservation and for species easily mixed up with edible ones. The paper deals with both collected wild fungi as well with cultivated mushrooms. A brief overview on the legislative basis for all problems involved is also presented.

Bibliografia

1. AA.VV.(1999).L'Eurofungo di Borgotaro alle soglie del 2000. *Atti Convegno Nazionale*,Borgo Val di Taro,3 ottobre, pp.1-71. Accademia Italiana della Cucina Ed.,Milano
2. Bellù F.(2000). I principali funghi velenosi e le loro intossicazioni. *Atti Corsi di Aggiornamento di Micotossicologia*, Bedonia (PR),18-20 ottobre,p.80. AUSL di Parma.Dipartimento di Prevenzione. Distretto Valli Taro e Ceno.
3. Bocchi A., Bracchi P.G.,Campanini G. Delbono G.(1992). Funghi e loro contenuto in elementi minerali. *Ann.Fac. Med. Veter.*,Univ. di Parma.XII,37-48.
4. Borghi E.(2000). Lezione pratica di tecniche merceologiche e di microscopia mirata ai funghi conservati. *Atti Corsi di Aggiornamento di Micotossicologia*, Bedonia (PR),18-20 ottobre, p.36. AUSL di Parma. Dipartimento di Prevenzione. Distretto Valli Taro e Ceno.
5. Borghi E. (2001). Il controllo sanitario s.l.dei funghi conservati.pp.100, Ed. G.E.M.A., Avezzano, L'Aquila, in stampa.
6. Gagliardi G. (1930). Funghi freschi e secchi, commestibili e velenosi. Sessanta tavole a colori, Hoepli Ed. Milano.
7. Jay J.M. (1996). Food Poisoning Caused by Gram-Positive Sporeforming Bacteria. In " *Modern Food Microbiology* " ,pp. 451-477., Chapman & Hall Ed.
8. León-Guzman M.F., Silva I., López G. (1977). Proximate Chemical Composition, Free Amino Acid Contents, and Free Fatty Acid Contents of Some Wild Edible Mushrooms From Querétaro, Mexico. *J.Agric.Food Chem.*,45, 4329-4332.
9. Nonnis Marzano F., Bracchi P.G., Pizzetti P. (2001). Radioactive and Conventional Pollutants Accumulated by Edible Mushrooms (*Boletus sp.*) Are Useful Indicators of Species Origin. *Environ.Res. Sect. A*, 85, in stampa..
10. Senatore F., Dini A., Marino A. (1988). Chemical Constituents of Some Basidiomycetes, *J.Sci.Food Agric.*, 45, 337-345.