

IL MANGANESE: DISTRIBUZIONE TISSUTALE A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE CRONICA NEL CONIGLIO

THE MANGANESE: TISSUE DISTRIBUTION AFTER CHRONIC ADMINISTRATION IN THE RABBIT

G. Delbono¹, A. Fusari¹, A. Ubaldi¹, R. Duratti

IL MANGANESE

Caratteristiche chimico-fisiche

Il manganese, elemento del gruppo VIIA del sistema periodico, ha proprietà per molti aspetti simili a quelle del ferro, immediatamente preceduto nella prima serie di transizione. Il manganese, tuttavia, è più duro, più fragile e meno refrattario del ferro. L'elemento ha una densità di 7,3 g/cm³, una temperatura di fusione di 1244 °C ed una temperatura di ebollizione di 1962°C¹. Il manganese puro è di colore argenteo, ma non si trova in natura. Il manganese metallico è ferromagnetico soltanto dopo uno speciale trattamento.

Questo metallo è chimicamente reattivo e si dissolve rapidamente in acidi diluiti non ossidanti; nel cloro si incendia per formare MnCl₂; reagisce con l'ossigeno ad alta temperatura, producendo Mn₃O₄; si combina anche direttamente con B, C, S, Si e P².

Il manganese ha numerosi stati di ossidazione, il più importante dei quali, sotto l'aspetto pratico, è quello bivalente. Mn(II) forma una serie di sali manganosi con tutti i più comuni anioni, quasi tutti solubili e cristallizzabili come idrati; Mn(II) forma anche una serie di chelati con EDTA ed altri agenti. La chimica di Mn(III) non è molto vasta, perché in soluzione acquosa Mn(III) è instabile e viene rapidamente ridotto a Mn(II). Allo stesso modo i composti Mn(IV) sono di limitata importanza pratica, ad eccezione di MnO₂. Mn(VI) si trova soltanto nello ione manganato (MnO₂)⁻. I permanganati, che sono forti agenti ossidanti, hanno valenza +7.

Diffusione ambientale

Il manganese è relativamente abbondante (costituisce intorno allo 0.1 % della litosfera) ed è il dodicesimo elemento più comune. Tra i metalli pesanti è secondo soltanto al ferro.

Il manganese in natura si trova combinato con borati, carbonati, fosfati, ossidi, silicati e solfuri.

Il minerale contenente manganese più importante è la pirolusite (MnO₂); altri minerali sono i rodanati e la rodocrosite². Le miniere si trovano in depositi sotterra-

¹ Sezione di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale - Dipartimento di Salute Animale - Università di Parma

nei o all'aperto. I maggiori giacimenti sono in Australia, Brasile, Gabon, Sud-Africa, Russia, India e Messico. Ci sono grandi riserve di manganese nelle profondità oceaniche in forma di noduli polimetallici, attualmente considerate non utilizzabili, perché di recupero dispendioso e difficile.

Il manganese è presente in tutti i tessuti animali e vegetali, nell'acqua e nel pulviscolo atmosferico.

Nelle aree urbane e rurali senza sorgenti puntiformi, i livelli di fondo dell'elemento nell'aria vanno da 0,01 a 0,07 mg/m³, mentre nelle aree con sorgenti di emissione industriale i livelli vanno da 0,22 a 0,3 mg/m³. Le sorgenti antropogeniche di manganese nell'ambiente aereo sono costituite dalla combustione dei combustibili fossili (20%) e dall'emissione gassosa industriale (80%). L'utilizzo dei composti organometallici nella produzione di benzine può provocare un incremento delle concentrazioni di manganese nell'ambiente aereo delle aree urbane. L'erosione del suolo è un'altra importante sorgente di manganese nell'aria, ma i dati disponibili per stimare questo contributo sono scarsi.

Le concentrazioni medie di manganese nell'acqua di mare sono di 2 mg/L, mentre nell'acqua dolce vanno da 1 a 200 mg/L. Alcuni composti, come il cloruro ed il solfato di manganese, sono solubili in acqua e quindi l'esposizione può avvenire attraverso l'ingestione di acqua contaminata.

Utilizzi produttivi

Il manganese è stato proposto come elemento da Sheele nel 1771, ma è stato scoperto da Gahn, un chimico svedese che nel 1774 lo ottenne per riduzione della pirolusite tramite carbone. I suoi utilizzi, però, sono rintracciabili nel Periodo del Paleolitico, quando il biossido di manganese era impiegato come pigmento nelle pitture delle caverne. Più tardi, nell'Antica Grecia, la presenza di manganese nei minerali ferrosi usati dagli Spartani è la più plausibile spiegazione del fatto che le loro produzioni metalliche fossero superiori a quelle dei Troiani. Gli Egizi ed i Romani utilizzavano i minerali del manganese nella produzione del vetro, sia per la decolorazione sia per la colorazione (rosa, porpora o nera). Il nome del metallo deriva dal latino "magnes", e proviene dalle proprietà magnetiche della pirolusite³.

Nella metà del XVII secolo, il chimico Glauber ottenne il permanganato, il primo sale di manganese utilizzato. Un secolo dopo, gli ossidi di manganese divennero la base per la produzione del cloro.

Agli inizi del XIX secolo gli scienziati inglesi e francesi considerarono l'uso del manganese nella produzione degli acciai: l'aggiunta dell'elemento incrementava la durezza del ferro senza ridurne la malleabilità o la resistenza. Le leghe Mn-Fe, attualmente il principale impiego produttivo del metallo, sono prodotte attraverso il riscaldamento oltre i 1200°C dei minerali in altiforni od in fornaci elettriche. Un'altra produzione importante, iniziata nei primi del 1900, è la lega Mn-Si, utilizzata per la produzione di acciaio inossidabile. La riduzione del contenuto di carbonio, come richiesto dall'industria degli acciai, si ottenne inizialmente con un processo alluminotermico. Intorno al 1840 in Inghilterra si iniziò a produrre il manganese metallico attraverso un processo elettrolitico. Negli anni '60 si riusciva a produrre su scala commerciale manganese elettrotermico con una purezza fino al 98%.

Il manganese viene utilizzato in piccole quantità nella produzione di leghe di alluminio, rame, zinco, magnesio per incrementarne alcune proprietà.

Il secondo settore utilizzatore di manganese è attualmente quello della produzione di batterie. Nel 1868 Leclanché sviluppò le batterie a secco, tramite l'utilizzo del biossido di manganese come depolarizzante.

La storia del manganese nel XX secolo è costituita da una miriade di nuove applicazioni nei più svariati settori.

I composti del manganese si formano da reazioni con Mn metallico o con i minerali che contengono l'elemento. Il cloruro di manganese trova impiego nella produzione di accumulatori elettrici, di integratori per mangimi zootecnici, di catalizzatori per la clorazione di sostanze organiche e di precursori per altri composti del manganese¹. Il biossido di manganese trova impiego, oltre che nella produzione di accumulatori elettrici, nella produzione del vetro e dei fuochi d'artificio. Il solfato di manganese viene usato nella produzione di ceramiche, nonché di integratori per mangimi zootecnici e di fertilizzanti.

L'ossidazione elettrolitica di MnO_2 in KOH produce il permanganato di potassio che, per le sue proprietà ossidanti, battericide e algicide, trova impiego nella produzione di disinfettanti per l'acqua o gli impianti, di pulitori per metalli e di agenti conservativi per fiori e frutti.

Il manganese in varie forme viene anche impiegato nella produzione di pigmenti e vernici nere, circuiti elettronici, preparazioni industriali e farmaceutiche.

I composti organici del manganese si utilizzano nella produzione di fungicidi, additivi per benzina con e senza piombo, combustibili in genere e abbattitori di fumo. Alcuni fungicidi della famiglia dei ditiocarbammati, come Maneb e Mancozeb, contengono l'elemento e sono molto utilizzati per il controllo di avversità della vite, dei cereali e delle piante da frutto in genere.

Il metilciclopentadienil-tricarbonil-manganese (MMT) è stato introdotto negli ultimi anni come sostituto del piombo, con funzione antidetonante nell'additivazione della benzina. La combustione della benzina contenente l'additivo rilascia particelle submicroscopiche di Mn_3O_4 , potenzialmente inalabili¹. In Canada il MMT è un additivo del carburante già dal 1976. Sebbene l'uso del MMT faccia diminuire il rilascio di monossido di carbonio, l'EPA negli Stati Uniti aveva in origine bandito il composto perché incrementava le emissioni di idrocarburi dalle marmitte catalitiche. Nel 1995 la Corte Federale USA ha deciso di autorizzare l'uso del MMT, attualmente impiegato anche in Europa.

La domanda mondiale di manganese dipende, comunque, direttamente dalle richieste dell'industria dell'acciaio mentre le altre applicazioni produttive non influenzano significativamente la domanda complessiva.

Diffusione negli alimenti

Fino a tempi recenti, le informazioni disponibili sul contenuto di manganese dei diversi alimenti e sull'assunzione da parte delle varie categorie della popolazione erano scarse. La situazione è cambiata con il miglioramento delle tecniche analitiche e con l'acquisizione delle conoscenze sul significato che ha l'elemento per la salute⁴.

Analisi effettuate in numerosi paesi mostrano come i livelli del metallo nelle stes-

se categorie di alimenti sono abbastanza simili. Le concentrazioni nei diversi tipi di alimenti, invece, mostrano grandi variazioni: i valori più elevati di manganese si trovano nei prodotti vegetali, specialmente nei cereali integrali, mentre i valori più bassi si trovano nei prodotti di origine animale⁵. Il tè può costituire la maggior fonte di manganese nella dieta ed è probabile che in una dieta in cui non sono presenti tè e cereali interi ci sia una bassa assunzione di manganese². I processi di raffinazione industriale dei cereali provocano nei prodotti derivati una considerevole perdita dell'elemento².

L'assunzione media giornaliera è approssimativamente di 2-6 mg di Mn e può arrivare a 11 mg nelle diete vegetariane. Il contributo dell'acqua potabile sull'assunzione totale di manganese, se comparata a quella della dieta, è basso. Tenuto conto della composizione media della dieta della popolazione italiana e considerati i livelli nei vari alimenti, i maggiori contributi provengono dai cereali e derivati (specialmente integrali), dal vino e dal tè⁶.

In mancanza di dati precisi sul fabbisogno, in Italia non ci sono livelli di assunzione raccomandati (L.A.R.N.), ma le autorità sanitarie consigliano per il manganese intervalli di sicurezza e adeguatezza di 1-10 mg/gg⁶, in accordo con le raccomandazioni europee⁷. Negli Stati Uniti, i livelli accettabili di manganese stabiliti dalle autorità sanitarie sono di 2.5-3 mg/gg per gli adulti, 1-1,5 mg/gg per gli adolescenti e 1 mg/gg per i bambini. Negli ultimi anni il dibattito riguardante il manganese è stato focalizzato sul potenziale pericolo rappresentato dalle formulazioni a base di soia per i neonati, che hanno livelli di manganese più elevati rispetto a quelli del latte materno.

Diffusione nell'organismo e ruolo biologico

Il manganese si è rivelato elemento essenziale in ogni specie animale studiata. Il contenuto totale di manganese nell'organismo umano varia da 12 a 20 mg⁶.

L'elemento è noto come attivatore di diversi enzimi *in vitro* e costituisce numerosi enzimi (arginasi, piruvato carbossilasi, glutamina sintetasi e superossido dismutasi mitocondriale). Il manganese, inoltre, è essenziale per la formazione dell'osso e della cartilagine². Il manganese può essere essenziale per l'utilizzazione della vit. B₁, della vit. E e del ferro.

Non sono stati accertati con sicurezza casi di carenza di manganese nell'uomo⁶. Nell'animale, in seguito a carenza indotta sperimentalmente, si evidenziano rallentamento della crescita, deformità scheletriche, diminuzione della capacità riproduttiva e difetti nel metabolismo di carboidrati e lipidi.

Gli animali che pascolano sembra non soffrano della carenza di manganese, perché le loro richieste sono soddisfatte dai foraggi che consumano. La deficienza di manganese può essere un problema serio per le specie avicole, per i bovini che non pascolano e per i suini, poiché i supplementi proteici, spesso di origine animale, sono solitamente poveri dell'elemento. Per promuovere la crescita i mangimi specifici per avicoli hanno concentrazioni di manganese intorno a 40 mg/kg, mentre quelli per i ruminanti hanno livelli di 15-25 mg/kg.

Nell'uomo l'assorbimento intestinale del manganese è scarsamente efficiente (5-10%), con considerevoli variazioni tra gli individui. L'assorbimento è inoltre influen-

zato negativamente dalla presenza di alcuni metalli, come ferro e cobalto e dall'elevato contenuto di calcio, fosforo e fitati presenti negli alimenti⁴.

Il manganese, dopo essere entrato nel circolo sanguigno, viene in gran parte captato dal fegato. L'escrezione avviene quasi esclusivamente per via biliare, ma con un circolo entero-epatico che ne limita l'eliminazione. L'elemento viene concentrato, quindi, nel fegato ed anche nel rene e nel pancreas, organi ricchi di mitocondri. I tessuti ricchi di cheratina possono accumulare manganese ed è stato proposto che i capelli ed il pelo possano riflettere lo stato dell'elemento nell'organismo. Le strutture pigmentate come la retina, la pelle scura ed i granuli di melanina contengono alti livelli di manganese. Le ossa sono abbastanza ricche di manganese ed a causa della loro massa contengono la percentuale dell'elemento più elevata del corpo (nell'uomo il 25% del contenuto totale).

Il feto non accumula riserve di manganese prima della nascita e le concentrazioni tissutali fetali sono molto basse⁸.

Tossicità

A dispetto della sua essenzialità, l'eccessiva esposizione al manganese provoca fenomeni di tossicità al sistema nervoso centrale^{9,10}.

Le prime notizie su anomalie neurologiche associate all'esposizione al manganese risalgono al 1837. In una miniera in Francia cinque lavoratori manifestarono ipotonia muscolare, tremori, postura ricurva durante la deambulazione, parlata mormorante e salivazione. In seguito, nei primi del XX secolo sono stati riportati sintomi simili nel cosiddetto "manganese crusher's disease"³. Da allora sono state realizzate numerose ricerche relative all'esposizione professionale dei lavoratori delle miniere, delle acciaierie, delle industrie delle batterie e delle industrie chimiche che utilizzano il metallo.

L'intossicazione acuta per inalazione delle polveri di manganese porta nell'immediato alla cosiddetta "febbre da vapore metallico", caratterizzata da dolori muscolari, brividi, secchezza della gola e della bocca. I sintomi sono preceduti da bronchite acuta, nasofaringite, polmonite ed intorpidimento delle estremità¹¹. Il manganese, poi, dai polmoni trasferisce i suoi effetti devastanti al cervello. L'intossicazione può portare a manifestazioni acute psichiche e neurologiche, che nel complesso prendono il nome di "manganismo". Tali sintomi sono molto simili a quelli del morbo di Parkinson (difficoltà nel cammino e nel controllo preciso dei movimenti della mano), causati da degenerazione cerebrale e distruzione della funzione nervosa in alcune aree¹². Se l'intossicazione non viene scoperta in tempo i sintomi possono esacerbarsi e diventare irreversibili.

Possono essere esposti ad un eccesso di manganese anche gli operatori agricoli che utilizzano impropriamente i formulati contenenti le sostanze attive a base di manganese.

Ricerche epidemiologiche ed esperimenti *in vitro* suggeriscono che gli effetti tossici possono verificarsi con esposizioni a concentrazioni di Mn molto basse⁹.

Fino a tempi recenti si credeva che, mentre i vapori e le polveri del metallo potessero provocare tossicità, l'ingestione di manganese con il cibo non provocasse danni. La comune opinione che il manganese negli alimenti non sia potenzialmente tossico

per l'uomo, è stata messa in discussione dalle ricerche di alcuni autori negli anni '80, attraverso l'osservazione di disordini neurologici sofferti dagli abitanti di un'isola a Nord dell'Australia. Questa popolazione viveva in prossimità di miniere a cielo aperto, tra enormi cumuli di minerali di manganese ed è stato stimato che la dieta conteneva 100-200 mg/kg di manganese. Il 2% degli aborigeni si presentavano affetti da difetti motori neurali e da disfunzioni cerebrali. Un sintomo distintivo della condizione era l'andatura veloce e goffa. La causa della malattia era verosimilmente dovuta ad una predisposizione genetica in alcuni individui suscettibili, stimolata da alti livelli ambientali di manganese. L'intossicazione cronica, in quel caso, è probabilmente avvenuta sia per l'elevata assunzione con il cibo e l'acqua sia per l'inalazione di polveri².

L'esposizione alle polveri ed ai fumi di manganese non dovrebbe superare il valore guida di 5 mg/m³, anche per brevi periodi. L'industria del manganese ha adottato specifiche misure di protezione per i lavoratori, come la riduzione dei livelli e dei tempi di esposizione, l'impiego della ventilazione e l'uso di equipaggiamenti protettivi. Molti paesi hanno portato restrizioni sulle quantità permesse di manganese nell'ambiente aereo e queste misure nel futuro si rafforzeranno. Tuttavia, attraverso test neurologici condotti su lavoratori esposti è stato constatato che esposizioni continue a concentrazioni di manganese pari a 1 mg/m³ di aria sono sufficienti ad influire sul SNC¹³. Il sovraccarico di manganese, infatti, causa lesioni ai gangli basali con abbassamento dei livelli di dopamina³.

Quindi, anche se la maggior parte dei casi di tossicità cronica è legata all'inalazione di particolato contenente manganese, gli effetti sul SNC si hanno anche con l'esposizione al manganese attraverso altre vie. E' stata osservata tossicità in popolazioni che bevevano acqua contenente naturalmente concentrazioni elevate di manganese¹⁴. La tossicità è stata anche evidenziata in individui che ricevevano alimentazione per via intravenosa.

L'intossicazione cronica nell'uomo per ingestione può causare cefalea, agitazione, irritabilità, disturbi della personalità, allucinazioni, sordità, rigidità e tremori¹⁵.

Ricerche recenti hanno suggerito che i bambini sotto i due anni non dovrebbero assumere un'eccessiva quantità di manganese nella dieta, specialmente quella derivante dalle formulazioni per l'infanzia ricche di soia, perché ciò può incrementare il rischio di interferenza con la biochimica del cervello, portando ad effetti tossici¹⁶.

L'eccesso di manganese nella dieta interferisce con l'assorbimento del calcio e del ferro. Negli animali domestici, così come nelle sperimentazioni animali, l'effetto più comune della tossicità da manganese è la carenza secondaria di ferro; ciò è dovuto ad una competizione tra Fe e Mn per comuni sistemi di trasporto e complessati. La tossicità acuta porta negli animali a crescita stentata, anoressia, alterazioni del metabolismo dei carboidrati, alterazioni delle funzioni cerebrali e anomalie comportamentali. Alti livelli di manganese nella dieta non sembrano essere teratogeni, sebbene il manganese iniettato sia fetotoossico in numerose specie, come gatto, topo, coniglio e suino.

Nelle sperimentazioni sui ratti la tossicità cronica porta a disturbi del comportamento, come riduzione delle abilità legate all'apprendimento ed un aumento delle attività spontanee¹⁷.

La determinazione delle concentrazioni di manganese nel siero, realizzata conte-

stualmente all'elaborazione delle immagini di risonanza magnetica del cervello, eventualmente associata a test neurofunzionali, sembra rappresentare il miglior supporto diagnostico per monitorare l'eccessiva esposizione al manganese¹².

Secondo alcuni autori l'accertamento del rischio attraverso gli esperimenti sugli animali od attraverso le osservazioni epidemiologiche non da molte informazioni. La principale questione per la quantificazione di tale rischio è stata, e continuerà ad essere, la relazione tra concentrazioni nel cervello delle popolazioni normali e concentrazioni nel cervello associate con l'inalazione e l'ingestione⁹.

OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il manganese, pur essendo un metallo essenziale per l'organismo animale, rappresenta un metallo "emergente" nell'ambito delle contaminazioni ambientali, in considerazione delle sue svariate utilizzazioni produttive. La tossicità dell'elemento a carico del sistema nervoso centrale, che può esercitarsi anche attraverso l'esposizione a livelli relativamente bassi per periodi prolungati, richiede conoscenze sulla distribuzione tissutale dell'elemento e sull'accumulo nei vari distretti corporei in seguito alla supplementazione. Inoltre, è importante determinare la corrispondenza di concentrazioni abnormi del manganese in determinati distretti con alterazioni funzionali od organiche acute o croniche.

La nostra ricerca si propone di studiare la distribuzione del manganese nei tessuti ed organi del coniglio d'allevamento, la cui dieta è stata arricchita di solfato di manganese. L'allevamento contemporaneo di animali trattati e di soggetti controllo permette di confrontare i dati relativi alle analisi dell'elemento nei vari tessuti ed organi e di valutare il profilo di accumulo dopo intossicazione cronica indotta per via orale.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione

La sperimentazione ha avuto una durata di 101 giorni. Dodici conigli di razza Grimaud di sesso femminile, prelevati da un allevamento a conduzione familiare all'età di 50 giorni, sono stati suddivisi in modo casuale in due gruppi distinti di sei esemplari ciascuno e, dopo identificazione con apposite marche auricolari, stabulati in gabbie. Le gabbie, disposte in un locale appositamente attrezzato, erano fornite di un abbeveratoio a succhiotto e di una mangiatoia divisa in settori. Per l'abbeveraggio è stata utilizzata l'acqua della rete potabile cittadina, che sottoposta ad analisi ha rivelato un contenuto di manganese di 64 mg/l.

Per il gruppo dei conigli da sottoporre a supplementazione, veniva preparata periodicamente una soluzione contenente $MnSO_4$ che era poi diluita nell'acqua di abbeverata. Ad entrambi i gruppi l'acqua veniva somministrata *ad libitum*. Sulla base dei consumi di acqua che si sono verificati, ogni coniglio di controllo assumeva una quantità giornaliera di manganese di 0,41 mg, mentre per ogni coniglio trattato tale quantità era di 4,47 mg.

Il mangime, somministrato *ad libitum* ad entrambi i gruppi, era un mangime

commerciale composto integrato, specifico per conigli. Dall'analisi chimica del mangime è emersa una concentrazione di manganese pari a 40 mg/kg. Sulla base dei consumi di mangime che si sono verificati ogni coniglio di controllo assumeva una quantità giornaliera di manganese di 7,12 mg, mentre per il coniglio trattato tale quantità era di 8,2 mg.

Le quantità giornaliere totali di manganese assunte con la dieta, comprensive di quelle dell'acqua d'abbeveraggio e di quelle del mangime, risultano quindi di 7,53 mg per ciascun coniglio di controllo e di 12,67 mg per ciascun coniglio trattato. I valori riscontrati corrispondono ad un aumento del 68,26% del manganese nella dieta del gruppo dei trattati.

Il campionamento ed il trattamento ai campioni

Dopo 30 giorni dall'inizio del trattamento è stato effettuato un prelievo di sangue con siringa eparinizzata. Alla fine dell'esperimento è stato prelevato il sangue, che è stato immesso in una provetta. In seguito i conigli sono stati sacrificati con anestesia pentobarbiturica praticata nell'aorta con siringa eparinizzata. La macellazione è proceduta con lo scuoiamento ed il sezionamento per il prelievo di tessuti ed organi.

Gli organi fegato, cervello, cuore, stomaco, pancreas, sono stati divisi in due parti, una delle quali utilizzata per gli esami isto-patologici. Degli organi rene, polmone e occhio è stato utilizzato il destro, mentre il sinistro è stato destinato agli esami suddetti. Gli arti destri anteriori e posteriori, i muscoli del diaframma e gli sterni con relativa muscolatura sono stati inseriti in un sacchetto di polietilene, così come tutti gli altri organi e, corredati di una sigla ed un numero identificativo, conservati a -18°C.

Per il sangue un'aliquota è stata congelata, mentre un'altra aliquota è stata sottoposta a centrifugazione (3000 r.p.m. per 15 min). Il plasma ottenuto, immesso in una provetta è stato congelato. Successivamente aliquote di sangue e di siero, rispettivamente di 0,1 ml e di 0,5 ml, sono state diluite in una provetta, rispettivamente 1:4 e 1:2, con una soluzione di ammonio acetato 0,5 M e Triton 0,1%. Le provette sono state agitate per 2 min e stoccate a 4 °C per un tempo massimo di 3 giorni prima dell'analisi.

Tutti gli altri campioni sono stati preparati per l'essiccamento. Dopo scongelamento sono state isolate le parti ossee e quelle muscolari dagli arti e dallo sterno; le ossa sono state pulite meccanicamente e di femore e omero è stata isolata la parte mediana. Dal globo oculare è stato isolato il cristallino e l'umor vitreo. Poi si è proceduto alla macinazione degli organi, delle parti muscolari e di quelle ossee. Un'aliquota di circa 10 g del campione così omogeneizzato è stata sottoposta ad essiccamento in stufa a 102 °C per 24 h. I campioni essiccati sono stati poi polverizzati in mortaio e, dopo immissione in contenitori di plastica, conservati a -18°C.

Successivamente i suddetti campioni sono stati mineralizzati per via umida. È stata pesata in una provetta di vetro un'aliquota di circa 250 mg di campione essiccato, cui sono stati aggiunti 2 ml di acido nitrico e 0,5 ml di acqua ossigenata. Dopo agitazione e sosta per qualche ora a temperatura ambiente, le provette sono state messe in un bagno termostato, dove sono rimaste 24 h a 90 °C. Dopo raffreddamento alle provette sono stati aggiunti 0,5 ml di acqua ossigenata. Il contenuto è stato trasferito prima in un pallone da 10 ml, dove è stato portato a volume con acqua

distillata, poi in provette di vetro con tappo di teflon. La conservazione in questi contenitori fino al momento dell'analisi è avvenuta a temperatura ambiente.

L'analisi del manganese

L'analisi è stata condotta in Spettrofotometria di Assorbimento Atomico con uno strumento Shimatsu Mod. AA6200 (Japan).

Le letture dei campioni di fegato, rene, stomaco e ossa sono avvenute con sistema di atomizzazione in fiamma ossi-acetilenica utilizzando il correttore di fondo a lampada al deuterio, una larghezza della fenditura di 0,2 nm ed una lunghezza d'onda di 279,5 nm. Il metodo di lettura è stato quello della retta di taratura con soluzioni standard di 0, 0,5, 1, 2, 5 mg/L di Mn, tempo di lettura di 5 sec e controllo ogni 50 letture del "bianco". Il limite di rilevabilità era di 0,058 mg/kg.

Le letture dei campioni di muscolo, cuore, cristallino, polmone e cervello sono avvenute con sistema di atomizzazione a fornetto di grafite con tubi pirolitici, utilizzando le medesime condizioni ottiche descritte sopra. Il metodo di lettura è stato quello della retta di taratura con soluzioni standard di 0, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 mg/L di Mn. Il programma della fornace prevedeva 7 passaggi con temperatura di atomizzazione a 2500°C. La regolazione della sensibilità avveniva tramite controllo del flusso di argon. Il volume iniettato manualmente era di 10 ml. Il limite di rilevabilità era di 3,8 mg/kg.

Per le letture dei campioni di sangue intero e plasma, avvenute anch'esse con sistema di atomizzazione a fornetto di grafite, si è utilizzato il metodo delle aggiunte standard, con costruzione della retta di taratura sul primo campione. Al volume di 0,4 ml del campione venivano aggiunte aliquote di 10 e 20 mL di una soluzione di Mn a 0,1 mg/kg. Il programma della fornace prevedeva nove passaggi con temperatura di atomizzazione a 2500°C. Ogni 5 letture avveniva il controllo del "bianco".

La manipolazione dei campioni è stata condotta in modo da evitare tutte le possibili contaminazioni o perdite. Sono sempre stati utilizzati guanti di lattice da laboratorio. I reagenti chimici utilizzati sono stati scelti della massima purezza. Prima dell'uso, tutti i contenitori di vetro sono stati accuratamente lavati, mantenuti in una soluzione al 10% di acido nitrico, risciacquati più volte con acqua deionizzata ed asciugati in un forno ventilato.

Prima delle analisi sono state definite delle prove di validazione, riguardanti alcuni parametri come il limite di rilevabilità ed il limite di quantizzazione, la linearità, la selettività/sensibilità, la precisione, la ripetibilità e la robustezza.

La garanzia dell'accuratezza della procedura analitica, in particolare riguardo alla contaminazione e alla mineralizzazione del campione, è stata ottenuta con l'uso di materiali di riferimento standard della NBS (muscolo bovino e fegato bovino).

Il trattamento dei dati analitici

I dati relativi alle concentrazioni del manganese sono stati elaborati tramite il programma di statistica SPSS.

E' stata utilizzata la media aritmetica e la deviazione standard per il confronto dei due gruppi di campioni.

Le grandezze non parametriche sono più adatte a rappresentare i dati relativi a poche osservazioni (come nel nostro caso), poiché risentono meno dei dati estremi. Sono state utilizzate le rappresentazioni “Box and Whiskers Plot” che danno un’idea complessiva delle caratteristiche statistiche dei dati disponibili, tramite la visualizzazione di alcune grandezze, come intervallo interquartile, mediana e dati che si discostano dal gruppo degli altri (outlier). La rappresentazione è costituita da una scatola (box), all’interno della quale sono compresi il 50% dei dati; il lato inferiore del rettangolo delimita il primo quartile mentre il lato superiore delimita il terzo quartile (25-75% della distribuzione). La linea centrale rappresenta la mediana. Se i dati presentano valori fino a 1,5 intervalli interquartilici oltre i bordi inferiore e superiore del rettangolo, sono rappresentati con segmenti che si prolungano fino al valore più lontano (whiskers). Se sono presenti valori estremi, quindi non rappresentativi del resto della popolazione, vengono rappresentati singolarmente (outliers): i valori all’esterno fino a 3 intervalli interquartilici (outliers veri e propri) sono rappresentati con un asterisco per distinguerli dagli altri rappresentati con un cerchietto (outliers sospetti).

Per confrontare i due gruppi di dati fra loro e mettere in evidenza le differenze significative è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney.

RISULTATI

Nella Tabella 1, per ogni organo e tessuto, sono espresse la media e la deviazione standard delle concentrazioni di manganese rilevate nei due gruppi di conigli. I valori sono espressi in mg/l sul tal quale per plasma e sangue ed in mg/kg sul peso secco per tutti gli altri campioni.

CAMPIONE	Trattati (n=6)	Controlli (n=5)
plasma dopo 30 gg (µg/l)	2,31 ± 0,36	2,04 ± 0,55
plasma dopo 101 gg (µg/l)	3,30 ± 0,38	2,25 ± 1,02
sangue intero dopo 101 gg (µg/l)	11,64 ± 4,19	6,34 ± 0,69
muscoli zampa anteriore (mg/kg d.w.)	0,437± 0,098	0,443 ± 0,100
muscoli zampa posteriore (mg/kg d.w.)	0,435± 0,140	0,368 ± 0,123
muscolo diaframma (mg/kg d.w.)	0,938± 0,336	0,756 ± 0,195
cuore (mg/kg d.w.)	0,870± 0,203	0,722 ± 0,274
osso omero (mg/kg d.w.)	1,41± 0,14	1,29 ± 0,15
osso femore (mg/kg d.w.)	1,35± 0,10	1,19 ± 0,16
osso sterno (mg/kg d.w.)	3,53± 0,39	4,42 ± 0,49
fegato (mg/kg d.w.)	5,89± 0,90	5,36 ± 0,83
rene (mg/kg d.w.)	6,80± 0,47	6,07 ± 0,44
stomaco (mg/kg d.w.)	8,26 ± 3,74	7,05 ± 1,50
cristallino e umor vitreo (mg/kg d.w.)	0,855 ± 0,785	0,256 ± 0,062
polmone (mg/kg d.w.)	0,455 ± 0,142	0,370 ± 0,109
cervello (mg/kg d.w.)	2,64 ± 1,04	2,02 ± 0,48

Tabella 1: medie e deviazioni standard delle concentrazioni di Mn.

Dopo 30 giorni dall'inizio del trattamento i livelli di manganese nel plasma sono più elevati nel gruppo dei conigli trattati rispetto ai controlli. La differenza nelle concentrazioni subisce un incremento ulteriore al sacrificio. Da osservare che i livelli del metallo nel sangue intero sono circa tre volte maggiori rispetto a quelli del plasma.

Le concentrazioni di manganese più elevate sono state riscontrate in stomaco, rene e fegato. I livelli presenti nel tessuto cerebrale si attestano su valori inferiori. L'osso dello sterno contiene livelli più elevati rispetto a femore e omero. Tra i muscoli, quello del diaframma ed il cuore hanno livelli superiori a quelli dei muscoli degli arti anteriori e posteriori. Basse concentrazioni di manganese sono riscontrate in polmone e cristallino. In quest'ultimo tessuto è da osservare che i conigli trattati mostrano concentrazioni considerevolmente più elevate rispetto ai controlli.

Nella Figura 1, per ciascun campione, sono rappresentate le deviazioni delle medie dei dati relativi ai conigli trattati rispetto ai controlli. Gli incrementi più elevati si hanno nel cristallino (234%), nel sangue intero (83,7%), nel plasma al sacrificio (46,6%) e nel cervello (30,6%). Minori incrementi vengono evidenziati per polmone (23,2%), stomaco (17,2%), muscolo del diaframma (24%), cuore (20,5%) e muscolo dell'arto posteriore (18,2%). Modesti sono gli incrementi in altri tessuti, quali rene (12%), fegato (9,9%), omero (9,5%) e femore (13,5%). Le variazioni registrate per l'osso dello sterno e per il muscolo dell'arto anteriore mostrano un decremento, rispettivamente del 20,1% e del 1,4%.

Le differenze tra i dati delle analisi dei due gruppi di animali sono evidenziabili

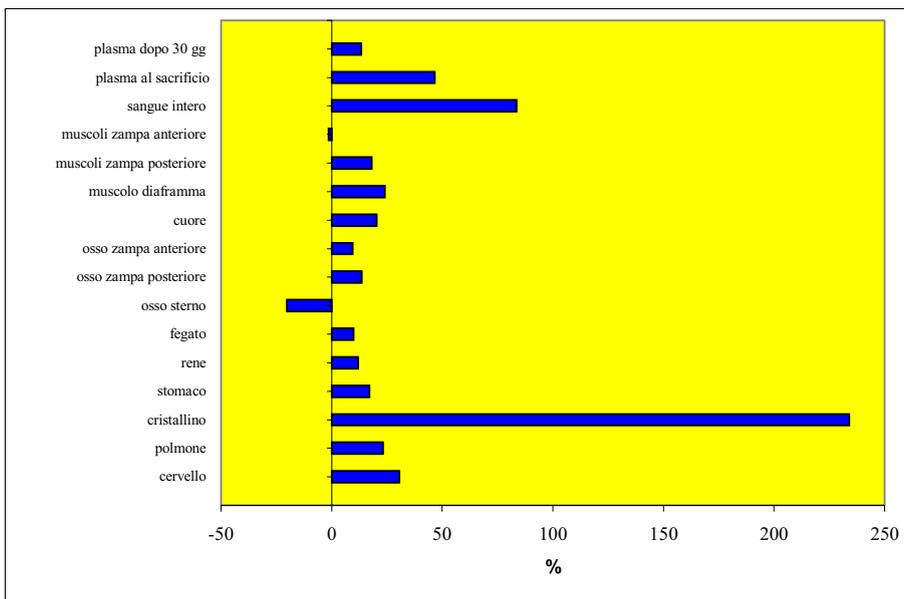


Figura 1: deviazioni rispetto alla media delle concentrazioni di manganese nei vari tessuti e organi.

con maggiore correttezza attraverso l'uso di grandezze non parametriche. Nelle figure 2, 3 e 4 vengono rappresentati i box-plot relativi ai livelli di manganese.

Nel plasma dopo 30 giorni di trattamento i conigli trattati hanno valori più elevati sia per il 1° e 3° quartile che per la mediana; tuttavia la significatività della differenza con il test di Mann-Whitney è molto bassa ($p=0,352$). Alla fine del trattamento la significatività è rilevante ($p=0,082$) e nella figura le aree dei box non sono sovrapponibili. Ciò è ancora più evidente per il sangue intero e la significatività delle differenze tra i due gruppi è elevata ($p=0,017$). I valori relativi allo stomaco dei conigli trattati sono molto dispersi e non si evidenziano differenze tra i due gruppi. Lo stesso fenomeno si registra per il fegato, anche se la significatività è più consistente ($p=0,247$). Nel rene, invece, la mediana relativa ai conigli trattati è nettamente più alta, così come sono più alti i valori inferiori; tali differenze sono evidenziate da una significatività importante ($p=0,052$). La dispersione dei dati relativi a polmone, cervello e muscoli dei soggetti trattati porta a significatività piuttosto scarse. I dati relativi alle ossa hanno la caratteristica di essere simili, sia per i conigli trattati sia per quelli di controllo. La significatività è più elevata per il femore ($p=0,177$) che per l'omero ($p=0,247$). Per l'osso dello sterno i valori relativi ai conigli di controllo sono significativamente più alti rispetto a quelli dei soggetti trattati ($p=0,017$). Per il cristallino i valori sono nettamente più alti nei conigli trattati, come evidenziato dall'elevata significatività emersa dal test ($p=0,017$).

DISCUSSIONE

L'efficienza nell'assorbimento del manganese con la dieta è piuttosto variabile e dipende in larga misura dalla quantità apportata. La dose impiegata in questa ricerca è da considerarsi bassa e tale da configurare un'intossicazione sub-cronica da manganese.

La regolazione dei livelli tissutali di manganese, controllata dal fegato e dal tratto gastrointestinale per un ampio intervallo di assunzione, non sottosta ad un perfetto meccanismo omeostatico. Le concentrazioni nel plasma sono influenzate dai livelli nella dieta. Nella nostra ricerca abbiamo verificato che in seguito al trattamento è presente un certo incremento dei livelli di manganese nel plasma. L'incremento, tuttavia, più significativo nel sangue intero, evidenzia che il metallo ha un'affinità superiore per i componenti ematici non plasmatici. Il manganese forma, infatti, legami con l'emoglobina all'interno degli eritrociti.

I risultati mostrano che, per i soggetti trattati, concentrazioni significativamente più elevate nel sangue intero e nel plasma, non corrispondono a livelli significativamente più elevati nel fegato.

Nella sperimentazione effettuata da Scheuhammer e Cherian su ratti esposti cronicamente al manganese con somministrazioni intraperitoneali sono stati trovati incrementi significativi in diversi organi, ad eccezione del fegato¹⁸. I valori relativi al fegato dei ratti, sia trattati sia di controllo, sono molto simili a quelli da noi rilevati. Questo si spiega con il fatto che il manganese viene efficacemente e velocemente eliminato dal fegato tramite secrezione nella bile, ma altresì, che l'eliminazione del metallo dipende dalla funzionalità epatica¹⁹. Per contro, le concentrazioni di manga-

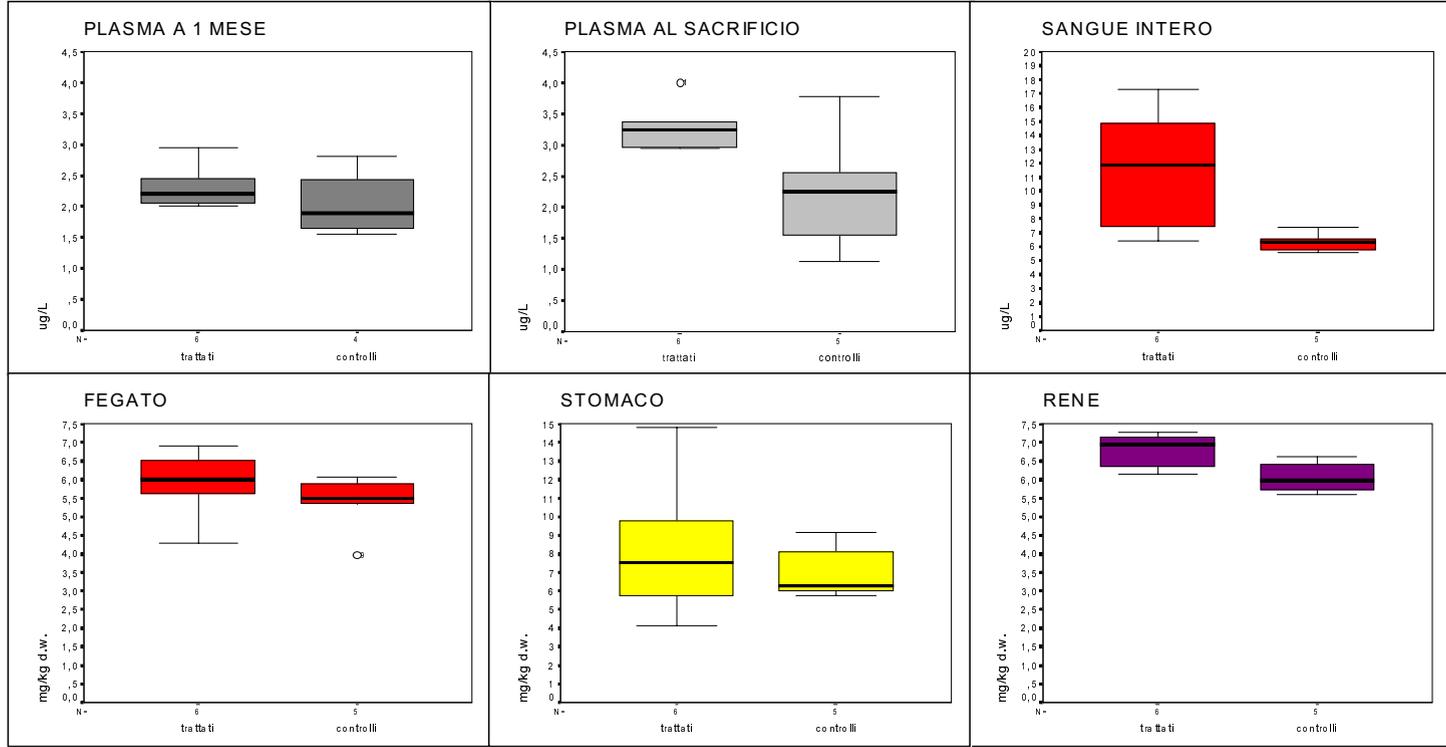


Figura 2: Box-plot delle concentrazioni di manganese in plasma, sangue, stomaco, fegato e rene

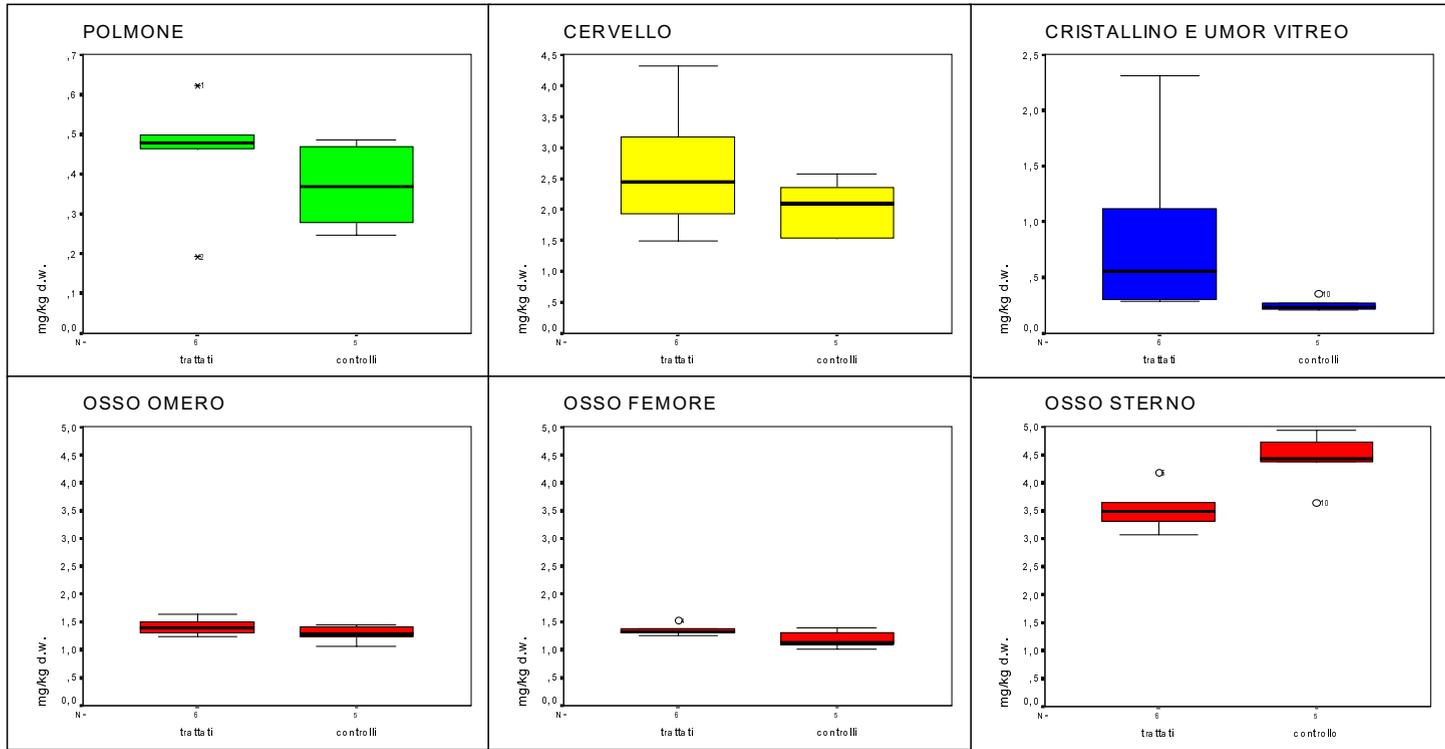


Figura 3: Box-plot delle concentrazioni di manganese in polmone, cervello, cristallino e ossa.

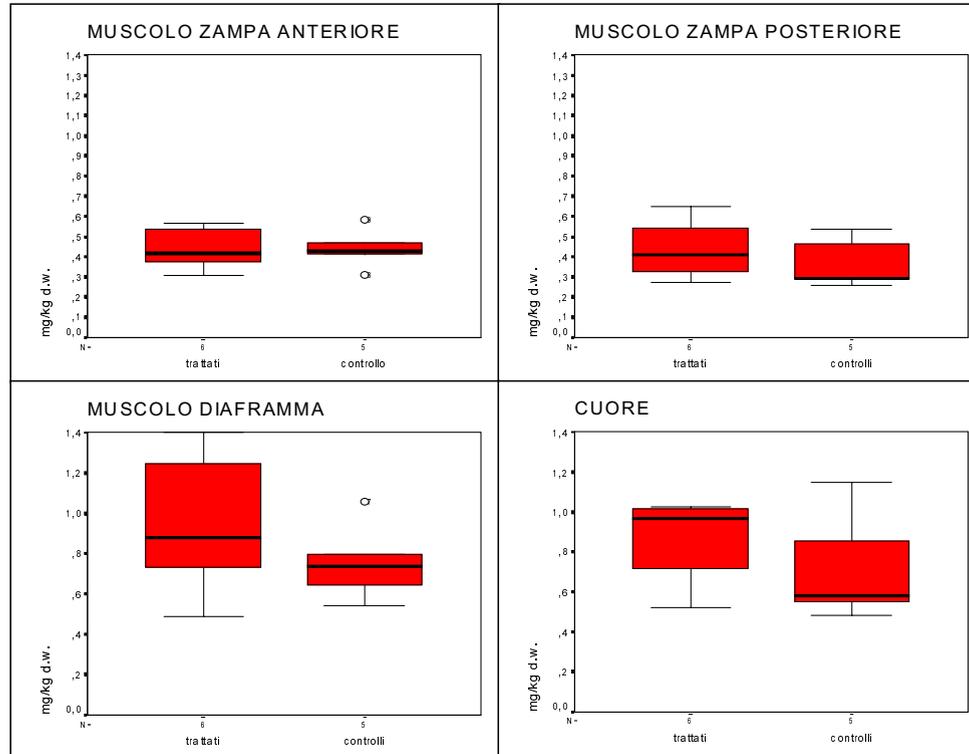


Figura 4: Box-plot delle concentrazioni di manganese nei muscoli.

nese nel femore e nel rene trovate dagli autori citati sono sensibilmente più alte di quelle da noi osservate (rispettivamente di 37,84 mg/kg e 6,58 mg/kg). I trattamenti intravenosi e intraperitoneali riportati in letteratura conducono comunque ad accumuli consistenti di manganese in vari tessuti, in particolare quello osseo e quello pancreatico. La comparazione quantitativa con i nostri rilievi sperimentali si rende difficile, poiché le vie di somministrazione i.v. e i.p. presentano una biodisponibilità totale. Nel nostro contesto sperimentale, invece, il sistema gastroenterico e l'assorbimento intestinale influenzano sensibilmente la biodisponibilità. La scelta della via della somministrazione orale è stata effettuata per la constatazione che nella realtà essa rappresenta una probabile via di assunzione, anche in considerazione della reale situazione di inquinamento ambientale da manganese.

Le concentrazioni trovate nei diversi campioni di osso non sono univoche. Nel femore e nell'omero dei conigli trattati si verifica un certo accumulo di manganese, mentre l'osso dello sterno si comporta in modo contrario. Tale differenza potrebbe essere spiegabile con la diversa matrice cartilaginea. Il tessuto osseo diventa una potenziale riserva di manganese, ma tali riserve non sono rapidamente mobilizzabili¹⁷.

Da osservare che gli organi che presentano le maggiori concentrazioni in assoluto, come stomaco, rene, fegato e cervello, hanno incrementi più ridotti rispetto a campioni come cristallino, sangue e plasma. Questi ultimi, pur presentando concentrazioni modeste, manifestano un'alta capacità di accumulo in seguito alla somministrazione. Questo fenomeno è plausibile in un contesto di sperimentazione caratterizzato da una prolungata e costante somministrazione del metallo.

Ad eccezione dell'osso dello sterno e dei muscoli dell'arto anteriore, tutti gli altri campioni presentano delle concentrazioni di manganese che aumentano per effetto del trattamento. Dal test di Mann-Whitney, ponendo il limite di significatività a $p=0,1$, emerge che le medie dei livelli di manganese sono significativamente più elevate nel gruppo dei soggetti trattati per sangue intero, cristallino, rene e plasma. Per gli altri campioni, invece, che pure presentano incrementi importanti, come il cervello, la significatività è molto debole. Al contrario per il fegato, che mostra un incremento basso, la significatività della differenza tra i due gruppi è più elevata.

CONCLUSIONI

Diversamente dagli altri elementi essenziali presenti nell'organismo, l'assorbimento del manganese non è ben regolato. La crescente diffusione ambientale di questo elemento, conseguenza degli svariati impieghi produttivi, evidenzia l'importanza di studiare gli effetti dell'esposizione cronica al metallo. L'uomo e gli animali possono essere esposti ad un eccesso di manganese attraverso l'aria respirata, l'acqua e gli alimenti. L'elemento è incontrovertibilmente tossico attraverso le vie di esposizione orale, inalatoria e intravenosa. La tossicità provocata dal manganese può portare gravi e persistenti danni neurologici. I fenomeni di tossicità sono stati riportati principalmente per soggetti esposti ad alti livelli di manganese nell'aria degli ambienti, ma anche per l'eccessiva esposizione con la dieta. Ricerche epidemiologiche ed esperimenti *in vitro* suggeriscono che la neurotossicità può verificarsi anche con esposizioni a concentrazioni del metallo basse, non soltanto attraverso la via ina-

latoria ma anche attraverso la dieta. La presenza nell'aria del metilciclopentadienil-tricarbonil-manganese per effetto dell'additivazione della benzina, l'utilizzo di prodotti fitosanitari a base di manganese e la presenza di formulazioni a base di soia destinate all'infanzia con quantità significative di manganese, possono costituire delle potenziali fonti di pericolo per l'uomo.

I fenomeni neurotossici sono particolarmente importanti gli individui giovani perché le perturbazioni indotte dal metallo al SNC possono portare a disordini più gravi nell'età adulta. Il cervello, infatti, è più vulnerabile nei primi mesi di vita poiché i neuroni, i dendriti e le sinapsi sottostanno ad un'intensa proliferazione. L'intrusione di sostanze potenzialmente tossiche, come il manganese, perturba l'emergente organizzazione neurale e può esercitare effetti nel lungo periodo. Ricerche effettuate sui ratti hanno evidenziato che il manganese può produrre disturbi dell'apprendimento¹⁷.

La presente ricerca ha evidenziato che molti organi accumulano manganese, quando questo è supplementato per un medio periodo a basse dosi nella dieta. Il cervello, considerato l'organo principale per la quantificazione del rischio, presenta concentrazioni sostanzialmente più elevate negli animali trattati rispetto a quelli non trattati, sebbene l'aumento tissutale sia nettamente inferiore a quello programmato nella dieta. Si evidenzia comunque, che l'aumento dei livelli di manganese in seguito al trattamento coinvolge la quasi totalità dei campioni, pur tra differenze relativamente agli incrementi percentuali ed alla significatività statistica. I liquidi biologici, come il sangue intero ed il plasma, possono monitorare lo stato dell'elemento, anche se risentono in una certa misura dell'esposizione più recente.

La conoscenza dei livelli nel plasma, in combinazione con quella di altri parametri, come quelli ematologici e le variazioni biochimiche, possono fornire importanti contributi per studiare l'intossicazione cronica da manganese. L'osservazione dei cambiamenti comportamentali negli animali, per esempio attraverso test neurofunzionali, può essere importante al fine di formulare ipotesi patogenetiche dell'assunzione e rappresenta la miglior via per monitorare l'eccessiva esposizione al manganese¹².

Le ricerche future saranno volte ad approfondire questi aspetti sulla base di nuove sperimentazioni.

Parole chiave: manganese, coniglio, neurotossicità, distribuzione tissutale del manganese.

Key words: manganese, rabbit, neurotoxicity, manganese tissue disposition.

Mots-clefs: manganèse, lapin, neurotoxicité, partage tissutal du manganèse.

RIASSUNTO - Il manganese è un elemento essenziale per le funzioni metaboliche, ma può diventare tossico in condizioni di esposizione cronica. Le manifestazioni più distruttive e conosciute della tossicità del manganese sono alcune sindromi neurologiche, che tendono ad essere più estese negli animali giovani rispetto a quelli adulti. L'assunzione del manganese da parte dell'organismo varia fortemente secondo le scelte alimentari, la composizione dell'acqua e la qualità dell'aria respirata.

Nonostante sia stato scoperto nel 1774, l'utilizzo del manganese risale ai tempi più antichi. Attualmente è uno dei metalli più utilizzati, con numerose applicazioni,

in particolare nella produzione degli acciai. Negli ultimi anni si è assistito ad una maggiore diffusione del metallo nell'ambiente aereo, a causa dei suoi recenti utilizzi nella produzione di carburanti e delle emissioni industriali.

Questa ricerca è stata intrapresa per determinare la distribuzione negli organi e nei tessuti del manganese somministrato a bassi livelli attraverso con la dieta. Nella sperimentazione un gruppo di conigli è stato trattato con $MnSO_4$ nell'acqua di abbeverata per 60 giorni, mentre un gruppo fungeva da controllo. Campioni di sangue intero, plasma, fegato, rene, stomaco, polmone, cervello, cuore, cristallino, muscoli ed ossa sono stati analizzati tramite spettrofotometria di assorbimento atomico. I risultati mostrano che le concentrazioni di manganese in molti tessuti ed organi sono più elevate nei conigli trattati rispetto ai controlli. Lo stomaco, il rene ed il fegato rivelano i livelli più elevati con valori di 8,26 mg/kg, 6,80 mg/kg e 5,89 mg/kg, rispettivamente. Gli incrementi più significativi si hanno, invece, nel cristallino (234%), nel sangue (83,7%), nel plasma (46,6%) e nel cervello (30,6%). Le differenze tra i due gruppi sono statisticamente significative per il cristallino ($p=0,017$), per il sangue ($p=0,017$), per il rene ($p=0,052$) e per il plasma ($p=0,082$).

SUMMARY - Manganese is an essential nutrient for metabolic functions, but at high intake rates can lead to adverse biological consequences, like neurological disorders. The neuronal damage caused by the manganese tends to be more extensive in young, immature animals than in adults. Manganese intake can vary greatly with food choices, water composition and ambient-air quality.

While manganese was discovered in 1774, its use goes back to the Stone Age. Now it is one of the most widely used metals in the world with many applications, especially in the manufacture of steel. In the last few years an increase of Mn-levels in the ambient air is observed, because of the anthropogenic sources like combustion of fossil fuels and the emission of manganese from industrial source.

This research studies the distribution of manganese in some tissues after supplementation of low Mn-levels in feed. One group of rabbits were treated for 60 days with $MnSO_4$ in the water, while another group of animals was the control. Blood, plasma, liver, kidney, stomach, lung, brain, heart, crystalline, some skeletal muscles and bones were analysed by atomic absorption spectrophotometer. Results show that manganese levels increase in many tissues in the treated group. Stomach, kidney and liver have the highest level with values of 8,26 mg/kg, 6,80 mg/kg e 5,89 mg/kg, respectively. The more significant increases were in crystalline (234%), in blood (83,7%), in plasma (46,6 %) and in brain (30,6%). Differences between groups are significant in crystalline ($p=0,017$), in blood ($p=0,017$) in kidney (0,052) and in plasma ($p=0,082$).

RÉSUMÉ - Le manganèse est un élément essentiel pur le fonctions métaboliques mais pot devenir toxique dans la condition d'exposition chronique. La manifestation plus destructive et connue de la toxicité du manganèse est un syndrome neurologique, que tendon être plus grand dans les animaux jeun respect les adultes. L'apport du manganèse du part des organismes varie fortement a second des choisse alimenter, de la composition de l'eau e de la qualité de l'air respiré.

Cela il a été découvert en 1774, l'utilisation du manganèse remonte aux temps

de la piètre. Aujourd'hui il est un des métaux plus utilisés, avec nombreuse application, in particulier dans la production des aciers. Dans la dernière année nous avons un major diffusion de métaux dans air, aussi à cause du sien récente utilisation dans la production des carburants.

Cette recherche a été intrants pour déterminer la distribution dans les organes e dans les tissus des manganèse supplémenté a petits niveaux avec la dite. Dans l'expérimentation un group des lapins a été traité avec $MnSO_4$ dans l'eau d'abreuvement pour 60 jour, tandis que l'autre group était le control. Champions de sangle inter, plasma, foie, reine, estomac, poumon, cervelle, cour, cristallin, muscol et osas à été analité tramait spectrophotomètre des absorbement atomique. Les résultats indiquent que les concentrations de manganèse dans les pus part de tissu et organe sont plus élevé dans les lapins traité respect aux les lapins controls. Les estomaque, la reine et le foie rivelaine les niveaux plus élevés avec teneur de 8,26 mg/kg, 6,80 mg/kg 5,89 mg/kg respectivement. Les incrémentes plus significative sont, au contraire, dans le cristallinien (234%), le sangle (83,7%), le plasma (46,6%) et la cervelle (30,6%). Les différences trac les doux groups sont statistiquement significatifs dans le cristallin ($p=0,017$), dans la sangle ($p=0,017$), dans la reine ($p=0,052$) e dans le plasma ($p=0,082$).

BIBLIOGRAFIA

- 1) BARCELOUX D.G. (1999) Manganese. *Clinical Toxicology*, 37(2), 293-307.
- 2) REILLY C. (1991) *Metal Contamination of Food*. 2° ed., Elsevier, Essex.
- 3) PAL P.K., SAMII A., CALNE D.B. (1999) Manganese Neurotoxicity: A Review of Clinical Features, Imaging and Pathology. *NeuroToxicology*, 20 (2-3), 227-238.
- 4) DAVIDSON L., CEDERBLAD A., LONNERDAL B. (1989) Manganese retention in man: a method estimating manganese absorption in man. *American Journal Clinical Nutrition*, 49, 170-179.
- 5) WENLOCK R.W., BUSS D.H., DIXON E.J. (1979) Trace Nutrients 2. Manganese in British foods. *British Journal Nutrition*, 41, 253-261.
- 6) Società Italiana di Nutrizione Umana (1996) Livelli di Assunzione Raccomandati di Energia e Nutrienti per la Popolazione Italiana. SINU, Roma.
- 7) COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES (1993) Nutrient and energy intakes for the European Community. Report of the Scientific Committee for Food, thirty-first series, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- 8) HURLEY L.S., KEEN C.L. (1987) Manganese. In: *Trace Elements in Human Health and Animal Nutrition*. Ed Underwood E, Mertz E. ed., New York, Academic Press, 185-223.
- 9) ANDERSEN M.E., GEARHART J.M., CLEWELL H.J. (1999) Pharmacokinetic Data Needs to Support Risk Assessments for Inhaled and Ingested Manganese. *NeuroToxicology*, 20 (2-3), 161-172.

- 10) FECHHTER L.D. (1999) Distribution of Manganese in Development. *Neuro-Toxicology*, 20(2-3), 197-202.
- 11) BOZZA MARRUBINI M.L., GHEZZI LAURENTI R., UCCELLI P. (1987) *Intossicazioni acute; meccanismi, diagnosi e terapia*, seconda edizione. OEMF s.p.a., 714-715.
- 12) GREGER J.L. (1999) Nutrition Versus Toxicology of Manganese in Humans: Evaluation of Potential Biomarkers. *NeuroToxicology*, 20(2-3), 205-212.
- 13) ZHENG Y.X. (1999) Manganese debated. *Working Life Research and Development News. Newsletter* n.4.
- 14) KONDAKIS X.G, MAKRIS N., LEOTSINIDIS M., PRINOU M., PAPAPETROPOULOS T. (1989) Possible health effects of high manganese concentration in drinking water. *Archives Environmental Health*, 44, 175-178.
- 15) PAL P.KR., SAMII A., CALNE D.B. (1999) Manganese Neurotoxicity: A review of Clinical Features, Imaging and Pathology. *NeuroToxicology*, 20(2-3), 227-238.
- 16) SHAUSS A.G. (1996) *Minerals, trace Elements and Human Health*. Life Sciences press, Tacoma (WA).
- 17) KEEN C.L., ENSUNSA J.L., WATSON M.H., BALY D.L., DONOVAN S.M., MONACO M.H., CLEGG M.S. (1999) Nutritional Aspects of Manganese From Experimental Studies. *NeuroToxicology* 20, (2-3), 213-224.
- 18) SCHEUHAMMER A.M., CHERIAN M.G. (1983) The influence of manganese on the distribution of essential trace elements. II The tissue distribution of manganese, magnesium, zinc, iron, and copper in rats after chronic manganese exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 12, 361-370.
- 19) SCHEUHAMMER A.M. (1983) Chronic manganese exposure in rats: Histological changes in the pancreas. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 12, 353-360.

INDAGINE SUL VALORE DIETETICO-NUTRIZIONALE DELLA LUMACA. CONFRONTO FRA SPECIE E FRA SOGGETTI RACCOLTI IN NATURA ED ALLEVATI

Novelli E.*, Giaccone V*., Balzan S.*., Ghidini S.°, Bracchi P.G.°.

Introduzione

Gli orientamenti alimentari del consumatore sono oggi fortemente condizionati dalla presenza e dalla quantità di determinati principi nutritivi nelle derrate nonché dalla sicurezza del prodotto alimentare, concetto quest'ultimo che dovrebbe essere inteso come la volontà da parte degli operatori della filiera di ridurre al minimo la probabilità che un qualche residuo di natura chimica, fisica e biologica che possa nuocere alla salute, sia presente nell'alimento.

In quest'ottica il lavoro intrapreso vuol essere un contributo per l'approfondimento delle conoscenze utili ai fini della valorizzazione del prodotto alimentare "lumaca", valorizzazione non solo in termini alimentari ma anche economico-sociali in virtù della crescente richiesta del prodotto da parte del mercato interno e della prospettiva di poter integrare, attraverso l'attività di allevamento del mollusco, l'attività agricola soprattutto nelle zone montane e pede-montane del paese.

La parte che viene di seguito presentata è un'indagine sul contenuto in principi nutritivi delle più diffuse e delle più importanti, da un punto di vista alimentare, specie di chioccioline del genere *Helix* in Italia. Un approfondimento particolare ha riguardato la composizione in acidi grassi della componente lipidica della parte edibile della chiocciolina. Vengono inoltre sinteticamente riportati anche i risultati del confronto intra-specifico in termini compositivi fra molluschi prodotti in allevamento e molluschi raccolti in natura. In una successiva pubblicazione verranno presentati i risultati dell'indagine analitica relativa al contenuto in elementi minerali di interesse nutrizionale e di interesse tossicologico.

Materiali e metodi

Sono state analizzate lumache appartenenti alle specie *lucorum*, *aspersa*, *pomatia*, *aperta* e *vermiculata* del comune genere *Helix* provenienti da diverse zone del paese (province di Cagliari, Caserta, Cuneo, Lecce, Modena, Ravenna e Verona). Il prodotto era, per la maggior parte, proveniente da raccolta in natura e, per le sole specie *lucorum*, *aspersa* e *pomatia*, è stato analizzato anche prodotto di allevamento. Le

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

* Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova.

lumache sottoposte ad analisi erano opercolate e, ad eccezione dei soggetti della specie *aperta*, di pezzatura relativamente omogenea con peso compreso fra i 12-16 grammi. Queste ultime avevano una pezzatura compresa fra 4 e 5 grammi. Le determinazioni analitiche sono state condotte sulla parte muscolare costituita dal muscolo pedale, testa e porzioni del mantello avendo cura di eliminare, oltre ai visceri, quanta più emolinfa possibile. Le analisi, ad eccezione del contenuto d'umidità, sono state effettuate sul materiale liofilizzato ottenuto raggruppando una cinquantina di lumache. L'analisi compositiva per il contenuto di umidità, proteina grezza, grasso grezzo e cenere è stata rispettivamente condotta secondo le metodiche ufficiali AOAC n. 934.01; 976.06; 920.39; 942.05. Il contenuto in estrattivi è stato desunto per differenza. L'energia lorda è stata determinata mediante calorimetro (IKA C 400) adiabatico secondo la metodica ISO 339 (1998). Su una aliquota dell'estratto lipidico ottenuto secondo la metodica di Folch e coll. (1957) sono stati prodotti gli esteri metilici degli acidi grassi mediante derivatizzazione in ambiente acido (2% di acido solforico in alcol metilico) a temperatura di 50° C per 12 ore cui ha fatto seguito l'analisi gascromatografica mediante colonna capillare Omegawax 250 (Supelco) montata su gascromatografo Termoquest 8000. L'identificazione degli acidi grassi è stata effettuata per confronto del tempo di ritenzione dei composti del campione con quello di standard puri.

Risultati e discussione

Tabella 1 - Composizione centesimale (g/100 g). Valori espressi sul tal quale umido.

Specie	Umidità	Proteina grezza	Grasso grezzo	Cenere	Estrattivi	Energia (kcal/100 g)
<i>H. lucorum</i>	80,9 ± 1,2	14,9 ± 0,5	0,5 ± 0,0	2,3 ± 0,4	1,4 ± 0,4	89,7 ± 2,9
<i>H. aspersa</i>	81,6 ± 0,3	12,5 ± 0,4	0,6 ± 0,0	1,9 ± 0,0	3,4 ± 0,8	86,3 ± 1,1
<i>H. pomatia</i>	81,9 ± 0,7	12,4 ± 0,8	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,5	2,9 ± 1,0	81,4 ± 0,9
<i>H. vermiculata</i>	81,2 ± 1,2	10,2 ± 0,6	0,9 ± 0,1	2,5 ± 0,4	4,8 ± 0,9	82,9 ± 5,2
<i>H. aperta</i>	81,6	11,7	0,7	1,4	4,7	74,2
media generale	81,6 ± 0,8	12,4 ± 1,4	0,6 ± 0,1	2,2 ± 0,6	3,2 ± 1,3	83,0 ± 4,4

Nella tabella 1 sono riportati i risultati relativi alla composizione centesimale del prodotto.

I valori sono presentati divisi secondo la specie e come media generale. Il contenuto di umidità ha un valore medio di 81,6 % con una ridottissima variabilità. Si può ragionevolmente sostenere che un prodotto della pezzatura presa in considerazione presenta un tessuto muscolare che, nell'ottica di una sua trasformazione in alimento, ha un buon contenuto in sostanza secca, i cui valori di umidità ridotti sono sensibilmente inferiori a quelli riportati da Gomot (1998) in uno studio condotto su prodotti analoghi ma di pezzatura inferiore. Il contenuto medio in proteine è pari a 12,4% ed è, fra i principi nutritivi, quello che presenta la maggior variabilità in funzione della specie. Tale valore è confrontabile con quello di alcune specie di molluschi marini. Il maggior contenuto proteico, pari a 14,9%, compete a *H. lucorum* mentre il minor contenuto, pari a 10,2%, compete a *H. vermiculata*; *H. aspersa* e *H. pomatia* hanno un contenuto proteico intermedio alle due specie suddette. Non sembrano invece sus-

sistere, all'interno della stessa specie, sostanziali differenze nel contenuto proteico fra prodotto raccolto in natura e prodotto allevato (figura 1).

Il contenuto medio in ceneri è risultato pari a 2,2% con valori che variano fra un minimo dell'1,4% e un massimo del 2,5%. Quelli rilevati sono valori sicuramente alti ma giustificati dalle necessità metaboliche e fisiologiche del mollusco in accrescimento per la genesi della conchiglia (per larga parte costituita da fosfato di calcio). I valori riscontrati sono comunque nell'ordine di grandezza di quelli propri dei gasteropodi. Si rimanda, a questo proposito, ad una successiva pubblicazione per la parte relativa alla composizione in elementi del tessuto muscolare.

Gli estrattivi, quota parte della composizione tissutale ascrivibile agli zuccheri, costituiscono nel loro insieme un'eterogenea categoria di composti di cui il glicogeno è, nei tessuti animali, quello predominante. Il riscontro di quantità relativamente elevate di estrattivi nelle carni della lumaca viene, secondo alcuni autori, ricondotto alla specificità di questi polmonati rispetto agli altri animali eterotermi ad immagazzinare le riserve energetiche in forma di polisaccaridi piuttosto che di grassi (Oudejans e Van Der Horst, 1974).

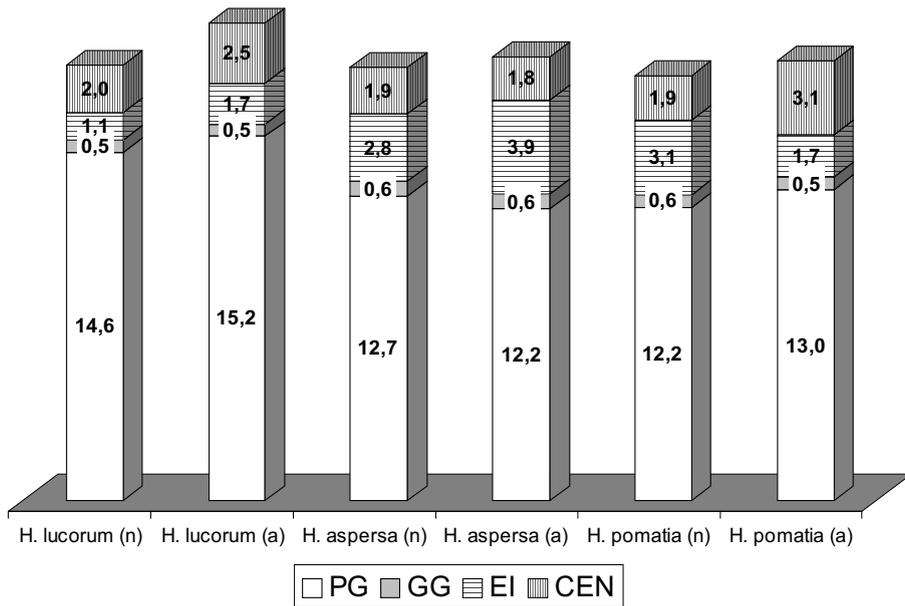


Figura 1. Composizione centesimale (g/100 g): confronto fra specie prodotte in allevamento (a) con specie raccolte in natura (n).

Il valore energetico è modesto e mai superiore a 90 kcal/100 grammi. Il contenuto di grasso, il cui valore medio risulta essere pari allo 0,6%, presenta un ridotto intervallo di oscillazione considerato che il valore massimo (1,1%) è stato rilevato in un campione soltanto. La massa muscolare del prodotto analizzato presenta pertanto ridotte quantità di grassi di deposito a vantaggio del grasso a valenza strutturale facente parte delle membrane che avvolgono le cellule. I valori ottenuti sono suffi-

cientemente concordi con quelli riportati da Oudejans e Van Der Horst (1974) ove la quota parte di lipidi neutri rappresenta poco più del 50% della quota lipidica totale della massa muscolare di campioni di chioccioline adulte della specie *H. pomatia*. Va tuttavia considerato che la metodica d'analisi utilizzata nel presente studio per la determinazione quantitativa del contenuto di grasso prevede l'utilizzo di etere dietilico, un solvente che consente il recupero solo parziale della componente lipidica più polare. I valori riportati in tabella 1 potrebbero perciò essere sottostimati. La composizione qualitativa del grasso, per la parte riguardante gli acidi grassi più rappresentati, è riportata in tabella 2.

Tabella 2 - Composizione media e valori massimi e minimi dei principali acidi grassi del tessuto muscolare di lumaca (valori percentuali).

Acido grasso	Valore medio	Valore minimo	Valore massimo
C14:0 (miristico)	0,32	0,18	0,48
C14:1 (miristoleico)	0,12	0,08	0,16
C16:0 (palmitico)	7,43	5,99	9,11
C16:1 (palmitoleico)	0,26	0,12	0,62
C18:0 (stearico)	10,26	8,50	12,66
C18:1 (oleico)	12,14	9,65	16,05
C18:2 (linoleico)	14,65	11,64	24,15
C18:3 (α -linolenico)	1,19	0,64	2,55
C20:2 (eicosadienoico)	10,08	8,83	12,01
C20:3 (eicosatrienoico)	0,88	0,67	1,42
C20:4 (arachidonico)	12,51	10,55	15,33
C20:5 (eicosapentaenoico)	2,05	1,49	2,75
<i>n6</i>	38,36	32,69	44,75
<i>n3</i>	4,05	3,00	6,56
<i>n6/n3</i>	9,72	5,87	13,43

In figura 2 è riportata, invece, la classificazione ponderale in acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi delle diverse specie di lumaca prese in considerazione. Come si può dedurre dai valori riportati in figura 2 la lumaca, un gasteropode adatto alla vita terrestre, ha una composizione in acidi grassi che potrebbe essere definita peculiare: non completamente assimilabile a quella delle carni degli animali terrestri né completamente assimilabile a quella degli animali marini.

Si distingue per un ridotto contenuto in acidi grassi saturi e monoinsaturi, che rappresentano rispettivamente il 25,3% e il 17,3% degli acidi grassi identificati e un elevato contenuto in acidi grassi polinsaturi (57,4%).

Globalmente gli acidi grassi insaturi costituiscono quasi il 75% della totalità degli acidi grassi identificati, valore in qualche modo confrontabile con quello pertinente i prodotti della pesca. Gli acidi grassi saturi più rappresentati risultano essere il miristico (C14:0), il palmitico (C16:0) e lo stearico (C18:0). Particolarmente ridotta sembra essere l'abbondanza relativa dei primi due dove il palmitico risulta essere ad un livello che è rispettivamente un terzo e la metà dei valori riscontrabili nelle carni degli altri animali terrestri e dei prodotti della pesca. Tale situazione presenta un'inevitabile vantaggio in termini nutrizionali: la riduzione dell'apporto dietetico di acidi

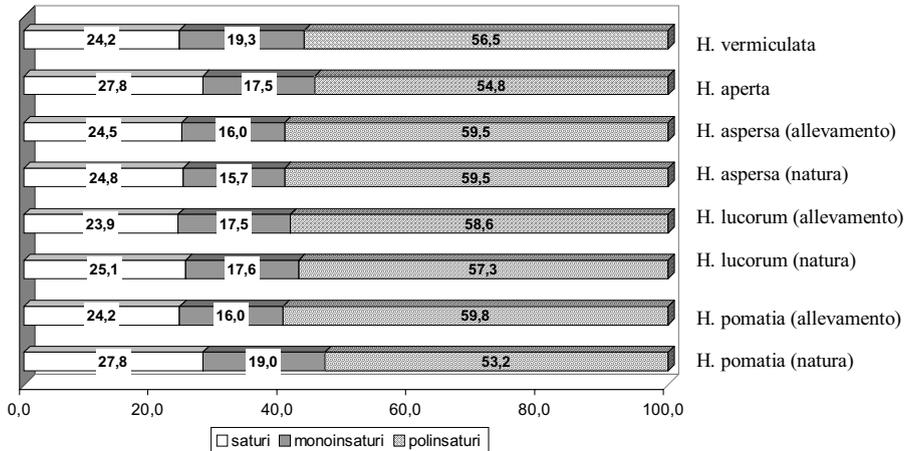


Figura 2. Composizione percentuale, normalizzata in percentuale, in acidi grassi del tessuto muscolare di lumaca. Raggruppamento in saturi, monoinsaturi e polinsaturi. Confronto fra specie e fra prodotto di allevamento e prodotto raccolto in natura.

grassi saturi a media e corta catena contribuisce alla riduzione della colesterolemia con particolare riferimento alla frazione rappresentata dalle lipoproteine ematiche a bassa densità. Decisamente ridotto risulta essere anche il contenuto di acido oleico (C18:1) il cui valore medio di 12,14% è confrontabile con quello dei prodotti della pesca mentre è di gran lunga inferiore (circa 2/3 inferiore) a quello delle carni rosse. I valori di acido oleico rilevati in questo studio sono in accordo con quelli riportati da Oudejans e Van Der Horst (1974) e Stuart e coll. (1998) ove per entrambe le componenti lipidiche (polari e neutre) il contributo di tale acido risulta marginale. Fra gli acidi grassi polinsaturi i più rappresentati risultano essere l'acido linoleico (C18:2) pari a 14,65%, l'acido arachidonico (C20:4) pari a 12,51% e l'acido eicosadienoico (C20:2) pari a 10,08%. Minori, ma non trascurabili, quantità di acido eicosapentaenoico (C20:5) pari a 2,05% e di acido α -linolenico (C18:3) pari a 1,19%. L'acido linoleico sembra essere un componente di particolare rilievo nei fosfolipidi dei molluschi terrestri mentre è ridotta la sua presenza nei trigliceridi dove risultano invece più rappresentati l'acido palmitico, l'acido stearico e l'acido oleico (Oudejans e Van Der Horst, 1974). L'acido eicosadienoico, nella proporzione in cui è presente nei tessuti della chiocciola terrestre, risulta in qualche modo peculiare. La sua distribuzione nei lipidi dei suddetti animali è prevalentemente a carico dei fosfolipidi in particolare della fosfatidilcolina e della fosfatidiletanolamina (Stuart e coll., 1998) con la tendenza ad aumentare, come riportato dagli stessi autori, nella fase biologica di quiescenza estiva del mollusco. Per quanto lecito possa essere assimilare, almeno da un punto di vista metabolico, la fase di estivazione con la fase di quiescenza invernale è ragionevole aspettarsi quantitativi inferiori del suddetto acido grasso durante la fase biologica attiva del mollusco. Considerazioni analoghe possono essere ripetute anche per l'acido α -linolenico la cui quantità sembra drasticamente ridursi durante la fase di quiescenza del mollusco (Stuart e coll., 1998). L'acido arachidoni-

co è verosimilmente il composto più rappresentato nei fosfolipidi e nel caso dei tessuti della lumaca risulta presente in quantità ponderali decisamente più elevate rispetto le altre derrate di origine animale di cui l'uomo fa utilizzo. La componente $n6$ risulta perciò nettamente prevalente rispetto l' $n3$ come si può osservare in tabella 2 dove il valore medio del rapporto $n6/n3$ è pari a 9,72, valore che è sensibilmente superiore a quello che, da un punto di vista nutrizionale, viene ritenuto ottimale. A tale riguardo è tuttavia significativo quanto riportato nello studio di Stuart e coll. (1998) ove viene messo in evidenza la forte riduzione nel contenuto tissutale degli acidi grassi $n3$ nella fase di estivazione in risposta alla necessità di ridurre l'attività metabolica durante il periodo di quiescenza.

È stato inoltre effettuato un confronto intra-specifico fra lumache raccolte in natura e allevate con lo scopo di effettuare una valutazione, che qui viene riportata, di un eventuale effetto riconducibile all'allevamento confinato e/o della dieta sulla composizione in principi nutritivi della massa muscolare del piede. È nota, con particolare riferimento alle specie acquatiche, la correlazione che esiste fra il contenuto energetico della dieta e la quantità, oltre che la qualità, dei grassi di deposito. Nelle lumache in oggetto non sono state rilevate differenze significative né a carico della quantità totale di grasso né a carico della composizione in acidi grassi fra i soggetti allevati e quelli della stessa specie raccolti in natura (figure 1 e 2) (si rimanda tuttavia ad una successiva pubblicazione per un'analisi più approfondita relativamente alla variabilità intra ed inter-specifica nel contenuto in acidi grassi). Tale risultato non sorprende tenuto conto che una quota parte importante del grasso tissutale è il cosiddetto "grasso strutturale" la cui composizione è principalmente funzionale alle caratteristiche metaboliche della specie animale mentre la componente neutra, essenzialmente trigliceridi, può essere condizionata dalla qualità nonché dalla quantità del grasso della dieta. La risposta metabolica dei tessuti dei molluschi terrestri verso la componente lipidica della dieta è probabilmente più importante di quanto lo sia in altre specie correlate. A testimonianza di ciò il fatto che l'acido α -linolenico, insieme all'acido linoleico, risulta essere un componente prevalente fra i lipidi dei vegetali in foglia che a loro volta rappresentano un alimento preminente nella dieta delle lumache, mentre è presente in quantità pressoché marginale nei grassi del tessuto muscolare del mollusco (Oudejans e Van Der Horst, 1974). Dai valori riportati in tabella 2 si nota, infine, come l'acido linoleico e l'acido α -linolenico siano quelli caratterizzati dalla maggior variabilità in termini di abbondanza ponderale. È ragionevole attribuire a ciò almeno due diverse ragioni: l'effetto della specie e la diversa concentrazione dei suddetti composti nelle varietà vegetali a disposizione per l'alimentazione dei molluschi.

Conclusioni

L'indagine analitica finalizzata all'approfondimento conoscitivo delle proprietà dietetico-nutrizionali di cinque diverse specie di molluschi polmonati del genere *Helix* di interesse alimentare permette di trarre alcune considerazioni. Il contenuto in sostanza secca della parte edibile è prossimo al 20% i due-terzi del quale sono rappresentati da proteine. Il contenuto lipidico è decisamente ridotto (inferiore all'1%) fatto non sorprendente in ragione della predisposizione di tali molluschi a predilige-

re riserve energetiche tissutali in forma di polisaccaridi piuttosto che di lipidi. La quota parte costituita da acidi grassi è per quasi il 75% rappresentata da acidi grassi insaturi, tre-quarti dei quali sono polinsaturi. Da un punto di vista strettamente nutrizionale gli acidi grassi della serie $n6$ e della serie $n3$ sono fra loro in rapporto sbilanciato a favore dei primi, in cui sono significativamente rappresentati l'acido linoleico e l'acido arachidonico. Ugualmente elevata è risultata la componente in sali minerali (più del doppio del normale contenuto in ceneri delle carni dei vertebrati terrestri) per il cui approfondimento compositivo si rimanda ad una successiva pubblicazione. Differenze inter-specifiche sono state rilevate soprattutto a carico del contenuto in proteine e ceneri; il confronto intra-specifico fra prodotto d'allevamento e prodotto raccolto in natura non ha evidenziato sostanziali differenze. In conclusione il prodotto alimentare "lumaca" si distingue per un ridotto contenuto calorico conseguenza della limitata quantità di grasso di deposito nelle masse muscolari. L'apporto in acidi grassi di elevato valore nutrizionale da parte della massa muscolare del piede è ragguardevole.

Parole chiave: molluschi terrestri, valore dietetico-nutrizionale, composizione centesimale, acidi grassi.

Key words: terrestrial snails, nutritional value, proximate composition, fatty acids.

RIASSUNTO - È stato effettuato uno studio comparativo sotto il profilo della composizione centesimale e della composizione in acidi grassi della parte edibile delle principali specie di chioccioline di interesse gastronomico in Italia (*H. pomatia*, *H. aspersa*, *H. lucorum*, *H. aperta*, *H. vermiculata*). Sono stati analizzati soggetti opercolati raccolti durante la fase di quiescenza invernale. La provenienza dei molluschi era, da un punto di vista geografico, variegata; sono stati inclusi nello studio anche soggetti provenienti da allevamento. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza differenze nel contenuto in proteine e sali minerali soprattutto legate alla specie animale; *H. lucorum* aveva il contenuto proteico sul tal quale più elevato mentre *H. vermiculata* presentava il maggior contenuto in cenere. L'analisi della composizione in acidi grassi ha rivelato una ridotta presenza di acidi grassi saturi (mediamente inferiore al 25%) ed un elevato contenuto in polinsaturi soprattutto acido linoleico e acido arachidonico. Il confronto intra-specifico fra prodotto allevato e prodotto raccolto in natura non ha evidenziato sostanziali differenze né nella composizione centesimale né nella composizione in acidi grassi.

SUMMARY - A comparative study aimed to evaluate proximate composition and the composition in fatty acids of the edible part of some of the most consumed species of terrestrial snails in Italy (*H. pomatia*, *H. aspersa*, *H. lucorum*, *H. aperta*, *H. vermiculata*) has been carried out. Samples submitted to analysis were those collected during the phase of winter dormancy from different areas of Italy; samples reared in arranged breeding were also included in the study.

Results obtained showed differences in the proteins and ash content probably due to the animal species origin; *H. lucorum* and *H. vermiculata* contains respectively the highest protein content and ash content on fresh matter. The analysis of fatty acids composition has revealed a reduced content in saturated compounds (less than 25%)

and an high content in polyunsaturated fatty acids principally linoleic acid and arachidonic acid.

An intra-specific comparison between wild collected samples and breeding samples did not put in evidence differences neither in proximate composition nor in fatty acids composition.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano l'Istituto Internazionale di Elicicoltura e i soci dell'Associazione Nazionale Elicicoltori per aver collaborato al reperimento dei campioni di chioccioline.

Bibliografia

Folch J., Lees M. e Stanley G.H.s. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497.

Gomot A. (1998) Biochemical composition of Helix snails: influence of genetic and physiological factors. *Journal of Molluscan Studies*, **64**, 173.

Oudejans R.C.H.M. e Van der Horst D.J. (1974) Effect of excessive fatty acid ingestion upon composition of neutral lipids and phospholipids of snail *Helix pomatia* L. *Lipids*, **9** (10), 798.

Stuart J.A., Gillis T.E. e Ballantyne J.S. (1998) Remodeling of phospholipid fatty acids in mitochondrial membranes of estivating snails. *Lipids*, **33** (8), 787.

ESAME DEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO: STUDIO RETROSPETTIVO SU 65 CANI (2001-2002)

Callegari D.¹, Bianchi E.¹, De Risio L.²

INTRODUZIONE

Il liquido cefalorachidiano (LCR) è un fluido trasparente che permea tutto il sistema nervoso centrale (SNC) e lo mantiene in sospensione, proteggendolo, nutrendolo e contribuendo alla regolazione della pressione intracranica. Prodotto a partire dal plasma, principalmente a livello del plesso coroideo nel sistema ventricolare dell'encefalo, circola attraverso i ventricoli encefalici fino a passare nello spazio subaracnoideo attraverso le aperture laterali del quarto ventricolo, da qui filtra tra la pia madre e l'aracnoide dell'encefalo e del midollo spinale (**1, 2**).

Fluisce principalmente in direzione caudale e viene assorbito per la maggior parte dai villi aracnoidei nel seno sagittale dorsale ed in minima parte da piccoli vasi sospesi nello spazio sub-aracnoideo e dai linfatici dei nervi cranici e dei nervi spinali. Alterazioni delle meningi e del tessuto nervoso in prossimità della superficie a contatto con il liquido cefalorachidiano si riflettono in modificazioni della composizione del liquido stesso (**1, 2**).

L'analisi del liquor è il più affidabile mezzo diagnostico per identificare e classificare le patologie infiammatorie del sistema nervoso centrale; è, inoltre, indicata in caso di sospetto di alterazioni neoplastiche o degenerative nella stessa sede (**3, 4, 5**).

MATERIALI E METODI:

E' stato inserito nel presente studio l'esito dell'esame del LCR di 65 cani di età compresa tra i 4 mesi ed i 16 anni, di cui 39 maschi e 26 femmine, analizzato presso la Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Salute Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma. Di tali pazienti 18 erano meticci, 8 Boxer, 6 Pastori tedeschi, 4 Rottweiler, 3 Dalmata, 3 Bassotti, 3 Spinoni, 3 Barboni, 2 Shih-tzu, 2 Teranova, 2 Husky e 11 appartenenti ad altre razze (Vedi Tabella 1). Le patologie erano le seguenti: lesioni spinali di natura compressiva, traumatica o vascolare (protrusioni o estrusioni discali, neoplasie extradurali, lussazioni o sublussazioni, emboli fibrocartilaginei) (37 cani) (Vedi Tabella 3), meningo-encefalo-mieliti di varia origine (meningo-encefalite virale, meningo-encefalite sensibile ai corticosteroidi, menin-

¹ Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Clinica Medica Veterinaria – Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma

² Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria – Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma

goencefalite granulomatosa, meningo-mielite e meningo-encefalite di eziologia sconosciuta (12 cani) (Vedi Tabella 4), neoplasia del sistema nervoso centrale e periferico (9 cani) (Vedi Tabella 5), mielopatia degenerativa (2 cani) (Vedi Tabella 6), abiotrofia cerebellare (2 cani) (Vedi Tabella 6), epilessia di origine sconosciuta (1 cane) (Vedi Tabella 6), patologia vascolare a carico del tronco encefalico (1 cane) (Vedi Tabella 6), sospetta distrofia neuro-assonale del Rottweiler (1 cane) (Vedi Tabella 6).

Il LCR è stato prelevato dalla cisterna magna (45 cani), a livello lombare (16 cani), o da entrambe le sedi (5 cani). Di ognuno di questi cani, quando è stato possibile, è stato eseguito un esame del LCR standard. Vista la fragilità delle cellule del LCR, la citologia è stata effettuata solo quando il campione è pervenuto in laboratorio entro 40 minuti dal prelievo (**3, 4, 6, 7**) o quando al campione è stato aggiunto del siero omologo, procedura che è stata dimostrata aumentare la conservabilità di queste cellule (**8**). In alcuni casi non è stato possibile valutare tutti i parametri biochimici necessari perché la quantità di campione era insufficiente.

Nel LCR di 42 cani, oltre alle indagini standard, è stata eseguita la focalizzazione isoelettrica (IEF), tecnica di recente applicazione in medicina veterinaria ma già consolidata in medicina umana che permette di riconoscere la sintesi intratecale di IgG (**9, 10, 11**).

#	RAZZA	ETA'	SESSO
1	Meticcio	3 A	M
2	Rottweiler	10 A	M
3	Dobermann	9 A	F
4	Boxer	5 A	M
5	Dalmata	11 A	M
6	Shih-tzu	5 A	F
7	Meticcio	8 M	M
8	Pastore tedesco	2 A	F
9	Meticcio	14 A	F
10	Boxer	10 M	F
11	Pastore tedesco	6 A	M
12	Pastore tedesco	7 A	M
13	Spinone italiano	10 M	M
14	Spinone italiano	10 M	M
15	Meticcio	8 A	M
16	Meticcio	4 A	F
17	Boxer	4 A	F
18	Terranova	7 A	M
19	Terranova	13 M	M
20	Meticcio	9 A	M
21	Siberian husky	3 A	M
22	Bassotto	6 A	M
23	Shih-tzu	4 A	F
24	Bovaro bernese	3 A	F
25	Pastore tedesco	9 A	M
26	Labrador	6 ½ A	M
27	Meticcio	8 A	M
28	Rottweiler	6 A	M
29	Meticcio	6 A	F
30	Meticcio	16 A	F
31	Dalmata	7 A	F
32	Pointer	6 A	F
33	Bichon frisè	5 A	M

#	RAZZA	ETA'	SESSO
34	Meticcio	3 A	M
35	Bassotto	6 A	F
36	Boxer	10 A	F
37	Meticcio	4 A	M
38	Boxer	2 A	F
39	Rottweiler	10 A	F
40	Meticcio	4 A	M
41	Spinone	8 A	F
42	Pastore tedesco	12 A	M
43	Meticcio	7 A	M
44	Barbone	8 A	M
45	Dalmata	11 A	F
46	Meticcio	5 A	F
47	Meticcio	4 M	M
48	Springer spaniel	14 A	M
49	Bassotto	6 A	M
50	Meticcio	12 A	F
51	Boxer	4 M	M
52	Siberian husky	5 A	F
53	Pastore tedesco	8 A	M
54	Whippet	2 A	F
55	Barbone nano	7 A	F
56	Yorkshire	1 ½ A	F
57	S. Bernardo	10 A	M
58	Pinscher	4 A	M
59	Boxer	12 M	M
60	Meticcio	A M	M
61	Boxer	6 A	F
62	Meticcio	4 A	M
63	Carlino	6 M	M
64	Rottweiler	1 A	M
65	Barbone medio	5 A	M

Tabella 1: segnalamento dei pazienti inseriti nello studio.

Esame standard:

L'esame standard è costituito da un'analisi fisica, un'analisi citologica ed infine un'analisi chimica.

L'**analisi fisica** è stata eseguita osservando il campione stesso contenuto in una provetta di vetro su di una superficie bianca, come un foglio di carta. In condizioni normali il liquor si presenta incolore, limpido, simile ad acqua distillata. In presenza di un LCR da giallo a rosso (xantocromico), per differenziare una contaminazione ematica al momento del prelievo da un'emorragia sub-aracnoidea recente, è stato valutato il campione dopo centrifugazione. La presenza di un surnatante limpido e di emazie sul fondo della provetta indicano una contaminazione ematica (**1, 4**).

Su ogni campione, inoltre, è stato calcolato il peso specifico mediante refrattometro (**1**).

L'**analisi citologica** è stata effettuata entro 40 minuti dal prelievo. In alcuni casi una parte del LCR è stata inviata refrigerata previa aggiunta di 11% di siero omologo; questo metodo si è rivelato efficace per conservare le cellule fino a 24 ore per cui in questi casi la citologia è stata eseguita anche se il campione è pervenuto in laboratorio il giorno successivo al momento del prelievo (**8**).

La conta cellulare è stata effettuata mediante camera di *Fuchs-Rosenthal*. La formula cellulare è stata eseguita allestendo un vetrino con le cellule depositate sul fondo della provetta dopo centrifugazione a basso numero di giri (1200 giri/min. per 10 min.). Questa metodica, infatti, si è dimostrata più efficace rispetto all'utilizzo dei vari tipi di camere di sedimentazione (**1, 4, 7**).

Per quanto riguarda l'**analisi chimica** sono state valutate le proteine totali mediante Cobas Mira Plus della Roche (reagente Microprotein – PR Sigma Diagnostic) (**12**) e la glicorrachia (quantità di glucosio presente nel LCR) mediante Cobas Mira Plus della Roche (reagente Roche), calcolando poi la percentuale di glucosio rispetto a quella sierica (**1**).

Focalizzazione isoelettrica:

La IEF è stata applicata su piastre di gel di agarosio (agarose for IEF, PHARMACIA) su 3.5 µl di LCR non concentrato e 3.5 µl di siero diluito (1/380) di ogni cane. I campioni di LCR e di siero sono stati fatti migrare per 1 ora a 1000 volt e 15 Watt. Alla fine della migrazione le molecole sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Hybond C from Amersham), quindi tale membrana è stata trattata con albumina bovina 3% (SIGMA) per 30 minuti. Le IgG, infine, sono state evidenziate mediante l'utilizzo di due anticorpi (Goat anti-dog e rabbit anti-goat-HRP) e aminoethyl-carbamide (AEC from SIGMA) come substrato. Il pH delle anfoline andava da 3.0 a 10.5 (Pharmalyte from Pharmacia) (**9**).

La IEF permette di rilevare la presenza di IgG di sintesi intratecale, ovvero bande oligoclonali di IgG che sono presenti nel LCR, ma non nel siero (**13, 14, 15, 16**).

Valori di riferimento:

I valori normali sono riportati nella tabella 2.

ASPETTO	Limpo ed incolore
PESO SPECIFICO	1.004-1.006
GLOBULI ROSSI/mm ³	0-5
GLOBULI BIANCHI/ mm ³	< 8
FORMULA LEUCOCITARIA	Prevalenza di linfomononucleati. Basso numero di: neutrofili non degenerati, eosinofili, plasmacellule, cellule delle leptomeningi, del plesso corioideo, cellule ependimali.
PROTEINE (mg/dL)	Cisterna magna: ≤ 20 Cisterna lombare: ≤ 30
GLICORRACHIA	60-80% della glicemia
IEF	Assenza di sintesi intratecale di IgG

Tabella 2: caratteristiche fisiologiche del liquido cefalorachidiano nel cane (1, 4, 7, 12).

RISULTATI E DISCUSSIONE:

Nelle **patologie spinali compressive, traumatiche o vascolari** l'alterazione più frequentemente riscontrata all'esame del LCR è stata un aumento delle proteine totali. Questo può essere dovuto alla distruzione di piccoli vasi sanguigni (in questo caso si spiega anche la xantocromia presente in alcuni casi), all'interruzione del flusso o dell'assorbimento del LCR o alla necrosi tissutale (3, 12). In molti casi è stato rilevato anche un aumento della glicorrachia relativa, verosimilmente secondaria al danno tissutale che provoca liberazione di glucosio di cui le cellule nervose sono molto ricche (1). In alcuni casi è stata riscontrata una lieve pleocitosi neutrofila. Quest'ultima, pur essendo infrequente nelle patologie spinali compressivo/traumatiche, è stata riportata in letteratura (3). L'analisi del LCR del paziente # 23 è stata considerata non attendibile, in quanto il liquor era troppo contaminato. Infatti, quando gli eritrociti risultano superiori a 10.000 cellule/mm³ si preferisce ripetere il prelievo (2).

Nei pazienti con **meningo-encefalite sensibile ai corticosteroidi (SRM)**, in accordo con quanto riportato in letteratura, sono state riscontrate notevole xantocromia, marcata pleocitosi neutrofila e aumento delle proteine totali (3, 12, 17, 18, 19). La IEF non ha rilevato la presenza di IgG di sintesi intratecale, dimostrata in precedenza nella maggior parte dei casi valutati mediante IgG index (20, 21). Tuttavia, essendo la IEF una tecnica di recente introduzione, impiegata in 3 soli pazienti affetti da tale patologia, è necessario valutare una casistica più ampia per avere dati più significativi.

Nella **meningo-encefalite granulomatosa**, in accordo con quanto riportato in letteratura, il LCR è risultato xantocromico, con marcata pleocitosi linfo-mononucleata e aumento delle proteine totali (3, 17, 22, 23). La IEF ha rilevato la presenza di IgG di sintesi intratecale. Queste ultime sono state riscontrate in precedenza (mediante IgG index) in soggetti affetti da questa stessa patologia (20).

Nella **meningo-encefalite virale** abbiamo riscontrato una moderata pleocitosi mononucleata in un paziente, una pleocitosi neutrofila in un altro caso e cellularità normale nei soggetti rimanenti. Altri autori hanno riportato una modesta pleocitosi, che comunque non supera le 50 cellule/mm³, con prevalenza di linfociti, ma è comunque possibile una pleocitosi neutrofila che, tuttavia, in genere non supera il

50% di neutrofili (**3, 17, 23**). Nella nostra casistica, le proteine totali erano aumentate soltanto in due pazienti, di cui uno presentava IgG di sintesi intratecale (IEF). Nelle meningo-encefaliti virali si ritiene che le proteine totali risultino solitamente da mediamente a notevolmente aumentate, questo accade in particolare quando vi è produzione intratecale di IgG (**12**). E' stato riportato, anche, che non sempre si verifica produzione intratecale di immunoglobuline, soprattutto nei cani immaturi che possono non essere ancora in grado di produrre una adeguata risposta immunitaria all'infezione e che anche nelle forme acute l'IgG Index in genere non sia aumentato (**17, 20**). Questo potrebbe spiegare perché in tutte le forme acute ed anche in una forma cronica la IEF è risultata negativa. Inoltre, in uno dei nostri casi la glicorrachia relativa era aumentata.

Nei soggetti con **neoplasia** del SNC e SNP l'alterazione più comunemente riscontrata è stata un aumento delle proteine totali; questo può essere dovuto a necrosi tissutale locale o a passaggio nel LCR di proteine sieriche in seguito ad un danno della barriera emato-encefalica (**3**). In alcuni soggetti è stata rilevata pleocitosi che in un solo caso è stata neutrofila; questo fenomeno può essere prodotto dalla necrosi associata alla neoplasia ed è marcato in caso di meningioma. Molto difficile è invece l'individuazione di cellule neoplastiche nel LCR (**3, 24**). Un'altra alterazione frequente in questo tipo di patologia è un aumento della glicorrachia relativa (**1**). La IEF non ha rilevato presenza di IgG di sintesi intratecale in nessun paziente affetto da neoplasia del SNC.

Nei cani affetti da **mielopatia degenerativa** l'unica alterazione riportata in letteratura è un lieve aumento delle proteine totali (**25**). I valori riscontrati nel presente studio concordano con questo dato. Inoltre, in entrambi i pazienti la IEF ha rilevato la presenza di IgG di sintesi intratecale. Quest'ultima non è mai stata riportata in soggetti con mielopatia degenerativa. Comunque, l'eziopatogenesi di questa malattia non è ancora nota e la presenza di IgG di sintesi intratecale confermerebbe l'ipotesi riportata da alcuni autori di una patogenesi di tipo immunomediato, simile a quella della sclerosi multipla (**25, 26, 27, 28**). Ovviamente non è possibile con i soli due casi da noi analizzati chiarire la validità di questa tecnica diagnostica. In un caso, inoltre, abbiamo riscontrato un aumento della glicorrachia relativa ma questo potrebbe essere un reperto occasionale.

Nella **abiotrofia cerebellare** il LCR è risultato perfettamente normale, come riportato in letteratura, (**29**) fatta eccezione per un lieve aumento della conta leucocitaria in uno dei due pazienti.

Il LCR del **paziente epilettico** ha mostrato un lieve aumento delle proteine totali e IEF positiva, questo può far pensare che tale epilessia fosse dovuta ad una forma virale pregressa, ma non è stato possibile effettuare ulteriori accertamenti.

Il LCR del paziente con sospetta **patologia vascolare del tronco encefalico** era notevolmente xantocromico, con elevato numero di globuli rossi e moderata pleocitosi neutrofila; questi dati concordano con quanto riportato da Altri Autori per questo tipo di patologia (**2, 30**).

Il LCR del paziente con sospetta **distrofia neuro-assonale del rottweiler** era nella norma come riportato in letteratura (**31, 32**).

#	ASPETTO	GB/mm ³	FORMULA leucocitaria	PT (mg/dL)	GLUCOSIO	IEF	DIAGNOSI
22	limpido	//	//	C.m.: 19	//	-	H I
23	xantocromico per forte contam. ematica (> 10.000 g.r.)	543	10% p.m., 2% g.m., 88% n.	C.m.: 368	99%	-	H I
27	limpido	2	75% p.m., 25% g.m.	C.l.: 95.69	//	-	H I
35	limpido	1	57% p.m., 42% g.m.	C.m.: 9.14	93%	-	H I
37	limpido	//	//	C.l.: 122	73%	//	H I
41	limpido	4	72% p.m., 18% g.m., 10% n.	C.m.: 19.68	76%	//	H I
43	limpido	1	67% p.m., 25% g.m., 8% n.	C.l.: 79.21	97%	//	H I
46	limpido	4	82% p.m., 18% g.m.	C.l.: 19.71	//	//	H I
49	limpido	3	89% p.m., 11% g.m.	C.l.: 181.40	//	//	H I
55	limpido	1	75% p.m., 25% g.m.	C.m.: 12.55	65%	//	H I
61	limpido	1	100% p.m.	//	//	//	H I
65	limpido	4	100% p.m.	C.m.: 59.25	78%	//	H I
6	limpido	5	85% p.m., 11% g.m., 4% n.	C.l.: 56.7	//	-	H II
11	limpido	//	//	C.m.: 23	//	-	H II
26	limpido	2	81% p.m., 18% g.m., 1% n.	C.m.: 28.06	67%	-	H II
57	limpido	3	63% p.m., 33% g.m., 4% n.	C.l.: 71.71	87%	//	H II
62	xantocromico per contam. ematica	4	84% p.m., 12% g.m., 4% n.	C.l.: 33.60	65%	//	H I
5	limpido	3	80% p.m., 20% g.m.	C.m.: 29.64	120%	-	H I e II
30	limpido	//	//	C.m.: 25.20	//	-	H I e II
18	limpido	1	75% p.m., 23% g.m., 2% n.	C.m.: 36.48	67%	//	Compr. dinam. cervicale
21	limpido	//	//	//	//	-	Stenosi LS
8	limpido	//	//	C.m.: 71	//	-	lussazione
60	xantocromico	2	71% p.m., 29% g.m.	C.m.: 51.78 C.l.: > 200	//	//	lussazione
15	limpido	9	100% p.m.	C.m.: 20.59	97%	-	sublussazione
54	limpido	4	90% p.m., 10% g.m.	C.m.: 18.24	77%	//	sublussazione
64	xantocromico per contam. ematica	10	27% p.m., 10% g.m., 62% n.	C.l.: 52.14	92%	//	sublussazione
33	xantocromico	8	55% p.m., 45% g.m.	C.m.: 14.01	97%	-	H I traumatica
34	xantocromico	14	73% p.m., 18% g.m., 9% n.	C.l.: 44.92	//	//	Trauma con lacerazione dei seni venosi
40	xantocromico	74	42% p.m., 31% g.m., 27% n.	C.m.: 43	//	-	Frattura vertebrale
28	limpido	3	97% p.m., 3% g.m.	C.l.: 42.81	81%	-	FCE
38	xantocromico	//	//	C.l.: 275	72%	//	FCE
52	limpido	3	80% p.m., 20% g.m.	C.m.: 24.45	//	//	FCE
2	limpido	3	70% p.m., 30% g.m.	C.m.: 56 C.l.: 596	63%	-	Compressione extradurale
3	limpido	5	90% p.m., 10% g.m.	C.m.: 157 C.l.: 83	72%	-	Compressione extradurale
17	limpido	6	81% p.m., 19% g.m.	C.m.: 17.01	76%	-	Compressione extradurale
24	limpido	2	100% p.m.	C.m.: 13.08	//	-	Compressione extradurale
25	limpido	1	100% p.m.	C.m.: 14.01	72%	-	Compressione extradurale

Tabella 3: risultati dell'esame del LCR dei pazienti affetti da lesioni compressive, traumatiche o vascolari della colonna.

GB = globuli bianchi, PT = proteine totali, p.m. = piccoli mononucleati, g.m. = grandi mononucleati, C.m. = cisterna magna, C.l. = cisterna lombare, H I = hansen di tipo I, H II = hansen di tipo II, LS = lombo-sacrale, n. = neutrofilo, // = non eseguita, IEF - = assenza di IgG di sintesi intratecale, g.r. = globuli rossi, FCE = embolo fibrocartilagineo.

#	ASPETTO	GB/mm ³	FORMULA leucocitaria	PT (mg/dL)	GLUCOSIO	IEF	DIAGNOSI
4	xantocromico	770	32% p.m., 35% g.m., 33% n.	C.m.: 143	//	-	SRM
10	xantocromico	5.354	15% p.m., 3% g.m., 82% n.	C.m.: 242.34	74%	-	SRM
49	xantocromico	4.266	17% p.m., 29% g.m., 54% n.	C.m.: 800	57%	-	SRM
4	xantocromico	515	49% p.m., 48% g.m., 3% n.	C.l.: 170.34	//	+	GME
44	xantocromico	28	59% p.m., 32% g.m., 9% n.	C.m.: 66.34	100%	//	MM di eziologia sconosciuta
53	xantocromico	46	14% p.m., 6% g.m., 80% n.	C.m.: 67.73	86%	-	ME di eziologia sconosciuta
1	limpido	21	5% p.m., 95% g.m.	C.m.: 85	//	+	ME virale cronica
48	limpido	6	100% p.m.	C.m.: 11.18	64%	-	ME virale cronica
7	xantocromico	58	76% p.m., 4% g.m., 20% n.	C.m.: 45	100%	-	ME virale acuta
19	limpido	//	//	C.m.: 14	//	-	ME virale acuta
47	limpido	//	//	C.l.: 15.19	//	-	ME virale acuta
51	limpido	4	100%	C.m.: 11.92	//	//	ME virale acuta

Tabella 4: risultati dell'esame del LCR dei pazienti affetti da meningo-encefalo-mielite di varia origine.

GB = globuli bianchi, PT = proteine totali, g.r. = globuli rossi, p.m. = piccoli mononucleati, g.m. = grandi mononucleati, n. = neutrofilo, C.m. = cisterna magna, // = non eseguita, SRM = meningoencefalite sensibile ai corticosteroidi, C.l. = cisterna lombare, GME = meningoencefalite granulomatosa, MM = meningo-mielite, ME = meningoencefalite, IEF - = assenza di sintesi intratecale di IgG, IEF + = presenza di sintesi intratecale di IgG.

#	ASPETTO	GB/mm ³	FORMULA leucocitaria	PT (mg/dL)	GLUCOSIO	IEF	DIAGNOSI
31	limpido	//	//	C.m.: 48	//	-	Neoplasia di L5
32	limpido	1	77% p.m., 22% g.m., 1% n.	C.m.: 43.95 C.l.: 67.13	79%	-	NST (plesso brachiale)
36	limpido	//	//	C.l.: 101	//	-	Neoplasia midollare
9	xantocromico per contam. ematica	31	//	C.m.: 259	74%	-	Neoplasia cerebrale
16	limpido	3	63% p.m., 25% g.m., 12% n.	C.m.: 75.83	71%	-	Neoplasia cerebrale
29	limpido	2	86% p.m., 11% g.m., 3% n.	C.m.: 21.18	96%	-	Neoplasia cerebrale (corteccia)
38	limpido	13	92% p.m., 8% g.m.	C.m.: 30.63	120%	-	Neoplasia cerebrale
43	limpido	4	31% p.m., 67% g.m., 2% n.	C.m.: 62.08	93%	//	Metastasi encefaliche
50	limpido	18	24% p.m., 76% g.m.	C.m.: 11.70	//	//	Neoplasia cerebrale

Tabella 5: risultati dell'esame del LCR dei pazienti con neoplasie del sistema nervoso centrale e periferico.

GB = globuli bianchi, PT = proteine totali, // = non eseguita, C.m. = cisterna magna, p.m. = piccoli mononucleati, g.m. = grandi mononucleati, n. = neutrofilo, C.l. = cisterna lombare, NST = nerve sheath tumor (neoplasia delle radici nervose).

#	ASPETTO	GB/mm ³	FORMULA leucocitaria	PT (mg/dL)	GLUCOSIO	IEF	DIAGNOSI
12	limpido	4	89% p.m., 11% g.m.	C.l.: 32.88	94%	+	Mielopatia degenerativa
42	limpido	2	78% p.m., 22% g.m.	C.l.: 34	62%	+	Mielopatia degenerativa
13	limpido	6	86% p.m., 14% g.m.	C.m.: 18.79	76%	-	Abiotrofia cerebellare
14	limpido	11	86% p.m., 14% g.m.	C.m.: 19.56	74%	-	Abiotrofia cerebellare
20	limpido	//	//	C.m.: 25	//	+	Epilessia per causa sconosciuta
56	xantocromico	40 (20.000 g.r.)	33% p.m., 3% g.m., 64% n.	C.m.: > 5000	//	//	Sospetta patologia vascolare del tronco encefalico
63	limpido	1	88% p.m., 11% g.m., 1% n.	C.m.: 18.4	74%	//	Sospetta NAD del rottweiler

Tabella 6: risultati dell'esame del LCR dei pazienti affetti da mielopatia degenerativa, abiotrofia cerebellare, epilessia di origine sconosciuta, patologia vascolare del tronco encefalico, distrofia neuro-assonale del rottweiler.

GB = globuli bianchi, PT = proteine totali, // = non eseguita, C.m. = cisterna magna, p.m. = piccoli mononucleati, g.m. = grandi mononucleati, n. = neutrofilo, C.l. = cisterna lombare, NAD = distrofia neuro-assonale.

CONCLUSIONI:

L'utilità dell'esame del LCR nella diagnosi di numerose patologie neurologiche è comprovata da una ricca letteratura. L'analisi del LCR è addirittura indispensabile nella diagnosi delle patologie infiammatorie e infettive del SNC in quanto ci permette non solo di diagnosticare la presenza di una meningite ma anche di chiarirne l'eziologia. Grandi progressi in tal senso sono stati effettuati negli ultimi anni e di recente sono stati iniziati ulteriori studi per quanto riguarda le frazioni proteiche ed in particolare le IgG. Molto promettente in tal senso sembra la IEF e soprattutto il suo impiego nella diagnosi della mielopatia degenerativa.

Parole chiave: cane, liquido cefalorachidiano, LCR, neurologia, focalizzazione isoelettrica, IEF, IgG.

Key words: dog, cerebrospinal fluid, CSF, neurology, isoelectric focusing, IEF, IgG.

RIASSUNTO - Per questo studio è stato analizzato il LCR di 65 cani affetti da diverse patologie neurologiche di varia natura (degenerative, traumatiche, infiammatorie/infettive, neoplastiche, vascolari, etc.). Sono stati valutati l'aspetto, le alterazioni citologiche (conta e formula leucocitaria) e biochimiche (proteine totali e glicorrahchia relativa) e l'eventuale presenza di IgG di sintesi intratecale. I risultati ottenuti confermano l'utilità dell'esame del LCR nella diagnosi di numerose patologie neurologiche. Molto promettenti, inoltre, sembrano gli studi sull'impiego dell'IEF nella diagnosi della mielopatia degenerativa.

SUMMARY - CSF analysis of 65 dogs with different neurological diseases (degenerative, traumatic, infectious/ inflammatory, neoplastic, vascular, etc) was per-

med. Gross examination, alterations of cytology (differential white cell counts) and biochemistry (total protein and relative glycochachia), and the presence of IgG of intrathecal synthesis were evaluated. Our results confirm the utility of CSF analysis in the diagnosis of several neurological diseases. Furthermore, the study on the use of IEF in the diagnosis of degenerative myelopathy shows promising results.

BIBLIOGRAFIA:

1. **Cook J.R., DeNicola D.B.** (1988) - Cerebrospinal Fluid. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 18(3), 475-499.
2. **De Lahunta A.** (1983) – Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology**, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 30-52.
3. **Chrisman C. L.** (1992) - Cerebrospinal Fluid Analysis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 22(4), 781-810.
4. **Chrisman C. L.** (1991) – Special ancillary investigation. **Problems in Small Animal Neurology**. Lea & Febiger, Philadelphia, 81-115.
5. **Callegari D., Bianchi E.** (2001) – Utilità diagnostica dell'esame del liquido cefalorachidiano nel cane. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria. Università di Parma**. Vol. XXI 2001, 343-356.
6. **Cowell R. L., Tyler R.D., Meinkoth J. H.** (1999) - Cerebrospinal Fluid Analysis. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**, Mosby, 125-142.
7. **Grevel V., Machus B.** (1990) - Diagnosing Brain Tumors with a CSF Sedimentation Technique. **Veterinary Medicine Report**, (2), 403-408.
8. **McDonnell J. J., Platt S. R., Stanton J. B., Bienzle D.** (2000) – Cerebrospinal fluid analysis from dogs and cats after 24 e 48 hours of storage. **ACVIM ABSTRACTS 2000**, 762.
9. **Callegari D., De Risio L., Bianchi E., Martelli P., Cogato I.** (2002) – Dogs Cerebrospinal Fluid: Total Protein Concentrations and IgG Isoelectrofocusing (IEF) Patterns. **WSAVA – FECAVA – AVEPA Congress 2002**, Free Communications Book, 238.
10. **Andersson M., Alvarez-Cermeño J., Bernardi G., Cogato I., Fredman P., Frederiksen J., Fredrikson S., Gallo P., Grimaldi L. M., Grønning M., Keir G., Lamers K., Link H., Magalhães A., Massaro A. R., Öhman S., Reiber H., Rönnbäck L., Schluep M., Schuller E., Sindic C. J. M., Thompson E. J., Trojano M., Wurster U.** (1994) – Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, 57, 897-902.
11. **J. Lunding, R. Midgard, C.A. Velder** (2000) – Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. **Acta Neurologica Scandinava**, 102: 322-325
12. **Coates J. R.** (2000) - Cerebrospinal Proteins. In: **Schalm's Veterinary Hematology**, Lippincott Williams & Wilkins.

13. **J. Lunding, R. Midgard, C.A. Velder** (2000) – Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. **Acta Neurologica Scandinava**, 102: 322-325.
14. **Marchetti P., Gutierrez J., Velia P., Faucompre J.L., Onraed B, Formstecher P., Hennache B.** (1999) – Identification of IgG-specific oligoclonal banding in serum and cerebrospinal fluid by isoelectric focusing: description of a simplified method for the diagnosis of neurological disorders. **Clin Chem Lab Med.** 37:7, 735-758.
15. **Paolino E., Granieri E., Tola M.R., Govoni V., Casetta I., Monetti V.C., Carreras M.** (1990)- The combined use of instrumental and laboratory examinations in multiple sclerosis: is the diagnostic facilitation real? **Riv. Neurol**, 60:2, 73-81.
16. **Sellebjerg F., Christiansen M., Rasmussen L.S., Jaliachivili I., Nielsen P.M., Fredriksen J.L.** (1996) - The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. Quantitative assessment of intrathecal immunoglobulin synthesis by empirical formulae. **Eur J Neurol**, 3: 548-559.
17. **Munana K. R.** (1996) – Encephalitis and Meningitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 4 (26), 857-874.
18. **Cauzinille L** (1999) - Sindrome meningo-encefalo-mielitica non infettiva dei carnivori domestici. **SUMMA**, (7), 9-14.
19. **Hess P. R., Sellon R. K.** (1997) – Steroid-Responsive, Cervical, Pyogranulomatous Pachymeningitis in a Dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 33, 461-468.
20. **Tipold a., Pfister H. Zurbriggen A., Vandeveld M.** (1994) – Intrathecal synthesis of major immunoglobulin classes in inflammatory disease of the canine CNS. **Veterinary Immunology and immunopathology**, 42, 149-159.
21. **Tipold A., Vandeveld M., Zurbriggen A.** (1995) – Neuroimmunological studies in steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs. **Research in Veterinary Science**, 58, 103-108.
22. **Bailey C. S., Higgins R. J.** (1986) – Characteristic of cerebrospinal fluid associated with canine granulomatous meningoencephalomyelitis: a retrospective study. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 4 (188), 418-421.
23. **Sarfaty D., Carrillo J. M., Greenlee P. G.** (1986) – Differential diagnosis of granulomatous meningoencephalomyelitis, distemper, and suppurative meningoencephalitis in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 4 (188), 387-392.
24. **Bailey C. S., Higgins R. J.** (1986) - Characteristics of cisternal cerebrospinal fluid associated with primary brain tumors in the dog: A retrospective study. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 188(4), 414-417.
25. **Clemmons R. M.** (1989) – Degenerative Myelopathy, **In Kirk RW (ed.): Current Veterinary Therapy. X. Small Animal Practice.** Philadelphia, WB Saunder Co, 830-833.
26. **Barclay K.B., Haines D.M.** (1994) – Immunohistochemical Evidence for Immu-

noglobulin and Complement Deposition in Spinal Cord Lesions in Degenerative Myelopathy in German Shepherd Dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research** 58: 20-24.

27. **Waxman F.J., Clemmons R.M., Johnson G., et al** (1980) - Progressive myelopathy in older German shepherd dogs. I. Depressed response to thymus-dependent mitogens. **J Immunol**; 124, 1216-1222.

28. **Waxman F.J., Clemmons R.M., Hinrichs D.J.** (1980) - Progressive myelopathy in older German shepherd dogs. II. Presence of circulating suppressor cells. **J Immunol**; 124, 1209-1215.

29. **Chrisman C. L.** (1991) – Ataxia of the head and limbs. **Problems in Small Animal Neurology**. Lea & Febiger, Philadelphia, 319-334.

30. **Oliver J. E., Lorenz M. D., Kornegay J. N.** (1997) - **Handbook of Veterinary Neurology**, W. B. Saunders Company, Philadelphia.

31. **Chrisman C. L.** (1992) – Neurological disease of rottweiler: Neuroaxonal dystrophy and leukoencephalomalacia. **Journal of Small Animal Practice**, 33, 500-504.

32. **Braund K.G.** (2003) - Clinical Neurology in Small Animals - Localization, Diagnosis and Treatment, International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), B0200.0103.

STUDI DI CONDUZIONE NERVOSA MOTORIA, POTENZIALI EVOCATI ACUSTICI DEL TRONCO ENCEFALICO, BLINK REFLEX TEST: VALORI NORMALI NEL CANE.

E. Bianchi¹, D. Callegari¹, M. Dondi¹

INTRODUZIONE

L'applicazione delle tecniche elettrodiagnostiche nella neurologia dei piccoli animali ha trovato uno spazio sempre maggiore dall'inizio degli anni 70, quando questi test furono introdotti nella pratica clinica, fino ad oggi (1). Le informazioni obiettive che i test elettrodiagnostici forniscono sulla funzionalità nervosa e muscolare, e la loro scarsa invasività, rendono queste tecniche d'indagine in molti casi insostituibili. Rappresentano, infatti, un ausilio importante per il neurologo sia nella diagnosi che nel monitoraggio della risposta alla terapia in molte patologie neurologiche e neuromuscolari.

Limiti indiscutibili all'impiego di questi esami collaterali sono rappresentati dai loro elevati costi, derivanti dal prezzo delle attrezzature e dalla necessità di un personale altamente specializzato, e dalla mancanza di uniformità nell'esecuzione ed interpretazione di questi test tra i diversi laboratori di elettrodiagnostica. E' necessario quindi che ogni centro di riferimento per la neurologia, dotato di attrezzature per l'elettrodiagnostica, determini dei propri intervalli di normalità per ciascun esame, modulati sulle diverse variabili che influenzano i parametri misurati nelle indagini di elettro-neurofisiologia clinica (attrezzature, tecniche di esecuzione, specie animale, temperatura corporea, etc.) (2). In questo modo i referti emessi risultano più accurati e più correttamente interpretabili dal veterinario referente.

Obiettivo del presente lavoro è di rendere disponibili per tutti coloro che si dedicano alla neurologia, dentro e fuori della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, i valori normali per alcuni test elettrodiagnostici. In particolare, oggetto di studio sono stati: gli studi di conduzione nervosa motoria, i potenziali evocati acustici del tronco encefalico, e il blink reflex test nel cane; tutti questi test sono stati eseguiti presso la Sezione di Clinica Medica Veterinaria del Dipartimento di Salute Animale. Questi dati si aggiungono a quelli pubblicati in passato sui potenziali evocati somato-sensoriali (3).

STUDI DI CONDUZIONE NERVOSA MOTORIA

Gli studi di conduzione nervosa comprendono la valutazione delle componenti motorie e sensitive dei nervi periferici, o di alcuni nervi cranici (4). L'impiego di que-

¹ Dipartimento di Salute Animale – Sezione di Clinica Medica Veterinaria – Università degli Studi di Parma.

sti esami è di notevole importanza in varie patologie del sistema nervoso periferico come: le neuropatie, le poliradiculoneuriti, e le lesioni traumatiche dei nervi (5, 6, 7). Il presente studio è stato indirizzato verso l'individuazione dei valori normali solamente della conduzione nervosa motoria, che rappresenta quella più comunemente valutata nei piccoli animali (4). In figura 1 è riportato un esempio di studio di conduzione nervosa motoria.

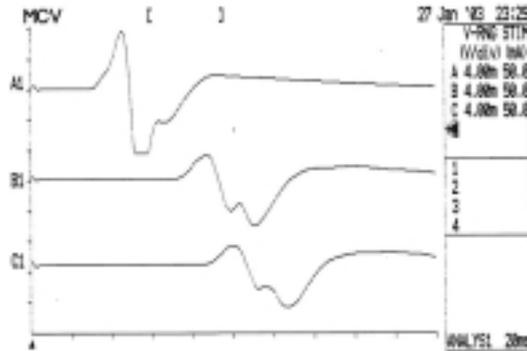


Figura 1 – Studio di conduzione nervosa motoria del nervo ulnare in un cane normale, registrazione nei muscoli interossei palmari, stimolazione a livello del carpo (traccia in alto), del gomito (traccia intermedia) e della diafisi dell'omero (traccia in basso).

Materiali e metodi

Sono stati inseriti nello studio 11 cani di diverso peso, razza, età e sesso, che non risultavano essere affetti da patologia neurologica periferica a carico degli arti testati. I cani sono stati tranquillizzati prima dell'esecuzione del test mediante medetomidina (Domitor®, Pfizer) 20 µg/kg p.v.. Durante tutto il tempo di esecuzione degli esami si è monitorata costantemente la temperatura corporea. In nessun caso la temperatura corporea è scesa sotto i 37,7° C. I nervi sottoposti ad esame sono stati, a seconda dei casi: radiale, ulnare, mediano, tibiale e peroneo. La tecnica di esecuzione è stata quella già descritta da altri autori (8). L'attrezzatura utilizzata consisteva nell'elettromiografo *Nihon Koden Four Mini MEB 5304K* e in elettrodi di stimolazione e registrazione ad ago di 0,25x10mm. Ogni nervo è stato stimolato elettricamente con stimolo sovramassimale in 2 o talvolta 3 punti diversi, contemporaneamente ad ogni stimolazione si è registrata la risposta elettrica muscolare a livello di un muscolo innervato da questo nervo. I parametri presi in considerazione sono stati: la velocità di conduzione nervosa motoria (VCNM), calcolata utilizzando la formula $VCNM \text{ (m/sec)} = \frac{\text{Distanza (mm)}}{\text{Latenza prossimale} - \text{Latenza distale (mm)}}$; l'ampiezza (da picco a picco), la durata e l'area dei potenziali d'azione composti muscolari.

Risultati

I risultati dello studio sulla conduzione nervosa motoria sono riportati in tabella 1.

Tabella 1 – Studi di Conduzione Nervosa: valori normali di velocità di conduzione motoria (VCM), e di durata, ampiezza ed area delle risposte muscolari dopo stimolazione distale e prossimale nel cane. Tra parentesi nella colonna Nervo è riportato il numero di nervi testati, in grassetto sono riportate le Medie, e sotto ogni media tra parentesi è indicata la Deviazione Standard.

Nervo	VCM (m/s)	Durata (ms)		Ampiezza (mV)		Area (mVms)	
		St. dist.	St. pross.	St. dist.	St. pross.	St. dist.	St. pross.
Radiale (7)	71,6 (± 5,4)	9,4 (± 3,7)	9,3 (± 3,2)	10,1 (± 3,7)	10,5 (± 4,6)	16,8 (± 9,3)	23,6 (± 23,3)
Mediano (4)	66,5 (± 2,9)	9,8 (± 2,1)	11,1 (± 3,2)	12,3 (± 5,5)	12,9 (± 6,0)	22,1 (± 13,1)	32,9 (± 21,0)
Ulnare (8)	55,2 (± 6,9)	9,4 (± 3,3)	8,9 (± 4,4)	9,6 (± 3,5)	6,1 (± 2,3)	18,5 (± 13,1)	13,4 (± 10,0)
Ulnare dist. (8)	55,8 (± 6,7)	8,7 (± 3,8)	8,9 (± 3,8)	10,3 (± 5,4)	9,3 (± 5,4)	18,2 (± 14,0)	17,6 (± 11,8)
Tibiale (12)	59,7 (± 4,5)	7,1 (± 1,8)	8,2 (± 1,6)	10,1 (± 5,0)	6,7 (± 3,2)	13,9 (± 8,6)	10,9 (± 8,3)
Tibiale dist. (4)	46,6 (± 5,6)	8,5 (± 2,6)	9,3 (± 2,6)	9,3 (± 4,4)	7,4 (± 3,6)	15,6 (± 10,7)	15,5 (± 11,4)
Peroneo (6)	73,5 (± 8,7)	11,7 (± 2,5)	12,0 (± 2,4)	8,8 (± 3,7)	12,4 (± 4,4)	28,4 (± 17,9)	34,2 (± 20,4)

Discussione

Variabilità a volte anche notevoli vi sono tra i valori normali pubblicati per quanto riguarda la velocità di conduzione e gli altri parametri valutati negli studi di conduzione nervosa (8, 9, 1). Tale discrepanza e la notevole variabilità di questi valori anche nell'ambito di uno stesso studio si giustifica considerando l'elevato numero di variabili che influenzano i risultati di questo esame. Le più importanti tra queste variabili sono senz'altro, oltre alla tecnica di esecuzione del test, le differenze nelle tecniche di misurazione dello spazio che separa i punti di stimolazione, la taglia e l'età del cane, e la temperatura corporea (8, 4). L'accuratezza della misurazione della distanza tra i punti in cui il nervo viene stimolato è di fondamentale importanza perché è uno dei valori che si utilizza nella formula che serve per calcolare la velocità di conduzione; questa misurazione va effettuata tenendo conto del decorso anatomico del nervo. La taglia, o meglio la lunghezza degli arti, è importante perché più è lungo l'arto minore è la velocità di conduzione; questo fenomeno è dovuto alla maggiore lunghezza dei segmenti distali dei nervi, che sono di diametro minore e quindi conducono più lentamente l'impulso nervoso. L'età del cane va presa in considerazione nel caso di soggetti di meno di 7 mesi e di più di 7 anni, che hanno velocità di conduzione più basse. La temperatura corporea è correlata positivamente alla velocità di conduzione, ogni grado centigrado di temperatura in meno determina la riduzione della velocità di conduzione motoria di 1,7-1,8 m/s (4).

Gli intervalli di normalità per la velocità di conduzione motoria del presente studio sono in molti casi simili a quelli riportati da altri (8, 9, 1), in particolare, una piena corrispondenza con altri lavori di questo tipo vi è nel rapporto tra i valori normali delle velocità di conduzione dei diversi nervi testati. La velocità di conduzione

del nervo peroneo risulta, infatti, maggiore rispetto a quella del nervo tibiale, e su valori molto simili a quelli del nervo radiale. Quest'ultimo, in questo come negli altri studi, conduce lo stimolo nervoso più velocemente rispetto al nervo mediano, mentre ancora più lenta è la velocità di conduzione del nervo ulnare (8, 9, 1). Altri parametri come la durata, l'ampiezza e soprattutto l'area della risposta muscolare, sono anch'essi utili nel chiarire la natura della neuropatia in atto, ma dipendono ancora di più dalle tecniche e dalle attrezzature utilizzate, oltre che dalle caratteristiche del paziente testato. Non è raro, infatti, il riscontro di differenze anche notevoli tra le risposte muscolari di soggetti sani. In questo modo si spiega la notevole variabilità tra i valori normali di questi parametri negli studi sulla velocità di conduzione motoria del cane (8, 9, 1).

POTENZIALI EVOCATI ACUSTICI DEL TRONCO ENCEFALICO

Sinonimi utilizzati per indicare questo test sono BAEP (Brainstem Auditory-Evoked Potentials), BAER (Brainstem Auditory-Evoked Responses) ed ABR (Auditory Brainstem Responses). Grazie a questo esame è possibile valutare la funzionalità di tutte le componenti nervose costituenti la via acustica dai recettori dell'orecchio interno fino al mesencefalo. L'impiego principale dei BAEP in medicina veterinaria è nella diagnosi di sordità, poiché è l'unico esame che permette di rilevare anche le sordità parziali o unilaterali e di localizzare con precisione la sede della lesione responsabile della sordità (10, 11). Un altro importante utilizzo dei BAEP è nella diagnosi delle lesioni del tronco encefalico, perché consente di evidenziare in modo obiettivo alterazioni funzionali di questa struttura encefalica (12, 13).

Materiali e metodi

Sono stati sottoposti ad esame 11 cani appartenenti a varie razze, di entrambi i sessi, ed età variabile dai 10 mesi ai 10 anni. In tutti i casi è stata effettuata una stimolazione acustica a 90 dB hearing level mediante cuffie intraauricolari (Intra-Auricular headset – Medelec), ed elaborazione delle tracce con attrezzatura *Nihon Koden Four Mini MEB 5304K*. Le tecniche di esecuzione e registrazione dell'esame sono le stesse riportate da Dondi e Bianchi nel 1997 (10). Il montaggio degli elettrodi ad ago utilizzato per registrare i tracciati sui quali sono state effettuate le misurazioni è stato quello Ai-Vertex. Nei cani di indole tranquilla si è effettuato l'esame senza impiego di sedativi, mentre gli altri sono stati trattati precedentemente con medetomidina (Domitor®, Pfizer) 20 µg/kg p.v. In tutti i casi si è monitorata la temperatura corporea durante l'esecuzione dei BAEP, controllando che questa non scendesse al di sotto dei 38° C.

I parametri presi in considerazione sono stati le latenze assolute delle onde sempre presenti nei tracciati normali (I, II, III, V) e le latenze interpacco (IPL) tra l'onda I e l'onda III, l'onda III e la V, e l'onda I e la V. In figura 2 è riportato un tracciato normale registrato nel cane.

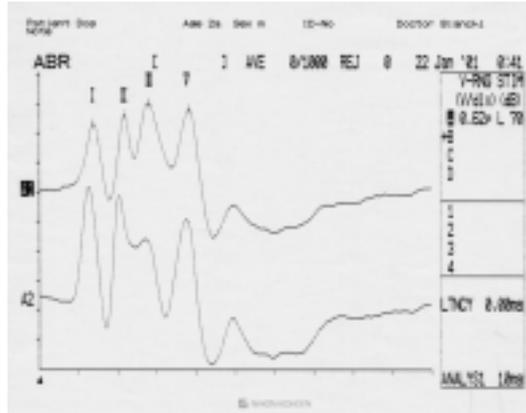


Figura 2 – Esempio di tracciato BAEP normale di cane. Sono in evidenza le onde I, II, III, V.

Risultati

I valori, per quanto riguarda i BAEP, riscontrati nel presente studio sono riportati in tabella 2-3.

Tabella 2 – BAEP: valori normali in ms delle latenze assolute dei potenziali e delle latenze interpicco (IPL) nel cane dopo stimolazione a 90 dB HL dell'orecchio sinistro.

Cane N.	I	II	III	V	III-V	I-III	I-V
1	1,3	2,12	2,96	4,05	1,1	1,66	2,76
2	1,38	2,18	2,96	3,82	0,86	1,58	2,44
3	1,32	2,16	2,94	3,78	0,84	1,62	2,46
4	1,06	1,94	2,98	4,04	1,06	1,76	2,82
5	1,36	2,24	2,96	3,94	0,98	1,6	2,58
6	1,44	2,22	3,3	3,9	0,6	1,86	2,46
7	1,34	2,12	3	3,78	0,78	1,66	2,44
8	1,46	2,46	3,26	4,22	0,96	1,8	2,76
9	1,30	2,08	2,88	3,64	0,76	1,58	2,34
10	1,54	2,48	3,52	4,13	0,62	1,98	2,6
11	1,32	2,06	2,76	3,7	0,94	1,44	2,38
SD	0,12	0,16	0,22	0,18	0,16	0,15	0,17
Lat. media	1,35	2,19	3,05	3,91	0,86	1,69	2,55

Discussione

L'impiego di cuffie audiometriche intraauricolari determina un aumento del tempo necessario allo stimolo acustico per raggiungere l'orecchio interno di circa 0,5 ms. I valori normali per i BAEP riportati nella tabella 2 e 3 risentono di questo ritardo e sono molto vicini a quelli riportati in altri studi, in cui si utilizzavano metodiche di stimolazione simili. In particolare le latenze interpicco, che sono molto meno dipendenti dall'intensità di stimolazione e da altre variabili (14) sono in molti casi identiche a quelle già pubblicate (10). Le latenze interpicco rappresentano, più delle latenze assolute delle onde, i parametri maggiormente utilizzati nella clinica.

Tabella 3 – BAEP: valori normali in ms delle latenze assolute dei potenziali e delle latenze interpicco (IPL) nel cane dopo stimolazione a 90 dB HL dell'orecchio destro.

Cane N.	I	II	III	V	III-V	I-III	I-V
1	1,34	2,12	2,94	3,78	0,84	1,6	2,44
2	1,3	2,12	2,94	3,72	0,78	1,64	2,42
3	1,32	2,16	2,94	3,78	0,84	1,62	2,46
4	1,06	1,94	2,98	4,04	1,06	1,76	2,82
5	1,34	2,22	2,96	3,74	0,78	1,62	2,4
6	1,3	1,84	3,26	3,84	0,57	1,96	2,54
7	1,34	2,12	3	3,78	0,78	1,66	2,44
8	1,36	2,24	3,2	4,01	0,82	1,84	2,66
9	1,34	2,12	3,1	3,74	0,64	1,76	2,4
10	1,5	2,38	3,34	4,13	0,8	1,84	2,64
11	1,28	2,04	2,8	3,68	0,94	1,44	2,38
SD	0,10	0,15	0,16	0,15	0,13	0,14	0,14
Lat. media	1,32	2,12	3,04	3,84	0,80	1,70	2,51

Intervalli di normalità ancora più accurati si otterrebbero suddividendo il gruppo studiato in più gruppi sulla base delle dimensioni del cranio, poiché la lunghezza della testa, e quindi del tronco encefalico, è correlata positivamente alla latenza interpicco (15).

Altri parametri come le ampiezze assolute delle onde sono considerati troppo variabili nei soggetti normali per avere un impiego clinico in medicina umana (13). Per questa eccessiva variabilità, che li rende inutilizzabili anche nel cane, non sono stati presi in considerazione nel presente studio.

BLINK REFLEX

Introduzione

Il Blink Reflex rappresenta il corrispondente elettrodiagnostico della valutazione clinica del riflesso corneale dell'esame neurologico. Il vantaggio rispetto a quest'ultimo è nella sua obiettività e sensibilità, che permette di evidenziare ritardi anche di pochi millisecondi. Per questo motivo e per la frequenza con cui i deficit del nervo trigemino e del nervo facciale si riscontrano nella pratica clinica dei piccoli animali questo esame è attualmente oggetto di studio (16). Questo test è impiegato in tutte le neuropatie in cui si ha un coinvolgimento delle strutture che compongono il riflesso trigemino-reticolo-facciale, e viene sempre associato al test di Stimolazione Diretta del nervo facciale. Quest'ultimo esame permette infatti di valutare la funzionalità della porzione extracranica del nervo facciale, e quindi la valutazione contemporanea di questo test e del Blink Reflex permette di meglio stabilire la sede e la natura della lesione (17, 18, 16).

Materiali e metodi

Per lo studio sul Blink Reflex sono stati utilizzati 13 cani appartenenti a diverse razze di taglia media e grande, entrambi i sessi, e di età dai 10 mesi agli 11 anni. Tutti

i cani erano esenti da patologie del sistema nervoso. In tutti i soggetti il test è stato preceduto dalla sedazione mediante medetomidina (Domitor®, Pfizer) 20 µg/kg p.v. La tecnica di esecuzione di questo esame è stata la stessa descritta in passato (19), e prevede la stimolazione del nervo infraorbitario e la simultanea registrazione bilaterale dei potenziali muscolari prodotti a livello dei muscoli orbicolari delle palpebre. L'attrezzatura utilizzata consisteva nell'elettromiografo *Nihon Koden Four Mini MEB 5304K* e in elettrodi di stimolazione e registrazione ad ago di 0,25x10mm. In tutti i soggetti testati si è monitorata la temperatura corporea, verificando che rimanesse tra i 38 e i 39 ° C.

Dei 3 potenziali registrati (R1, R2 ed R2 controlaterale) l'unico preso in considerazione in questo studio è R1 in quanto è l'unico dei 3 ad avere una latenza stabile, e quello che dà informazioni più utili dal punto di vista clinico (16). In figura 3 è riportato una registrazione del Blink Reflex in un soggetto normale.

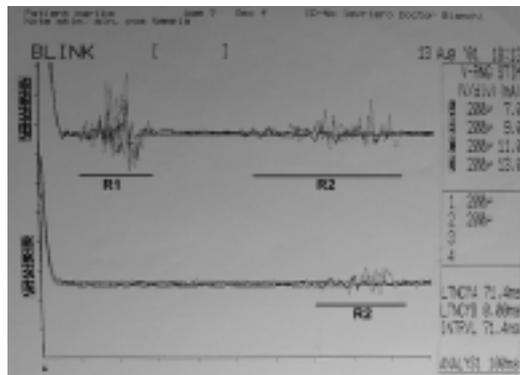


Figura 3 – Blink reflex test, esempio di tracciato normale. Sono evidenziate le onde registrate ipsilateralmente alla stimolazione (R1 ed R2), e quella registrata controlateralmente (R2).

Risultati

Le latenze di R1 registrate nei cani inseriti in questo studio sono riportate nella tabella 4.

Discussione

Gli intervalli di normalità per quanto riguarda la latenza di R1 nel cane disponibili in letteratura sono molto limitati (17, 16). Una notevole somiglianza esiste tra i valori del presente studio e i valori riportati nell'altro lavoro nel quale si utilizzava l'infraorbitario come nervo per la stimolazione del riflesso (17). Durante lo studio si è riscontrata una variabilità abbastanza marcata delle latenze di R1 al variare delle dimensioni del cranio. Questi dati preliminari sembrano indicare una correlazione positiva tra le latenze di R1 e lo sviluppo in larghezza del cranio.

Effettuando quindi studi sui valori normali di R1 nelle principali razze di cani o comunque in gruppi più uniformi per taglia si potrebbero avere intervalli di normalità più precisi e quindi più utili dal punto di vista clinico.

Tabella 4 – Blink Reflex: Valori normali di R1 dopo stimolazione sinistra e destra del nervo infraorbitario nel cane.

Cane N.	Stimolazione sinistra (ms)	Stimolazione destra (ms)
1	8,19	8,19
2	8,4	8,6
3	9	9
4	8,6	8,8
5	8,80	9,60
6	8,6	8,4
7	7,2	6,8
8	8,4	8,6
9	8,4	8,19
10	8,3	8,4
11	7,2	7,2
12	9,4	9,16
13	9	9
SD	0,50	0,63
Latenza media	8,41	8,40

CONCLUSIONI

Gli esami elettrodiagnostici trovano impiego sempre più frequentemente in neurologia veterinaria. La disponibilità di questi test presso i centri di referenza per la neurologia permette al clinico di avere informazioni obiettive sulla funzionalità nervosa e/o muscolare. In particolare riescono solitamente a precisare la gravità, l'estensione e le caratteristiche del processo morboso in atto. Queste informazioni sono in molti casi complementari a quelle sull'integrità anatomica di queste strutture fornite dagli esami di diagnostica per immagini (Rx, TAC, RMN) (2).

Affinché i risultati degli esami elettrodiagnostici siano attendibili è necessario che questi vengano effettuati da personale preparato, seguendo tecniche di esecuzione il più possibile standardizzate e con attrezzature il più possibile resistenti ai disturbi elettromagnetici ambientali. E' contemporaneamente importante che si conoscano nel modo più preciso possibile gli intervalli di normalità per ciascun esame, e che questi vengano rivalutati ogniqualvolta viene modificato un elemento dell'esame, come ad esempio una componente dell'attrezzatura o la tecnica di esecuzione.

A questo scopo si è deciso di rivalutare i valori normali sulla base di modifiche alle metodiche di esecuzione di alcuni test e della sostituzione di alcune attrezzature, almeno per alcuni test di più frequente utilizzo, e di pubblicarli per rendere disponibili questi dati anche ai colleghi esterni alla Sezione di Clinica Medica Veterinaria del Dipartimento di Salute Animale dell'Università di Parma.

I risultati di questo studio non si discostano sostanzialmente da quelli pubblicati in passato da altri autori, anche se differenze di pochi ms o mV possono bastare a differenziare un soggetto sano da uno patologico. Per questo motivo il lavoro di ricerca di intervalli di normalità sempre più accurati, che deve basarsi sull'impiego di campioni di "normali" più corposi numericamente e significativi di quelli utilizzati in questo studio e magari suddivisi per taglie o razze, dovrà proseguire nei prossimi mesi ed anni.

Parole chiave: Cane, Elettrofisiologia, Velocità di Conduzione Nervosa, Potenziali Evocati Acustici, Blink Reflex.

Key words: Dog, Electrophysiology, Nerve Conduction Velocity, Auditory Evoked Potentials, Blink Reflex.

RIASSUNTO - I test elettrodiagnostici forniscono preziose informazioni sulla gravità, la distribuzione anatomica e le caratteristiche delle patologie neurologiche. Questo articolo tratta 3 esami di elettrofisiologia: gli studi di conduzione nervosa, i potenziali acustici del tronco encefalico e il blink reflex test. Viene brevemente discusso l'impiego di queste tecniche nella diagnosi e nella valutazione dell'evoluzione dei pazienti neurologici. Vengono forniti i valori normali per questi test, insieme con una valutazione comparativa con gli intervalli di normalità riportati da altri autori.

SUMMARY - Motor nerve conduction studies, brainstem auditory-evoked potentials, blink reflex test: normal values in the dog. - Electrodiagnostic tests provide invaluable information about severity, distribution, and character of neurologic diseases. This article focuses on 3 electrophysiologic tests: nerve conduction studies, brainstem auditory-evoked potentials and blink reflex test. The use of these techniques in the diagnosis and evaluation of neurologic patients is briefly discussed. Normal values for these tests in the dog, and a comparison with corresponding values reported by others, are provided.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Malik R., Ho S., Church D.B.: A new method for recording and analysing evoked motor potentials from dogs. *Journal of Small Animal Practice*, **30**, 13-19, 1989.
- 2) Chiappa K.H.: Principles of evoked potentials. In: *Evoked potentials in clinical medicine*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
- 3) Dondi M., Bonati L., Quintavalla C.: Potenziali evocati somato-sensoriali (SEP), tempo di conduzione somatica centrale e ampiezza di potenziale corticale normali nel cane. *Atti SISVET*, vol **LI**, 603-604, 1997.
- 4) Cudon P.A.: Electrophysiology in neuromuscular disease. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, **32**, 31-62, 2002.
- 5) Steiss J.E., Orsher A.N., Bowen J.M.: Electrodiagnostic analysis of peripheral neuropathy in dogs with diabetes mellitus. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 2061-2064, 1981.
- 6) De Lahunta A.: Lower motor neuron-general somatic efferent system. In: *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology* – 2nd edition. WB Saunders, Philadelphia, 1983.
- 7) Oliver J.E., Lorenz M.D., Kornegay J.N.: Tetraparesis, hemiparesis and ataxia. In: *Handbook of veterinary neurology* – 3rd edition. WB Saunders, Philadelphia, 1997.
- 8) Walker T.L., Redding R.W., Braund K.G.: Motor nerve conduction velocity and latency in the dog. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 1433-1439, 1979.
- 9) Van Nes J.J., Van Den Brom W.E.: Electroneurographic examination of the ulnar

and radial nerves in the dog: reference values, biological variation and reproducibility. *Research in Veterinary Science*, **40**, 189-196, 1986.

10) 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.

11) Dondi M., Bianchi E.: Epidemiological data on congenital deafness in dalmatian dogs using brainstem auditory-evoked potentials. *S.I.S.VET Annual Meeting Selected Abstracts*, **2**, 141, 2000.

12) Steiss J.E., Cox N.R., Hathcock J.T.: Brain stem auditory-evoked response abnormalities in 14 dogs with confirmed central nervous system lesions. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **8**, 293-298, 1994.

13) Chiappa K.H., Hill R.A.: Brain Stem Auditory Evoked Potentials: Interpretation. In: *Evoked potentials in clinical medicine*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.

14) Chiappa K.H.: Brain Stem Auditory Evoked Potentials: Methodology. In: *Evoked potentials in clinical medicine*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.

15) Pook H.A., Steiss J.E.: Correlation of brain stem auditory-evoked responses with cranium size and body weight of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1779-1783, 1990.

16) Anor S., Espadaler J.M., Pastor J., Pumarola M.: Electrically induced blink reflex and facial motor nerve stimulation in Beagles. *J. Vet. Intern. Med.*, **14**, 418-423, 2000.

17) Whalen L.R.: Electrophysiologic studies of the facial reflexes of the dog. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 229-234, 1985.

18) Kimura J.: The blink reflex. In: *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle* – F.A. Davis Company, Philadelphia, 1989.

19) Bianchi E., Callegari D, Dondi M.: Prospettive di impiego del Blink Reflex e del test di stimolazione diretta del facciale nel cane. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, **XXI**, 101-116, 2001.

COMPARATIVE STUDY ON NITRITE AND NITRATE IONS DETERMINATION

Zanardi E., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R.

INTRODUCTION

Sodium and potassium nitrates (KNO_3 , NaNO_3) and sodium and potassium nitrites (KNO_2 , NaNO_2) are used in meat curing because they stabilise red meat colour, inhibit some spoilage and food poisoning anaerobic microorganisms, delay the development of oxidative rancidity and contribute to flavour development (Pierson and Smoot, 1982; Kanner, 1994; Skibsted, 1992; Noel, Briand and Dumont, 1990; Cassens, 1995). Nitrates are reduced to nitrites in meats by naturally occurring bacteria and nitrites are reduced to nitric oxide (NO), the compound that reacts with myoglobin to produce the typical colour of cured meat. The discovery of the carcinogenic properties of nitrosamines (Magee and Barnes, 1956; Magee and Barnes, 1967), reaction products produced by the interaction of secondary amines and nitrites, has brought a wave of investigations on the possible presence of nitrosamines in cured meat products and on the risk that such presence would represent for human health. Nitrosamines in cured meat products seem to be extremely scarce if not absent (Cantoni and Bianchi Paleari, 1980) but limits in the amounts of nitrates and nitrites for meat curing have been reviewed accordingly. Current legislation (EU Directive 95/2) suggests maximum amounts to be added at the beginning of processing in various meat products and imposes a maximum residue of 50ppm nitrites and 250ppm nitrates in cured meat products that have not been thermally treated.

The relevance that nitrates and nitrites have for legal and safety purposes, entails the need for accurate analytical methods. Different methods are used in the various laboratories, partial changes to the old methods and new methods are proposed from time to time.

Many methods for the determination of nitrite rely on variations of the Griess diazotisation procedure, in which an azo dye is produced by coupling a diazonium salt with an aromatic amine or phenol (Kirk and Sawyer, 1991). Experimental conditions must be carefully controlled since factors such as pH, temperature, nature and concentration of the reagents affect the final colour intensity. Such colorimetric methods in practice are based on the reaction of NO_2^- with a solution of sulphanilamide and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride. The red colour so produced is measured by a spectrophotometer set at 538nm (Slack, 1987).

Nitrate cannot be determined as such but has to be reduced to nitrite. Therefore, NO_3^- is extracted from the meat with hot water in the presence of borax buffer, reduced to NO_2^- with cadmium and mixed with sulphanilamide and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride. Any NO_2^- present in the extract is determined before reduction and nitrate content is obtained by difference (Slack, 1987).

In the older version of the colorimetric method the various steps of the analytical procedure are run manually whereas a more recent one employs a completely automated equipment (Technicon Autoanalyzer II).

Some laboratories have adopted a different approach for the determination of nitrate and have chosen an enzymatic test based on the reduction of nitrate to nitrite by NADPH in the presence of the enzyme nitrate-reductase. The amount of NADPH oxidised during the reaction is stoichiometric to the amount of nitrate. The decrease of NADPH is measured by means of its absorbance at 340nm (Boehringer Mannheim, 1986).

Recently ion exchange-high pressure liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) methods have been developed for the simultaneous detection of nitrite and nitrate in foodstuffs, particularly cured meats and vegetables (Reece and Hird, 2000; Öztekin et al., 2002). The use of HPLC and CE methodology is potentially attractive since they are more rapid than methods based on reduction/colorimetry. However, interpretation of the data obtained from a number of food samples has been complicated by matrix-derived chromatographic interferences and comparison of the results obtained with colorimetric assay in some products have shown inconsistencies, especially at low concentrations of the two analytes (Dennis et al., 1990).

The determination of nitrate/nitrite in meats has always been difficult and the results have often been judged unsatisfactory. Many attempts, therefore, have been made to improve the reliability of the various methods proposed over the years. Nitrite is a reactive molecule and it has been stated that less than 50% of the amount added can be chemically analysed after completion of processing (Cassens et al., 1979; Cassens et al., 1995). Moreover, the presence of ascorbate accelerates the depletion of nitrite. Most of the added nitrite is present in meat as NO bound with myoglobin (5-15%), sulphhydryl groups (5-15%), lipids (1-5%) and proteins (20-30%), partially is present as nitrate (< 10%) and as nitrite (10-15%) (Cassens et al., 1976).

The safety risk due to nitrosamines formation, though, is linked only with free residual nitrite. It is, therefore, crucial to have specific, accurate, repeatable, linear and sensitive analytical methods specifically apt for cured meat products.

The investigation here presented has been undertaken to compare different analytical methods applied to specifically produced Italian dry fermented sausages from beginning to end of processing.

MATERIALS AND METHODS

Three formulations differing for nitrite/nitrate content were produced using the following sausage recipe. Fresh pork shoulders (72%) and pork streaky bacon (28%) were minced to 3.5mm particle size and mixed with salt (2.5%), skimmed milk (2.8%), sucrose (0.5%), dextrose (0.3%), ascorbic acid (0.03%). A commercial mixture of *L. curvatus* and *M. varians* was used as starter culture. Minced meat and additives were mixed and stuffed in a reconstructed collagen casings of 6.5cm diameter to have a final weight of matured sausages of about 500g each. Processing temperature went from 21.5°C of fermentation to 12.5°C of maturation. Total processing lasted 40 days. Two 50kg batches were produced for each formulation.

First formulation: 150ppm NaNO₂

Second formulation: 250ppm KNO₃

Third formulation: 80ppm NaNO₂ and 120ppm KNO₃

Samples for nitrate/nitrite analysis were taken from fresh mince (0 days), during and up to the end of maturation (namely at 1, 2, 4, 6, 14, 20, 30 and 40 days). The NO₂⁻ and NO₃⁻ determination has been carried out by three methods labelled respectively: “Cd manual”, “Cd automated” and “Enzymatic”. Each method was used in a different laboratory.

The sausage samples were extracted as described by Slack (1987) for the “Cd manual” method and a very similar procedure was employed for the other two.

The method described by Slack (1987) has been followed for the determination of residual nitrites and nitrates for the “Cd manual” (laboratory n° 1).

The method “Cd automated” made use of the Autoanalyzer Technicon II based on the same principles as the “Cd manual” but with an automated and standardized system for reducing nitrates to nitrites and for the reaction of nitrites with sulphanilamide first, and with N-1-naphthylethylenediamine afterwards, to produce and measure the red colour at 538nm (laboratory n° 2).

With the “Enzymatic” method (Mannheim Boeringer, n° 905 658, test combination), nitrate is reduced to nitrite by NADPH in the presence of the enzyme nitrate reductase. The amount of NADPH oxidised is stoichiometric to the amount of nitrate. The decrease in NADPH is measured by means of its light absorbance at 340nm. Residual nitrites were measured in the same way as the first two methods (laboratory n° 3).

A calibration curve was prepared with standard solutions of nitrite (0.1; 0.2; 0.3; 0.4 and 0.5 µg/ml) for each method.

The sausages were checked for pH, A_w, proximate composition, non protein nitrogen and NaCl and were found to be similar among themselves and to other batches produced in previous investigations (Zanardi et al., 2002)

RESULTS

First Formulation

The low residual NO₂⁻ observed in the fresh mince, between 5 and 15 ppm, is difficult to explain. Technical problems, such as the timing of additives mixing, could have played a significant role. Residual NO₂⁻ was of the same order of magnitude in the other sampling times, showing values next to 0 from day 4 onwards with all the three methods (Table 1).

NO₃⁻ content, presumably produced from oxidation of NO₂⁻ or due to natural content, is between 11 and 30ppm in the fresh mince and between 25 and 50 in matured sausages. The enzymatic method has given values clearly above the level obtained with the other two methods (Table 2). Nitrate formation in meat products manufactured only with nitrite has often been reported in bacon, in model systems and in frankfurters prepared in pilot plant (Goutefongea et al., 1977; Lee et al., 1978; Pérez-Rodríguez et al., 1996).

Table 1. Residual nitrites (expressed as ppm of NaNO₂)

	D a y s o f p r o c e s s i n g								
	0	1	2	4	6	14	20	30	40
<i>Formulation 1</i>									
Cd manual	13±1	19±1	12±0	8±0	8±1	4±2	8±2	5±0	6±0
Cd automated	15±2	9±3	4±0	2±1	2±1	1±0	n.a.	2±2	2±1
Enzymatic	7±1	5±1	3±1	2±0	1±0	1±0	1±1	1±0	2±1
<i>Formulation 2</i>									
Cd manual	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4±1	6±1	6±0	8±1
Cd automated	n.d.	n.d.	3±2	2±1	2±1	3±0	5±0	6±1	7±1
Enzymatic	n.d.	1±1	1±1	1±1	1±1	2±1	2±1	3±1	3±3
<i>Formulation 3</i>									
Cd manual	6±0	7±1	5±0	3±1	3±0	3±0	4±0	3±2	6±0
Cd automated	5±0	2±1	3±1	3±1	2±1	3±1	3±0	5±1	6±1
Enzymatic	3±1	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0	2±1	1±1	2±1

(n.a.: not available; n.d.: lower than detection limit)

Table 2. Residual nitrates (expressed as ppm of NaNO₃)

	D a y s o f p r o c e s s i n g								
	0	1	2	4	6	14	20	30	40
<i>Formulation 1</i>									
Cd manual	13±1	11±0	11±1	7±0	11±4	15±6	12±0	13±3	29±8
Cd automated	11±1	22±4	16±5	18±1	15±1	18±2	19±1	26±6	25±1
Enzymatic	30±4	38±1	38±10	44±4	45±5	n.a.	33±13	39±16	52±3
<i>Formulation 2</i>									
Cd manual	68±6	61±5	73±12	101±1	79±13	49±48	90±24	60±2	64±0
Cd automated	132±6	149±6	171±42	158±15	151±14	150±49	134±13	179±39	119±13
Enzymatic	271±9	294±1	297±16	315±1	302±10	261±55	263±30	277±42	263±6
<i>Formulation 3</i>									
Cd manual	58±11	47±10	51±2	90±2	78±4	100±4	79±2	62±0	63±4
Cd automated	81±0	125±47	142±20	132±21	129±20	125±16	116±11	109±16	109±13
Enzymatic	178±10	194±11	202±11	206±11	217±12	214±16	229±9	213±3	213±23

(n.a.: not available)

Second Formulation

No residual nitrite has been observed in the fresh mince and very little (between 3 and 8ppm) in matured sausages.

NO₃⁻ content is very different according to the three methods. The manual method has constantly given the lowest values, the enzymatic test the highest ones and the automated method the intermediate values. For instance, the NO₃⁻ content

was found to be 68, 132, 271ppm in the fresh mince and 64, 119, 263ppm in matured sausages, respectively with method 1, 2 and 3. Values of residual nitrate were far from the amount added since day 0 for the Cd methods (manual and automated), fairly close to the 250ppm added to the batter with the enzymatic method. More striking, though, was the finding that nitrate concentration did not change significantly during maturation or, at least, it did not show a clear trend.

Third Formulation

The amounts of nitrite and nitrate used in this formulation are very close to what is frequently adopted in practice for medium or long matured dry fermented sausages.

Analytically detected residual NO_2^- is rather low with all methods in the mince and in all the other sampling days. Such “trace” levels could be considered normal in matured sausages but are not so convincing at day 0.

The values of residual nitrate are markedly different according to the method adopted. The manual method has constantly given the lowest data and with variations not apparently accountable on the basis of the unfolding of processing. The enzymatic method has produced values always higher than the dose added to the batter with levels altogether stable from day 2 until day 40. The values obtained with the automated method, with statistically not significant fluctuations, are very close to the amount added but do not change from day 1 till day 40.

The lower concentrations ascertained at day 0, compared with the following days, with the automated and enzymic methods can probably be attributed to insufficient, or not homogenous, distribution of the compound in the mass of the batter.

Discussion and Conclusions

The three analytical methods showed no differences in NO_2^- because they are based on the same principle. Nitrite is extracted with water heated to 70-80° C and the solution is kept boiling for 30 min. Losses of NO_2^- (and NO_3^-) are controlled by using a borax (Cd manual and automated method) or imidazole buffer (enzymatic method) to ensure that the pH of the extract remains above 7. In the subsequent deproteinisation stage the pH is adjusted to values close to the isoelectric point of the soluble proteins, usually between 5.5 and 6.5, by the use of Carrez solution (zinc acetate and potassium ferrocyanide) which is generally regarded as the most effective clearing agent. In the “Cd manual” method the possible interference of ascorbate is removed by reduction with iodine.

The “disappearance” of nitrite right from the very beginning of processing (the samples of day 0 were frozen in about 3 hours from preparation), or the inability of all the three methods (each of them applied in a different laboratory) to detect significant amounts of NO_2^- in the mince, is not entirely convincing unless we assume that, especially with ascorbic acid, nitrite is very rapidly transformed into NO (Cassens et al., 1976; Cassens et al., 1979).

In this experiment the range of values didn't exceed 20ppm and the extraction step of the salt probably was not critical as for higher amounts. As a matter of fact this method of analysis has been subjected to criticism by Binstok et al. (1996) that

have recorded recoveries lower than 50% in meat model systems containing 80ppm of sodium nitrite. The same authors have proposed an improved procedure based on the dispersion of the sample with sand prior to the extraction step and on the use of a higher concentration of N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride.

The results concerning NO_3^- show a different pattern. The three methods are similar for the extraction step of the ions by hot water and differ in the reduction step of NO_3^- to NO_2^- , which is performed by cadmium powder or by NADPH in the presence of nitrate-reductase.

The "Cd manual" method appears to fail in reducing completely NO_3^- present in the matrix as nitrate concentrations analytically determined never exceed 100ppm, not even at day 0 in formulation 2 to which 250ppm had been added. A comparison of the HPLC and Cd reduction/colorimetric methods performed by Alonso et al. (1992) confirmed the effect. The values obtained by the Cd method were considerably less than those obtained by chromatographic method and the difference has been attributed by the authors to a possible decline in the efficiency of the Cd column due to possible interferences caused by other anions such as polyphosphates. On the other hand, the enzymatic test produces an overestimation of the NO_3^- values even if nitrate-reductase is specific for NO_3^- ions. The overestimation is a constant of that method as values above 30ppm and up to 50ppm have been observed in formulation 1 to which no nitrate had been added.

The "Cd automated" method has given results more in line with the amounts added and, from such a point of view, seems to be the best performing of the three. The doubt on the best method, though, still remains as it would also be necessary to take into account the nitrate naturally present in the meat and the other ingredients. Preziosi (1984 a, b), for instance, has observed that fresh beef has a variable natural nitrate content which can be up to 20ppm whereas in canned beef natural nitrate is normally lower than 25ppm but it can occasionally be higher than 40ppm.

An important result of the present investigation that cannot be ignored is that NO_3^- values appear to remain substantially unchanged from day 1 to day 40 of processing with all the methods tested. Such stability of nitrate, just like the disappearance of nitrite right from the beginning, leaves some questions to be answered.

Key words: nitrites, nitrates, fermented sausages

Parole chiave: nitriti, nitrati, salami

SUMMARY - Problems have been encountered with the determination of nitrite and nitrate residues in samples of fresh mince and of matured sausages and a comparative test has been carried out between three different methods used by three different laboratories. The results have shown significant differences in the determination of nitrates and appear to suggest the usefulness of doing some more work on the subject.

RIASSUNTO - Le implicazioni legali e sanitarie associate alla presenza di residui di nitriti e nitrati, utilizzati come additivi nei prodotti a base di carne, rendono necessaria la standardizzazione delle procedure di analisi. L'elevata reattività di questi sali, infatti, pone problemi nella loro determinazione e la disponibilità di diversi metodi

analitici rende difficoltosa la comparazione dei dati ottenuti in laboratori diversi. Si é ritenuto opportuno pertanto effettuare uno studio comparativo di tre diverse procedure su una serie di campioni di salame Milano a diversi tempi di stagionatura. Mentre nessuna differenza significativa é stata rilevata nella misura dei nitriti, la determinazione dei nitrati ha dato origine a risultati molto diversi tra loro.

REFERENCES

- Alonso A., Etxaniz B. and Martinez M.D. (1992) The determination of nitrate in cured meat products. A comparison of the HPLC UV/VIS and Cd/spectrophotometric methods. *Food Additives and Contaminants*, **9**, 111-117.
- Binstok G., Campos C.A. and Gerschenson L.N. (1996) Determination of nitrites in meat model systems: an improved procedure. *Meat Science*, **42**, 401-405.
- Boehringer Mannheim (1986) Analisi enzimatica – Food Analysis.
- Cantoni C. and Bianchi Paleari M.A. (1980) Nitrati, nitriti, nitrosamine e cancro. *Archivio Veterinario Italiano*, Supplemento 2.
- Cassens R.G., Woolford G., Lee S.H. and Goutefongea R. (1976) Fate of nitrite in meat. *Proceedings 2nd International Symposium of Nitrite in Meat Products*, Zeist, Pudoc, Wageningen, The Netherlands, 95-100.
- Cassens R., Greaser M.L., Ito T. and Lee M. (1979) *Food Technology*, July, 46-57.
- Cassens R. (1995) Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technology*, July, 72-80.
- Dennis M.J., Key P.E., Papworth T., Pointer M. and Massey R.C. (1990) The determination of nitrate and nitrite in cured meat by HPLC/UV. *Food Additives and Contaminants*, **7**, 455-461.
- Goutefongea R., Cassens R.G. and Woolford G. (1977) Distribution of sodium nitrite in adipose tissue during curing. *Journal of Food Science*, **42**, 1637-1641.
- Kanner J. (1994) Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, **36**, 169-189.
- Kirk R.S. and Sawyer R. (1991) Pearson's composition and analysis of foods. Longman, Essex, England, 75-82.
- Lee S.H., Cassens R.G., Winder W.C. and Fennema O.R. (1978) Factors affecting the formation of nitrate from added nitrite in model systems and cured meat products. *Journal of Food Science*, **43**, 673-676.
- Magee P.N. and Barnes J.M. (1956) The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer*, **10**, 114-120.
- Magee P.N. and Barnes J.M. (1967) Carcinogenic nitroso compounds, *Advances in Cancer Research*, **10**, 163-169.
- Noel P., Briand E. and Dumont J.P. (1990) Role of nitrite in flavour development in uncooked cured meat products: sensory assessment. *Meat Science*, **28**, 1-8.
- Öztekın N., Said Nutku M. and Bedia Erım F. (2002) Simultaneous determination of

nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, **76**, 103-106.

Pérez-Rodríguez M.L., Bosch N. and Garcia-Mata M. (1996) Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. *Meat Science*, **44**, 65-73.

Pierson M.D. and Smoot L.A. (1982) Nitrite, nitrite alternatives and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **17**, 141-187.

Preziosi A. (1984 a) Indagini sulla presenza naturale di nitrati e nitriti in carni bovine di provenienza estera e nazionali utilizzate per la produzione di carni in scatola. *Industrie Alimentari*, maggio, 402-404.

Preziosi A. (1984 b) Carni in scatola senza nitrati e nitriti. Studi sul loro tenore naturale di NO_2^- e NO_3^- . *Industrie Alimentari*, luglio-agosto, 594-596.

Reece P. and Hird H. (2000) Modification of the ion exchange HPLC procedure for the detection of nitrate and nitrite in dairy products. *Food Additives and Contaminants*, **17**, 219-222.

Skibsted L.H. (1992) Cured meat products and their oxidative stability. In “*The chemistry of muscle-based foods*” (Johnston D.E., Knight M.K., Ledward D.A. editors), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 266-286.

Slack P.T. (1987) Analytical methods manual. Leatherhead Food R.A., 2nd edition.

Zanardi E., Dorigoni V., Badiani A., Chizzolini R. (2002) Lipid and colour stability of Milano type sausages: effect of packing conditions. *Meat Science*, **61**, 7-14.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI CONTAMINANTI CHIMICI IN LATTE E CARNE DI PRODUZIONE TRADIZIONALE E BIOLOGICA

Ghidini S.¹, Zanardi E.¹, Battaglia A.¹, Pinotti M.A.¹,
Varisco G.², Campanini G.¹, Chizzolini R.¹

INTRODUZIONE

Le produzioni animali di tipo biologico stanno raccogliendo consensi sempre crescenti presso i consumatori preoccupati per la sicurezza delle carni e del latte dopo le grandi crisi della BSE, della diossina e PCB, dell'antibiotico resistenza conseguente all'uso degli antimicrobici a scopi auxinici, dell'uso fraudolento di anabolizzanti e di altri scandali alimentari. La sensibilità verso il benessere degli animali in allevamento, inoltre, si è fatta più viva negli ultimi anni sia per le migliorate condizioni di vita dei consumatori stessi sia perché alcune pratiche di allevamento (ad es., vitelli segregati per tutta la vita in box individuali; box per suini sovraffollati, ecc.) hanno suscitato sentimenti di disagio morale e di rifiuto.

Il consumatore considera "a priori" le produzioni biologiche più sicure di quelle tradizionali per il semplice fatto di essere biologiche e dimentica che "il biologico" è solamente un processo produttivo che si propone di avere un impatto ambientale ridotto e di rispettare i naturali cicli e ritmi di crescita e di produzione degli animali. Lo stesso Regolamento CEE 2092/91, che costituisce insieme al Regolamento CE 1804/99 la normativa europea di riferimento in ambito biologico, all'articolo 10, comma 2, dice testualmente "*Nell'etichettatura e nella pubblicità del prodotto biologico non possono essere contenute affermazioni che suggeriscono all'acquirente che l'indicazione di cui all'Allegato V (Agricoltura Biologica) costituisce una garanzia di qualità organolettica, nutritiva o sanitaria superiore*". Ritenerne, o propagandare, che i prodotti biologici siano più sicuri di quelli tradizionali, oltre ad essere ingannevole e scorretto nei confronti dei secondi, può indurre nel consumatore un atteggiamento di scarsa attenzione alle condizioni di conservazione e preparazione di tali alimenti ed esporlo a rischi anche seri.

Gli agenti di pericolosità di tipo biologico, come i batteri delle tossinfezioni alimentari, possono essere veicolati indifferente da alimenti tradizionali o biologici. Alcuni ricercatori danesi (Heuer *et al.*, 2001), per esempio, hanno isolato *Campylobacter spp* dal 100% di 22 gruppi di polli di allevamenti biologici, dal 36,7% di 79 gruppi di polli da allevamenti intensivi tradizionali e dal 49,2% di 59 gruppi di polli da allevamenti estensivi al coperto. Patologie di tipo parassitario (ad

¹ Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Parma.

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia Romagna, Sezione di Brescia.

es. trichinosi, cisticercosi), che trovano nell'allevamento intensivo per sè un efficace sistema di profilassi, possono tornare ad essere dei rischi dai quali occorre difendersi attivamente. Contaminanti di origine ambientale, come i metalli pesanti, o di origine mista ambientale ed umana, come i pesticidi ed i policlorobifenili, o derivanti da problemi di conservazione dei foraggi e delle materie prime dei mangimi, come le micotossine, potrebbero interessare le produzioni biologiche se non vengono prese misure concrete prima della messa in opera e/o durante l'operatività delle aziende biologiche. Gli alimenti biologici, infatti, per quanto sia ragionevole presupporre che presentino una minore contaminazione da pesticidi (Bourn e Prescott, 2002), non possono essere considerati per principio completamente esenti sia per la possibile presenza di residui di coltivazioni precedenti sia per la possibile contaminazione indiretta derivante da coltivazioni tradizionali contigue (Bray, 2001)

Gli animali allevati secondo il sistema biologico sono normalmente macellati ad una età superiore a quella degli animali provenienti da allevamenti intensivi (per i broiler si parla di un raddoppio dell'età di macellazione) e sono liberi di muoversi nell'ambiente esterno. Tutto ciò aumenta la probabilità che gli animali possano diventare portatori di microrganismi patogeni o di parassiti e possano accumulare contaminanti di origine ambientale o dietetica.

La sperimentazione, di cui si riportano i risultati preliminari, è stata programmata come indagine conoscitiva delle possibili fonti di rischio di tipo chimico, e della loro importanza, per il latte e la carne prodotti con il sistema biologico.

MATERIALI E METODI

Latte

Il prelievo dei campioni è stato programmato in modo da raccogliere informazioni da un numero limitato di aziende durante un intero anno di attività con cadenza mensile. Le aziende sono state scelte anche secondo il criterio della contiguità geografica tra unità tradizionali ed unità di tipo biologico. Ogni produttore biologico, quindi, è stato associato ad uno convenzionale posto a non più di 2 km di distanza in linea d'aria al fine di minimizzare effetti ambientali.

Il latte di prima mungitura è stato raccolto da 8 aziende convenzionali e da altrettante aziende biologiche, di cui 6 in Lombardia e 2 in Emilia Romagna. I campioni, per un totale di 79 di tipo tradizionale e di 81 di tipo biologico, erano costituiti da aliquote di 1 litro prelevate dalla cisterna aziendale. Ogni campione è stato confezionato in un contenitore di polietilene ad alta densità, immediatamente refrigerato e, dopo congelazione all'arrivo in laboratorio, conservato a -18°C fino al momento dell'analisi.

Tutti i campioni sono stati sottoposti alla determinazione di pesticidi organoclorurati (OC), policlorobifenili (PCB), piombo, cadmio e aflatossina M1.

La determinazione di pesticidi OC e PCB è stata effettuata mediante un'analisi multiresiduo proposta da Di Muccio *et al.* (1988) ed attualmente utilizzata presso il Laboratorio di Tossicologia Applicata – Reparto Residui di Antiparassitari dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma. La procedura analitica, che consente la determinazione contemporanea di 24 pesticidi OC e 18 PCB (Tabella 1), consiste in una estra-

Tabella 1. Pesticidi organoclorurati e PCB determinabili mediante l'analisi multiresiduo adottata.

Pesticidi organoclorurati	Esaclorobenzene (HCB); <i>trans</i> -clordene; <i>cis</i> -clordene; eptacloro; aldrin; dieldrin; endrin; octaclorostirene; <i>trans</i> -nonacloro; <i>o,p</i> -DDDE; <i>p,p</i> -DDE; <i>o,p</i> -DDT; <i>o,p</i> -DDD; <i>p,p</i> -DDD; mirex; quintozene; esaclorocicloesano (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH); <i>trans</i> -clordano; <i>cis</i> -clordano; ossiclordano; α -endosulfan
PCB	28; 52; 66; 101; 104; 110; 118; 128; 132; 138; 151; 153; 156; 170; 180; 189; 194; 206

zione selettiva in fase solida mediante etere di petrolio saturato con acetonitrile seguita da purificazione dell'estratto mediante cromatografia ad adsorbimento. La determinazione qualitativa e quantitativa dei singoli analiti viene effettuata mediante gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni.

Prove preliminari effettuate con standard puri hanno consentito di definire il limite di rivelazione (LOD – Limit of Detection) (concentrazione in grado di fornire un segnale maggiore o uguale a 3 volte il rumore di fondo strumentale) ed il limite di quantificazione LOQ (concentrazione in grado di fornire un segnale maggiore o uguale a 10 volte il rumore di fondo strumentale) di tutti gli analiti in esame.

Il LOD è risultato 0,2 ppb ed il LOQ 0,4 ppb per tutti i pesticidi OC e PCB con la strumentazione disponibile per la ricerca, vale a dire un gas cromatografo HP 6890, con colonna J&W DB 1701 – 30m x 0,25mm x 0,25 μ m, e rivelatore a cattura di elettroni μ ECD HP G2397A. Entrambi i valori sono inferiori ai limiti massimi di residuo (LMR) previsti dal Decreto del Ministero della Sanità 19.5.2000 per i pesticidi OC nel latte. Il livello massimo di diossina previsto per il latte crudo è di 3 pg OMS-PCDD/F-TEQ/g grasso (Regolamento CE 466/2001) mentre i limiti massimi di PCB diossina-simili non sono stati fissati a causa degli scarsissimi dati disponibili sulla prevalenza di questi ultimi.

La Comunicazione CEE n. 593 del 24.10.2001, riguardante la strategia comunitaria sulle diossine, i furani e i bifenili policlorurati, precisa che per i PCB non diossina-simili verrà effettuata una valutazione del rischio che costituirà la base per l'elaborazione di proposte dei valori limite. Un limite di congruenza sanitaria di 100 ppb sul grasso riferito al totale dei PCB (ovvero 4 ppb sul latte crudo, considerando un tenore di grasso pari al 4% come indicato nel Decreto del Ministero della Sanità 19.5.2000) è stato tuttavia fissato per il latte e altri alimenti di origine animale. Tale valore è riportato nel Piano Nazionale Residui.

La determinazione di piombo e cadmio è stata effettuata mineralizzando 2 ml di latte mediante un sistema a microonde in presenza di 2 ml di acido nitrico al 65% e 0,5 ml di acqua ossigenata al 30%, il tutto successivamente diluito a 10 ml con acqua distillata. L'analisi dei due metalli è stata eseguita mediante spettrofotometro ad assorbimento atomico Perkin Elmer AAnalyst 600, dotato di correttore di fondo ad effetto Zeeman. Prima dell'incenerimento il campione è stato addizionato di 5 μ l di

modificante di matrice costituito da una soluzione all'1% di $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e allo 0,06% di $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Il programma termico di incenerimento e atomizzazione utilizzato per la determinazione del piombo era il seguente: 110°C per 30s, 130°C per 30s, 850°C per 20s, 1600°C per 5s, 2450°C per 3s. Il programma termico impiegato per la determinazione del cadmio era il seguente: 110°C per 30s, 130°C per 30s, 500°C per 25s, 1500°C per 5s, 2450°C per 3s. I limiti di rivelazione erano 1 e 0,1 ppb, rispettivamente per piombo e cadmio.

La determinazione dell'aflatossina M1 è stata eseguita mediante test immunoenzimatico di tipo ELISA (ELISA-System aflatoxin M1). Il limite di rivelazione era pari a 5 ppt.

Carne

10 porzioni di *Longissimus dorsi* bovino provenienti da animali allevati in aziende convenzionali e 10 provenienti da animali allevati in aziende biologiche sono stati sottoposti ad analisi per la determinazione di pesticidi organoclorurati (OC), policlorobifenili (PCB), piombo e cadmio.

La determinazione di pesticidi OC e PCB è stata effettuata con la metodica descritta da Di Muccio *et al.* (1997) e, come per il latte, la procedura ha consentito la determinazione contemporanea di 24 pesticidi OC e 18 PCB (Tabella 1). A differenza del latte, l'analisi richiede una fase preliminare di estrazione del grasso totale con una miscela etere di petrolio/acetone (1/1) seguita dalla purificazione ed isolamento dalla matrice lipidica dei pesticidi e PCB mediante estrazione in fase solida e cromatografia ad adsorbimento. L'estratto purificato viene successivamente analizzato mediante gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni.

Il LOD ed il LOQ sono risultati rispettivamente 1 e 3 ppb sul grasso per tutti i pesticidi OC e PCB in esame. Entrambi i limiti sono inferiori ai limiti massimi di residuo (LMR) previsti dal Decreto del Ministero della Sanità 19.5.2000 per i pesticidi OC nelle carni. Per quanto riguarda il limite massimo dei PCB nella carne bovina vale quanto riportato per il latte.

La determinazione di piombo e cadmio è stata effettuata a partire da 0,7 g di muscolo fresco mineralizzati mediante un sistema a microonde con 3 ml di acido nitrico al 65% e 0,5 ml di acqua ossigenata, successivamente diluiti a 10 ml con acqua distillata. L'analisi dei due metalli è stata eseguita con lo stesso spettrofotometro ad assorbimento atomico utilizzato per i campioni di latte. Il modificante di matrice ed i programmi termici utilizzati erano gli stessi descritti per il latte. I limiti di rivelazione erano 1 e 0,2 ppb, rispettivamente, per piombo e cadmio.

RISULTATI

Latte

Dieci campioni di latte provenienti da aziende convenzionali hanno mostrato concentrazioni di pesticidi OC superiori al limite di quantificazione. In particolare, in due campioni sono stati riscontrati rispettivamente il *p,p*-DDE e l' α -endosulfan, in tre campioni l'esaclorobenzene e in sei campioni il dieldrin (Tabella 2). Gli stessi pesticidi sono stati rilevati in cinque campioni di latte biologico e, precisamente, in

Tabella 2. Pesticidi organoclorurati e PCB rilevati nei campioni di latte convenzionale e biologico.

Composto	LMR (ppb)	LATTE CONVENZIONALE		LATTE BIOLOGICO	
		campione n°	Concentrazione (ppb)	campione n°	Concentrazione (ppb)
<i>p,p</i> -DDE	40	4	0,44 ± 0,07		
α -endosulfan	4	113	0,51 ± 0,09	B104	0,50 ± 0,10
Esaclorobenzene	10	9	1,01 ± 0,74	B14	1,22 ± 0,20
		10	0,40 ± 0,16		
		12	0,45 ± 0,23		
Dieldrin	6	12	0,70 ± 0,56	B6	0,42 ± 0,05
		119	0,76 ± 0,01	B116	0,63 ± 0,02
		120	0,57 ± 0,32	B123	0,72 ± 0,72
		122	0,52 ± 0,14		
		128	0,60 ± 0,21		
		132	0,48 ± 0,12		
PCB28	Σ PCBs = 4	-	-	B131	0,45 ± 0,27

due campioni sono stati riscontrati rispettivamente l'esaclorobenzene e l' α -endosulfan ed in tre campioni il dieldrin (Tabella 2).

Nessun campione di latte convenzionale ha mostrato livelli superiori al limite di quantificazione analitico per i PCB, mentre un campione di latte biologico ha mostrato la presenza del PCB28 ad una concentrazione di 0,45 ppb (Tabella 2).

La Figura 1 presenta la distribuzione percentuale dei campioni di latte convenzionale in quattro intervalli di concentrazione individuati in funzione dei limiti ana-

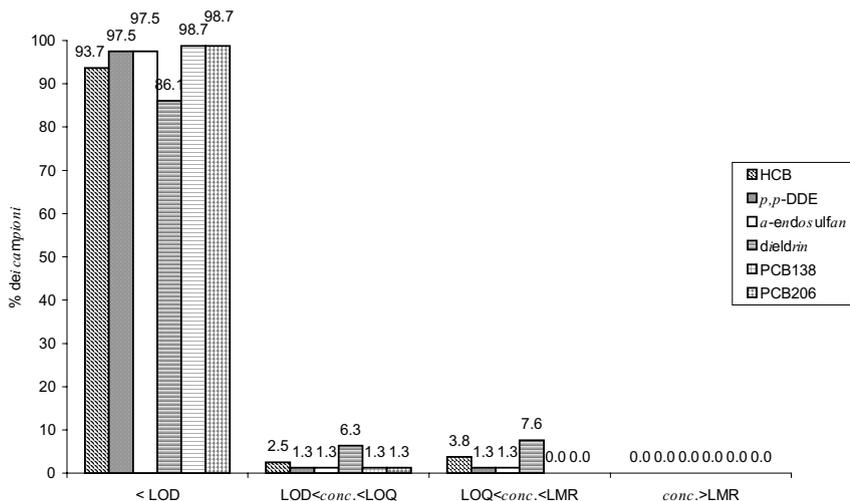


Figura 1. Distribuzione percentuale dei campioni di latte convenzionale in funzione degli intervalli di concentrazione.

litici di determinazione e quantificazione e dei limiti massimi di residuo. Gli intervalli sono: 1) inferiore al limite di rivelazione di 0,2 ppb (<LOD); 2) tra il limite di rivelazione e quello di quantificazione di 0,4 ppb (LOD<conc.<LOQ); 3) tra il limite di quantificazione e il limite massimo di residuo (LOQ<conc.<LMR); 4) superiore al limite massimo di residuo (>LMR). Il grafico mostra la distribuzione dei campioni solo per le molecole che sono state rilevate (HCB, *p,p*-DDE, α -endosulfan, dieldrin, PCB138, PCB206) poiché tutti gli altri pesticidi OC e PCB sono risultati assenti. Nessun campione ha superato il limite massimo di residuo mentre l'incidenza dei campioni nei quali la concentrazione dei composti rilevati è minore di 0,2 ppb (<LOD) era compresa tra 86 e 98,7%. La molecola riscontrata con maggiore frequenza è stata il dieldrin per il quale il 7,6% dei campioni presentava livelli quantificabili (LOQ<conc.<LMR) e il 6,3% livelli compresi tra il LOD e il LOQ.

Il latte biologico ha presentato una situazione sostanzialmente simile, sia per tipo di composti rilevati che per concentrazione degli stessi, anche se la tendenza sembra essere verso un livello di poco inferiore rispetto al latte tradizionale. Le molecole rilevate sono state HCB, α -endosulfan, dieldrin, PCB28, PCB138, PCB206, mentre, a differenza del latte convenzionale, non è stato rilevato il *p,p*-DDE, prodotto di degradazione del DDT. Il dieldrin è stata la molecola rilevata con maggiore frequenza anche nel latte biologico (Figura 2). Si noti, infine, che è stato riscontrato il PCB28, oltre al 138 e 206.

Latte biologico e convenzionale non differivano significativamente nei contenuti di piombo e cadmio che in molti casi erano inferiori ai limiti di rivelazione strumentale. Il piombo era assente nel 58% dei campioni sia biologici che convenzionali mentre il cadmio era assente nel 79% dei campioni biologici e nel 62% dei campioni convenzionali. Il contenuto medio di piombo nei campioni di latte biologico e con-

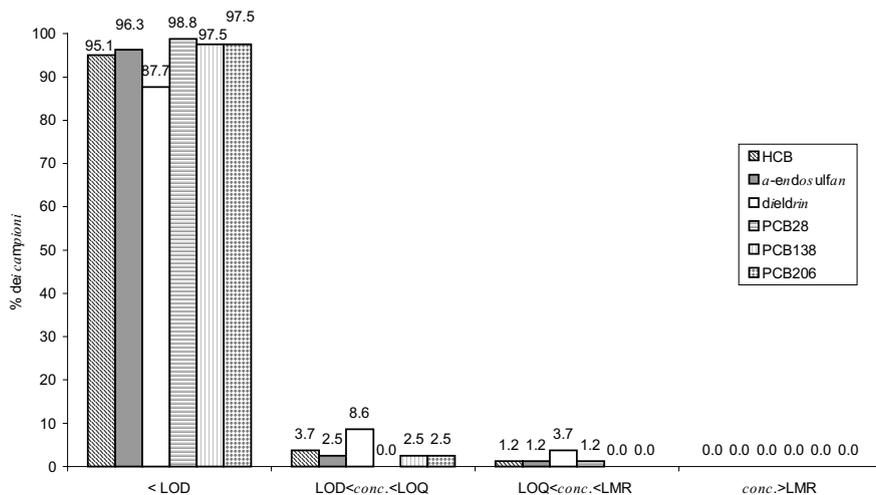


Figura 2. Distribuzione percentuale dei campioni di latte biologico in funzione degli intervalli di concentrazione.

venzionale era 1,85 e 1,68 ppb, rispettivamente (Tabella 4). Tali valori erano molto al di sotto del limite massimo di residuo (20 ppb) fissato per il latte vaccino (Regolamento CE 466/2001). Il contenuto medio di cadmio era 0,09 ppb nel latte biologico e 0,16 ppb nel latte convenzionale (Tabella 4). Il limite massimo di residuo di cadmio nel latte vaccino non è stato fissato.

Il contenuto di aflatoxina M1 nel latte biologico era significativamente maggiore del latte convenzionale (Tabella 5). Un quarto circa dei campioni (29 di tipo biologico e 7 di tipo convenzionale) ha superato il limite di 50 ppt previsto per il latte vaccino dal Regolamento CE 466/2001. La valutazione dei dati per singolo produttore ha messo in evidenza che l'aflatoxina M1 nel latte è un problema di azienda. I valori mediamente più elevati si sono presentati nei campioni prelevati mensilmente in 5 delle 8 aziende di tipo biologico ed, in misura minore, in 2 delle 8 aziende convenzionali. In tutti gli altri casi le concentrazioni dell'aflatoxina M1 si sono attestate al di sotto o leggermente al di sopra del limite di rivelazione analitico.

Tabella 3. Pesticidi organoclorurati e PCB rilevati nei campioni di carne convenzionale e biologica.

Composto	LMR (ppb sul grasso)	CARNE CONVENZIONALE		CARNE BIOLOGICA	
		campione n°	Concentrazione (ppb sul grasso)	campione n°	Concentrazione (ppb sul grasso)
<i>p,p</i> -DDE	1000	-	-	BC2	6,2 ± 1,1
		-	-	BC5	3,9 ± 0,5
		-	-	BC6	5,7 ± 0,8
PCB138	Σ PCBs = 100	-	-	BC6	3,3 ± 0,4

Tabella 4. Concentrazione (ppb) di piombo e cadmio riscontrata nel latte biologico e convenzionale.

	Pb bio.	Pb conv.	Pb tutti	Cd bio.	Cd conv.	Cd tutti
N. campioni	81	79	160	81	79	160
Media	1.85	1.68	1.76	0.09	0.16	0.12
Mediana	<1	<1	<1	<0.1	<0.1	<0.1
Intervallo	<1-11.37	<1-10.49	<1-11.37	<0.1-1.69	<0.1-1.94	<0.1-1.94

Ai fini statistici a campioni con concentrazioni al di sotto del limite di rilevabilità è stata arbitrariamente assegnata una concentrazione uguale a 0.

Tabella 5. Concentrazione (ppt) di aflatoxina M1 riscontrata nel latte biologico e convenzionale.

N. campioni	77	70	147
Media	34.71	20.54	27.96
Mediana	26	15	18
Intervallo	<5-93	<5-66	<5-93

Carne

Nessun campione di carne proveniente da aziende convenzionali ha mostrato concentrazioni superiori al limite di quantificazione (3 ppb sul grasso) per pesticidi OC e PCB. Tre campioni di tipo biologico hanno mostrato la presenza di *p,p*-DDE a concentrazioni comprese tra 3,9 e 6,2 ppb sul grasso. In uno di questi campioni era presente anche il PCB138 alla concentrazione di 3,3 ppb sul grasso (Tabella 3).

Le Figure 3 e 4 riportano, analogamente a quanto fatto per il latte, la distribuzione percentuale dei campioni di carne convenzionale e biologica in quattro intervalli di concentrazione e precisamente: 1) inferiore al limite di rivelazione 1 ppb sul grasso (<LOD); 2) tra il limite di rivelazione e quello di quantificazione 3 ppb sul grasso (LOD<conc.<LOQ); 3) tra il limite di quantificazione e il limite massimo di residuo (LOQ<conc.<LMR); 4) superiore al limite massimo di residuo (>LMR). Il grafico mostra la distribuzione dei campioni solo per le molecole che sono state rilevate, vale a dire HCB, *p,p*-DDE, PCB138, PCB180. Nessun campione di carne convenzionale ha superato il limite massimo di residuo ed il limite di quantificazione per i due PCB. L'HCB e il *p,p*-DDE erano presenti al di sotto del limite di rivelazione nel 90% dei campioni mentre nel rimanente 10% erano compresi tra 1 e 3 ppb sul grasso (Figura 3).

Tutti i campioni di carne di tipo biologico presentavano i due pesticidi OC e i due PCB in concentrazioni inferiori al limite massimo di residuo. La molecola rilevata con maggiore frequenza è stata il *p,p*-DDE che nel 40% dei campioni ha superato 1 ppb sul grasso e nel 30% dei campioni ha superato i 3 ppb sul grasso. Nel 90% dei campioni l'HCB era al di sotto del limite di rivelazione e nel 10% dei casi ha superato i 3 ppb sul grasso. Il PCB138 e il PCB180 erano assenti nell'80% dei campioni. Il PCB138 ha superato 1 ppb sul grasso nel 10% dei campioni e 3 ppb sul grasso in un altro 10%. Il PCB180 era compreso tra 1 e 3 ppb sul grasso nel 20% dei campioni.

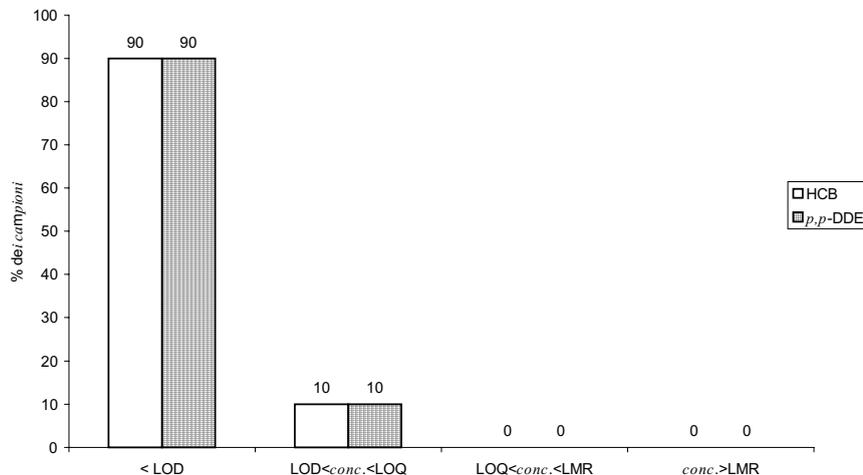


Figura 3. Distribuzione percentuale dei campioni di carne convenzionale in funzione degli intervalli di concentrazione.

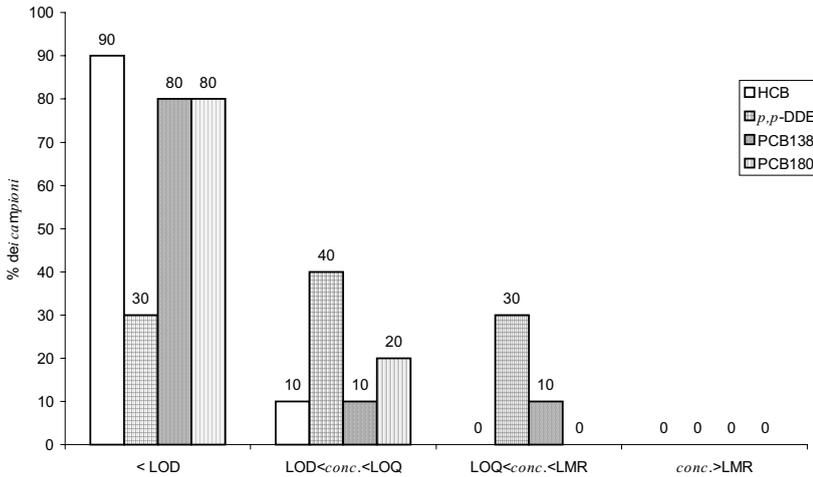


Figura 4. Distribuzione percentuale dei campioni di carne biologica in funzione degli intervalli di concentrazione.

I limiti massimi di residuo di 100 e 50 ppb, rispettivamente, per piombo e cadmio non sono stati superati in nessuno dei campioni sottoposti ad analisi. Le concentrazioni dei due metalli, molto basse in tutti i campioni analizzati, erano significativamente inferiori nella carne di tipo biologico rispetto a quella convenzionale. La concentrazione media di piombo era 5,91 ppb nei campioni biologici e 14,81 ppb nei convenzionali, mentre quella del cadmio era 0,49 e 1,31 ppb (Tabella 6).

Tabella 6. Concentrazione (ppb) di piombo e cadmio riscontrata nella carne biologica e convenzionale.

N. campioni	10	10	20	10	10	20
Media	5.91	14.81	10.57	0.49	1.31	0.92
Mediana	2.8	<1	4.4	<0.2	0.62	0.37
Intervallo	<1-25.4	<1-61.5	<1-61.5	<0.2-2.99	<0.2-4.22	<0.2-4.22

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ricerche come quella di cui si riportano i risultati in questa sede sono piuttosto scarse, soprattutto per le carni ed il latte, per cui non è possibile fare confronti completi con dati disponibili in letteratura. Ricerche condotte negli USA (Baker *et al.*, 2002) su alimenti di origine vegetale hanno messo in evidenza livelli di contaminazione da pesticidi inferiori nei prodotti biologici rispetto ai tradizionali. I prodotti biologici presentavano un terzo delle molecole riscontrate nei prodotti tradizionali e la metà di quelle osservate nei prodotti da sistemi di lotta integrata ed anche la concentrazione dei residui era inferiore nei prodotti biologici rispetto alle altre due categorie.

La contaminazione da piombo, arsenico, cadmio, mercurio, nitrati, nitriti ed alcu-

ne micotossine in alimenti di origine biologica e tradizionale è stata studiata in Francia da Malmauret *et al.* (2002). I prodotti studiati comprendevano la carne, il latte, le uova, vegetali e cereali. Carote e grano saraceno biologici, e grano saraceno tradizionale, presentavano residui superiori al consentito per il piombo; grano saraceno biologico e tradizionale superava i limiti consentiti anche per il cadmio; gli spinaci biologici erano oltre il consentito per i nitrati e le mele biologiche presentavano contaminazione da patulina in alcuni campioni di molto superiore al consentito; grano e orzo sia biologici che tradizionali erano altamente contaminati dal deoxynivalenolo. Carne bovina, suina, di pollame, uova e latte biologici e convenzionali non differivano quanto a residui di metalli pesanti, micotossine e nitrati/nitriti; residui che in tutti i casi erano inferiori ai limiti previsti dalla normativa vigente.

I livelli di contaminazione da pesticidi e PCB riscontrati nel latte della presente sperimentazione sono in sostanziale accordo con quanto riferito da Manghi *et al.* (2002a, b) relativamente a campioni di latte tradizionale.

L'esiguità del campionamento impedisce di trarre conclusioni definitive e la tendenza osservata necessita di essere confermata mediante un campionamento di maggiori dimensioni.

Parole chiave: pesticidi, piombo, cadmio, micotossine, latte, carne, biologici, tradizionali

Key words: pesticides, lead, cadmium, mycotoxins, milk, meat, organic, conventional

RIASSUNTO - Gli autori riportano i risultati di una indagine preliminare sui livelli di contaminazione di latte e carne prodotti con il sistema biologico o con i metodi tradizionali da parte di pesticidi organoclorurati, policlorobifenili, piombo, cadmio e micotossine. I residui di pesticidi e policlorobifenili sia nel latte che nella carne biologici o convenzionali sono inferiori a limiti di legge e solo poche molecole sono state osservate in un numero limitato di campioni. I residui di cadmio e piombo sono pure molto bassi e non presentano differenze tra prodotti biologici e tradizionali. Il contenuto di aflatoxina M1 nel latte biologico è significativamente maggiore di quello riscontrato nel latte convenzionale. Un quarto circa dei campioni (29 di tipo biologico e 7 di tipo convenzionale) supera il limite di 50 ppt previsto per il latte vaccino dal Regolamento CE 466/2001. La contaminazione da aflatoxina M1 nel latte sembra essere un problema di azienda.

SUMMARY - The authors report the results of a preliminary investigation on contamination levels of organic and conventionally produced milk and meat by organochlorine pesticides, polychlorobiphenils (PCB), lead, cadmium and mycotoxins. Pesticides and PCB residues in milk and meat, organic and conventional, are lower than legal limits and the number of molecules observed are very few. Lead and cadmium residues are also very low and do not differ between organic and conventional products. Aflatoxin M1 in biological milk is significantly higher than in conventional milk. One quarter approximately of the samples (29 from organic milk and 7 from conventional one) exceeds the legal limit of 50 ppt set by EU Regulations 466/2001. Such aflatoxin contamination appears to be a producer's based problem.

Ricerca eseguita con fondi FIN e COFIN 2000 (Identificazione di sostanze cancerogene e co-cancerogene negli alimenti: analisi delle fonti di contaminazione e valutazione del rischio nei consumatori)

BIBLIOGRAFIA

- BAKER B.P., BENBROOK C.M., GROTH E. III, BENBROOK K.L. (2002) Pesticide residues in conventional, integrated pest management (IPM)-grown and organic foods: insights from three US data. *Food Additives and Contaminants*, **19**, 427-446.
- BOURN D. and PRESCOTT J. (2002) A comparison of the nutritional value, sensory qualities and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **42**, 1-34.
- BRAY, F. (2001) I pro e i contro della nuova agricoltura. *Rivista delle Tecnologie Alimentari*, **12**, n° 1, 8-14.
- Comunicazione CEE n° 593 del 24.10.2001. Bollettino UE-10-2001, Ambiente (8/27), Punto 1.4.30.
- Decreto del Ministero della Sanita' 19.05.2000. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n° 207 del 05.09.2000.
- DI MUCCIO A., RIZZICA M., AUSILI A., CAMONI I., DOMMARCO R., VERGORI F. (1988) Selective on-column extraction of organochlorine pesticide residues from milk. *Journal of Chromatography*, **456**, 143-148.
- DI MUCCIO A., GENERALI T., ATTARD BARBINI D., PELOSI P., AUSILI A., VERGORI F., GIROLIMETTI S. (1997) Single-step separation of organochlorine pesticide residues from fatty materials by combined use of solid-matrix partition and C₁₈ cartridges. *Journal of Chromatography A*, **765**, 61-68.
- HEUER O.E., PEDERSEN K., ANDERSEN J.S., MADSEN M. (2001) Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Letters in Applied Microbiology*, **33**, 269-274.
- MALMAURET L., PARENT-MASSIN D., HARDY J.L., VERGER P. (2002) Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*, **19**, 524-532.
- MANGHI P., MESSORI A., VENÈ F., DALLATURCA E., CAGNASSO P., PINELLI C. (2002a) IPA and PCB, emergent micropollutants: survey of raw milk. *4th European Pesticide Residues Workshop*, Rome 28-31 May, 207.
- MANGHI P., VATTERONI C., MESSORI A., VENÈ F., DALLATURCA E., CAGNASSO P., PINELLI C. (2002b) Pesticides in milk: ten years of monitoring. *4th European Pesticide Residues Workshop*, Rome 28-31 May, 208.
- Regolamento CEE 2092/91. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea n° L198 del 22.07.1991.
- Regolamento CE 1804/99. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea n° L222 del 24.08.1999.
- Regolamento CE 466/2001. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea n° L077 del 16.03.2001.

L'INTEGRAZIONE CON VANADIO DELLE RAZIONI PER LE GALLINE OVAIOLE ⁽¹⁾

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

INTRODUZIONE

Le ricerche, di cui al titolo, sono parte integrante di un vasto piano di sperimentazione, programmato ed in corso di svolgimento presso il nostro Dipartimento, tendente ad approfondire le conoscenze su alcuni aspetti del problema relativo alla nutrizione oligominerale degli animali in produzione zootecnica.

Per quanto concerne gli oligoelementi considerati essenziali, a tutt'oggi la legislazione del nostro paese ne autorizza l'impiego, in qualità di integratori nella preparazione dei mangimi, limitatamente al cobalto, al ferro, allo iodio, al manganese, al molibdeno, al rame, al selenio ed allo zinco, mentre per altri l'autorizzazione non è ancora operante a motivo delle non sufficienti informazioni offerte dalla letteratura scientifica e tecnica.

Fra questi figura il vanadio, elemento che non da oggi è oggetto di attenzione da parte di numerosi ricercatori, soprattutto stranieri, a motivo delle funzioni che esso è in grado di svolgere nei processi biologici.

E' stato infatti accertato che il vanadio risulta indispensabile per il metabolismo delle catecolamine e dei lipidi e facilita le interazioni tra l'insulina ed i suoi recettori specifici presenti nei tessuti bersaglio, tra cui i muscoli ed il tessuto adiposo. Sembra essere inoltre coinvolto nel metabolismo del calcio, nello sviluppo e nella crescita di ossa e denti, nella riproduzione, nella regolazione degli zuccheri nel sangue, nella produzione dei globuli rossi (1, 2).

Con la dieta il vanadio viene assunto principalmente nella forma $H_2VO_4^-$, che penetra all'interno delle cellule attraverso il medesimo meccanismo di trasporto del fosforo. Nel tratto gastrointestinale va incontro ad una riduzione, trasformandosi in VO^{2+} e viene poi rapidamente escreto attraverso le feci. La quota ritenuta viene convertita rapidamente in forme chimiche più comuni e la sua distribuzione è indipendente dallo stato di ossidazione o dalla natura dell'elemento al momento dell'assunzione. L'organo di deposito per eccellenza sembra essere l'osso, dove il vanadio sotto forma VO_4^{3-} va a sostituire il PO_4^{3-} (3).

¹ Ricerche effettuate con il contributo finanziario del M.U.R.S.T. (quota 60%). Indirizzo per corrispondenza: Prof. Alberto Bonomi - Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione - Via del Taglio, 8 - 43100 PARMA. Tel. 0521 032620; fax 0521 032622; e-mail: alberto.bonomi@unipr.it

² Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti. Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione. Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma.

Per quanto riguarda il trasporto sono state osservate alcune relazioni fra il metabolismo del vanadio e quello del ferro, facendo supporre che la proteina transferrina possa essere coinvolta anche nel trasporto di tale elemento (4).

Il vanadio occupa un posto particolare fra i biometalli, in quanto, come il molibdeno, può partecipare ai processi biologici tanto nella sua forma cationica, quanto in quella anionica. In questa ultima forma esso si lega stabilmente con il fosforo, ma nella sua forma cationica presenta il caratteristico comportamento di un metallo di transizione, competendo cioè con altri cationi per i siti di coordinazione in composti e ligandi. Questo duplice comportamento, unitamente alla capacità di modificare la sua geometria di coordinazione e il suo stato ossidativo, rende il metabolismo del vanadio estremamente particolare (3).

L'attenzione dei ricercatori è volta principalmente allo studio delle interazioni delle diverse forme di vanadio con un notevole numero di biomolecole ed altri ligandi di interesse biologico e/o farmacologico, come contributo ad una migliore conoscenza delle possibili funzioni ed effetti che lo stesso potrebbe avere negli organismi superiori (5).

Circa il fabbisogno in vanadio degli animali in produzione zootecnica, la letteratura consultata non è e non può essere esauriente; infatti esistono non poche incertezze sia sulla quantità di vanadio necessaria per evitare turbe carenziali sia sulla quantità "ottimale", capace cioè di assicurare il perfetto stato di salute e di produttività.

D'altra parte bisogna ricordare che il fabbisogno in vanadio è legato alla presenza nella razione di altri elementi minerali, che possono condizionare l'assorbimento dell'elemento in questione.

Secondo alcuni ricercatori (6, 7) il dosaggio minimo di vanadio, al di sotto del quale potrebbero instaurarsi stati carenziali, potrebbe variare fra i 10 e i 30 p.p.b.

E' stato possibile accertare che in carenza di vanadio i broilers palesano un rallentamento della velocità di crescita, piumaggio difettoso e ridotto sviluppo delle ossa (8), mentre nelle capre la carenza dell'oligoelemento influenza negativamente l'efficienza riproduttiva e la produzione quanti-qualitativa del latte (9, 10).

Circa gli effetti del vanadio sulle performances degli animali e sui parametri zoeconomici la letteratura è estremamente parca di notizie.

E' stato osservato che l'integrazione della razione con vanadio alla dose di 4 p.p.m. è in grado di migliorare nei broilers l'accrescimento ponderale e l'utilizzazione dell'alimento (11).

Gli effetti tossici del vanadio sono stati studiati nei polli.

Nelle ovaiole l'aggiunta alla razione di 30 p.p.m. di vanadio ha fatto registrare un calo della ovodeposizione e un peggioramento della qualità delle uova (12+14).

Utilizzando l'ossido di vanadio (titolo in V 55%) abbiamo già effettuato una serie di sperimentazioni, che hanno interessato i vitelli in fase di svezzamento (15), le manzette e le manze (16), i vitelli da macello a carne bianca (17), i vitelloni (18), gli agnelli leggeri (19), le scrofe (20) e i suini in fase di svezzamento (21).

Le nostre ricerche hanno consentito di rilevare che l'integrazione delle razioni con vanadio è in grado di condizionare favorevolmente l'efficienza produttiva degli animali.

Nel piano generale di ricerca, oltre le suddette sperimentazioni, è stato previsto lo studio del problema relativo all'integrazione con vanadio delle razioni per le pic-

cole specie, nei confronti delle quali le notizie riportate in letteratura sono piuttosto scarse.

Sperimentando sui tacchini da carne (22), sulle faraone da carne (23), sulle anatre da carne (24), sui conigli da carne (25) abbiamo potuto accertare che il vanadio, aggiunto ai mangimi alle dosi di 4 e di 8 p.p.m., influenza positivamente l'estrinsecazione delle attitudini produttive.

Considerati i favorevoli risultati ottenuti ci è sembrato opportuno spaziare oltre andando ad interessare l'allevamento delle galline ovaiole.

MATERIALE E METODI

Per la prova si è fatto ricorso a 1.000 galline Hubbard Golden Comet, di cinque mesi di età e del peso medio oscillante attorno ai 2.000 grammi in allevamento per la produzione di uova da consumo.

Tab. 1 – Formulazione del mangime composto integrato.

Componenti	Kg
Farina di mais	50.00
Farina di orzo	5.00
Farina di soia (estr. 50% prot.)	10.00
Farina di girasole (estr. 45% prot.)	5.00
Farina di pesce	2.00
Polvere di latte magro	3.00
Farina di medica dis.	3.00
Crusca di frumento	8.00
Glutine di mais giallo	2.00
Lievito di birra	1.00
Grasso ⁽¹⁾	2.00
Carbonato di calcio	7.00
Fosfato bicalcico	1.00
Cloruro di sodio	0.40
Complesso vit. e oligomin. ⁽²⁾	0.60

⁽¹⁾ – Il grasso è rappresentato da una associazione, in parti uguali, di olio di palma e di olio di cocco.

⁽²⁾ – Composizione del complesso vitaminico e oligominerale (per 1 kg): Vit. A: U.I. 2.600.000; Vit. D3: U.I. 500.000; Vit. E: mg 10.000; Vit. K: mg 1.000; Vit. B1: mg 600; Vit. B2: mg 1.200; Vit. B6: mg 1.200; Vit. B12: mg 6; Vit. PP: mg 9.000; Vit. H: mg 12; Vit. C: mg 40.000; Ac. d- pantotenico: mg 2.600; Ac. folico: mg 300; Colina cloruro: mg 100.000; DL-metionina: mg 60.000; B.H.T.: mg 3.000; Beta-apo-8'-carotenale: mg 8.000; Co: mg 40; Fe: mg 20.000; Cu: mg 1.400; Zn: mg 11.000; Mn: mg 16.000; I: mg 300; Se: mg 20; supporto vegetale q.b. a g 1.000.

Gli animali, divisi in quattro gruppi (contrassegnati con i numeri dall'1 al 4) di 200 soggetti cadauno e sistemati in batteria nel numero di tre per ogni scomparto, sono stati allevati per un periodo di 12 mesi.

I soggetti del gruppo 1, considerato di "controllo", sono stati alimentati, durante l'intero ciclo, con un mangime composto integrato, la cui composizione è riportata nella tabella n. 1.

Per l'alimentazione dei gruppi 2, 3, 4, considerati di "esperimento", è stato impiegato lo stesso mangime integrato però con vanadio nelle rispettive dosi di 2, di 4 e di 8 p.p.m.

E' stato utilizzato ossido di vanadio (V:55%) di produzione Merck, messo gentilmente a nostra disposizione dalla Ditta Manteka di Bibbiano (RE).

Nella tabella n. 2 sono riportati i risultati dell'analisi chimica condotta sul mangime. Per la determinazione del contenuto in principi immediati si è fatto ricorso alla tecnica consigliata dalla C.V.A. dell'A.S.P.A. (26).

Tab. 2 – Analisi chimica del mangime composto integrato.

Umidità	%	12.00
Ceneri gregge	"	11.00
Proteina greggia	"	18.00
Sostanze grasse gregge	"	4.00
Cellulosa greggia	"	4.50
Estrattivi inazotati	"	50.50

Nel corso della prova sono stati verificati, giornalmente, lo stato di salute degli animali, la percentuale di ovodeposizione, il peso delle uova e i consumi alimentari mentre mensilmente l'incremento ponderale individuale, la composizione chimica centesimale del tuorlo delle uova nonché il grado di pigmentazione dello stesso e alcuni parametri ematici.

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,...,4) ;

e_{ij} = effetto casuale residuo.

RISULTATI E DISCUSSIONE

A) – Lo stato di salute.

Lo stato sanitario dell'allevamento è risultato soddisfacente durante l'intero periodo sperimentale.

Il sensorio e le grandi funzioni organiche hanno avuto uno svolgimento regolare senza denunciare variazioni nel confronto fra i soggetti di controllo e quelli trattati con vanadio ai vari dosaggi considerati.

Il tasso di mortalità è stato caratterizzato da valori piuttosto bassi, avendo essi oscillato attorno al 4%.

B) – La ovodeposizione

I dati relativi alla percentuale di uova prodotte giornalmente hanno permesso di ottenere i valori medi mensili raccolti nella tabella n. 3 (v. anche grafico 1).

Dall'esame della tabella appare evidente che:

1) - al termine del 1°, del 2° e del 3° mese di esperimento le galline che hanno ricevuto mangime addizionato di vanadio alle dosi di 2 p.p.m. (gruppo 2), di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) hanno fatto registrare un tasso di ovodeposizione statisticamente non diverso ($P>0,05$) rispetto a quello dei controlli (gruppo 1);

2) – al termine del 4°, del 5° e del 6° mese di esperimento mentre l'azione del vanadio, alla sua dose di impiego di 2 p.p.m. (gruppo 2), non ha subito sostanziali modificazioni rispetto al periodo precedente (le differenze fra il gruppo 1 e il gruppo 2 non sono risultate significative – $P>0,05$ –) è invece migliorata l'efficacia dell'oli-goelemento utilizzato alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4). Dal confronto fra i gruppi 3 e 4 e il gruppo 1 sono emerse differenze significative ($P<0,05$) pari, rispettivamente, al 7,50% e al 8,30% per il 4° mese, al 7,70% e al 8,50% per il 5°, al 8,30% e al 9,00% per il 6°.

Tab. 3 – Percentuali di ovodeposizione (valori medi \pm D.S.).

Periodi (mesi)	Gruppi	1	2	3	4
1	1	49.50 \pm 1.51	50.00 \pm 1.44	50.20 \pm 1.48	50.41 \pm 1.52
2	2	70.00 \pm 1.70	70.60 \pm 1.62	70.81 \pm 1.64	70.94 \pm 1.68
3	3	75.16 \pm 1.79	75.48 \pm 1.82	75.62 \pm 1.88	75.88 \pm 1.93
4	4	79.00a \pm 1.62	79.63a \pm 1.82	85.00b \pm 1.63	85.50b \pm 1.69
5	5	81.10a \pm 1.74	82.15a \pm 1.83	87.31b \pm 1.78	87.88b \pm 1.82
6	6	83.30a \pm 1.78	83.86a \pm 1.85	90.18b \pm 1.70	90.74b \pm 1.82
7	7	80.10a \pm 1.64	81.30a \pm 1.72	85.26b \pm 1.80	87.50c \pm 1.74
8	8	75.62a \pm 1.68	77.00a \pm 1.70	82.10b \pm 1.76	85.60c \pm 1.78
9	9	73.00a \pm 1.75	74.50a \pm 1.83	79.00b \pm 1.90	83.00c \pm 1.91
10	10	70.19a \pm 1.42	70.80a \pm 1.38	76.48b \pm 1.44	80.00c \pm 1.45
11	11	68.62a \pm 1.53	69.00a \pm 1.62	73.34b \pm 1.68	77.20c \pm 1.71
12	12	66.50a \pm 1.39	67.30a \pm 1.46	71.50b \pm 1.40	74.85c \pm 1.45

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

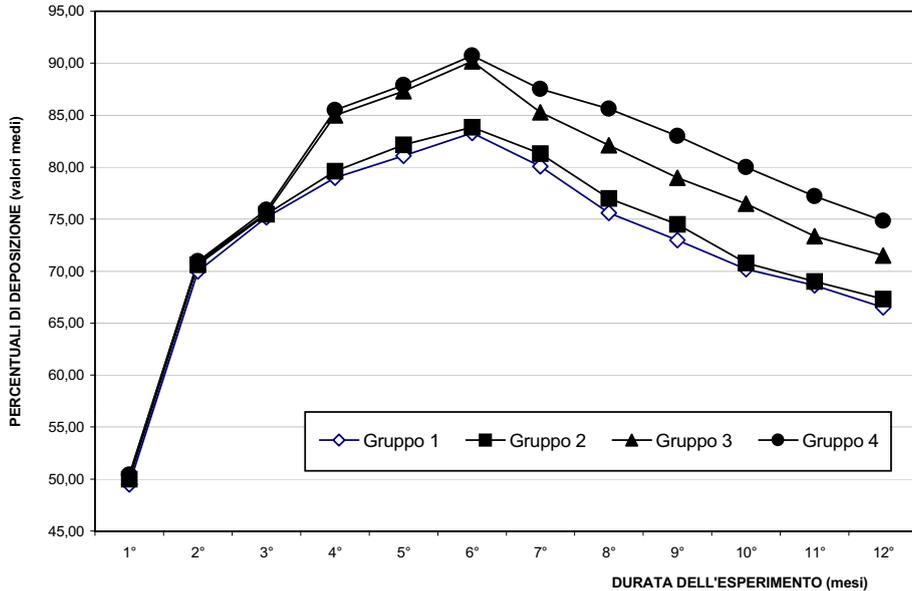


Grafico n. 1 - La ovodeposizione

Le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4 non hanno trovato conferma ($P>0,05$);

3) – al termine del 7° , dell'8° e del 9° mese di esperimento si è verificata una caduta dell'ovodeposizione che ha interessato tutti i soggetti con maggiore o minore intensità a seconda dei gruppi di appartenenza. Il fenomeno si è reso soprattutto palese in seno al gruppo 1 (controllo), il quale, da un valore del 83,30%, raggiunto al 6° mese, è passato a quote del 80,10%, del 75,62% e del 73,00% nell'ordine per il 7°, l'8° e il 9° mese. Ciò ha comportato, nei confronti dei soggetti trattati con vanadio alle dosi di 2 p.p.m. (gruppo 2), di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. di mangime (gruppo 4), differenze in meno pari, rispettivamente, al 1,50%, al 6,50% e al 9,00% per il 7° mese, al 1,80%, al 8,50% e al 13,00% per l'8°, al 2,00%, al 8,70% e al 14,00% per il 9°.

Fatta eccezione per le differenze emerse dal confronto fra il gruppo 1 e il gruppo 2 ($P>0,05$) tutte le altre sono risultate significative ($P<0,05$);

4) – al termine del 10°, dell'11° e del 12° mese di esperimento, cioè negli ultimi tre mesi del ciclo produttivo, il vanadio, impiegato alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. di mangime (gruppo 4), ha fatto registrare un potenziamento della sua attività ($P<0,05$), permettendo ai soggetti di avvantaggiarsi, nei confronti dei controlli (gruppo 1), in ragione, nell'ordine, del 9,00% e del 14,50% per il 10° mese, del 7,00% e del 13,00% per l'11°, del 7,50% e del 12,50% per il 12°.

Pure significative ($P<0,05$) le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2) il vanadio non ha costituito fonte di variazione ($P>0,05$) per la ovodeposizione.

C) – Il peso delle uova.

Le uova sono state pesate giornalmente. Nella tabella n. 4 sono riuniti i valori medi mensili (v. anche grafico 2).

Tab. 4 – Peso delle uova (g - valori medi \pm D.S.).

Periodi	Gruppi (mesi)	1	2	3	4
	1	55.80 \pm 0.50	55.96 \pm 0.44	55.98 \pm 0.48	56.10 \pm 0.46
	2	56.48 \pm 0.55	56.70 \pm 0.62	56.74 \pm 0.63	56.80 \pm 0.58
	3	57.60 \pm 0.59	57.85 \pm 0.64	57.90 \pm 0.68	57.96 \pm 0.70
	4	58.86a \pm 0.74	58.94a \pm 0.78	60.71b \pm 0.81	62.50c \pm 0.83
	5	59.50a \pm 0.86	59.78a \pm 0.83	62.00b \pm 0.89	63.80c \pm 0.90
	6	61.10a \pm 0.94	61.36a \pm 1.00	63.37b \pm 1.10	65.00c \pm 1.15
	7	63.00a \pm 1.08	63.50a \pm 1.12	65.30b \pm 1.15	67.12c \pm 1.18
	8	64.20a \pm 1.19	64.70a \pm 1.25	66.81b \pm 1.20	69.00c \pm 1.17
	9	65.50a \pm 1.28	65.86a \pm 1.30	68.00b \pm 1.31	70.54c \pm 1.27
	10	66.70a \pm 1.37	67.10a \pm 1.40	69.85b \pm 1.38	72.00c \pm 1.36
	11	68.00a \pm 1.50	68.60a \pm 1.46	71.50b \pm 1.45	73.30c \pm 1.42
	12	68.50a \pm 1.44	69.00a \pm 1.41	73.41b \pm 1.48	75.50c \pm 1.51

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

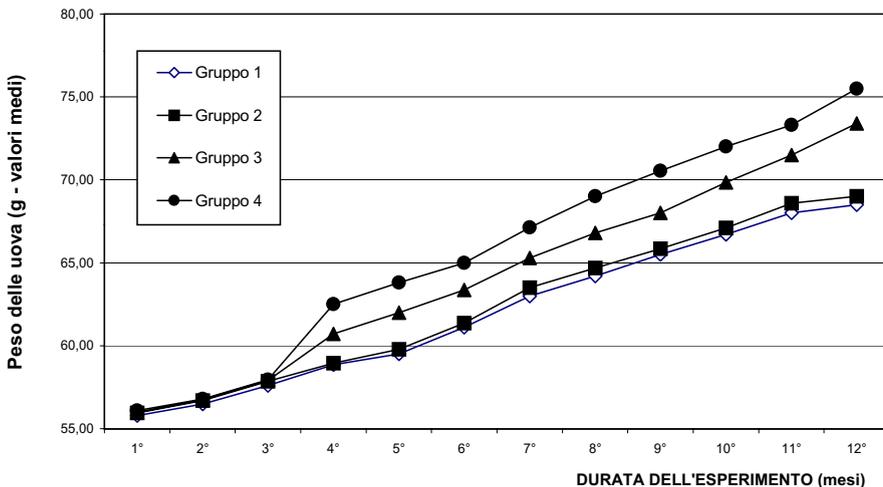


Grafico n. 2 - Il peso delle uova.

Dall'esame della tabella si evince che:

1) - al termine del 1°, del 2° e del 3° mese di esperimento le differenze fra i pesi medi delle uova prodotte in seno ai quattro gruppi non sono significative ($P > 0,05$);

2) - al termine del 4°, del 5° e del 6° mese di esperimento le galline razionate con mangime contenente vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) hanno prodotto uova più pesanti a paragone con i controlli (gruppo 1) sulla base di differenze significative ($P < 0,05$) pari, rispettivamente al 3,00% e al 6,00% per il 4° mese, al 4,00% e al 7,00% per il 5°, al 4,00% e al 6,50% per il 6°. Significative ($P < 0,05$) anche le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Risultanze pressoché analoghe a quelle dei controlli ($P > 0,05$) sono state rilevate per i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2);

3) - al termine del 7°, dell'8° e del 9° mese di esperimento il peso delle uova deposte dalle galline alimentate con il mangime addizionato di vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) si è sempre manifestato superiore rispetto a quello palesato dalle uova dei controlli (gruppo 1) in virtù di differenze significative ($P < 0,05$) pari, nell'ordine, al 3,50% e al 6,50% per il 7° mese, al 4,00% e al 7,50% per l'8°, al 4,00% e al 8,00% per il 9°.

Hanno raggiunto la significatività statistica ($P < 0,05$) anche le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Tab. 5 – Consumi di alimento per la produzione di una dozzina di uova
(Kg di mangime – valori medi \pm D.S.).

Periodi (mesi)	Gruppi	1	2	3	4
1		2.35 \pm 0.30	2.31 \pm 0.36	2.20 \pm 0.31	2.10 \pm 0.29
2		2.40 \pm 0.36	2.36 \pm 0.38	2.27 \pm 0.40	2.15 \pm 0.42
3		2.67 \pm 0.40	2.60 \pm 0.39	2.40 \pm 0.43	2.31 \pm 0.45
4		2.68c \pm 0.16	2.56c \pm 0.15	2.40b \pm 0.17	2.20a \pm 0.13
5		2.70c \pm 0.17	2.65c \pm 0.14	2.43b \pm 0.18	2.22a \pm 0.18
6		2.72c \pm 0.21	2.68c \pm 0.19	2.45b \pm 0.19	2.25a \pm 0.20
7		2.90c \pm 0.17	2.81c \pm 0.16	2.60b \pm 0.15	2.40a \pm 0.17
8		2.95c \pm 0.16	2.90c \pm 0.14	2.65b \pm 0.15	2.45a \pm 0.16
9		2.98c \pm 0.18	2.93c \pm 0.20	2.71b \pm 0.19	2.47a \pm 0.19
10		3.15c \pm 0.17	3.00c \pm 0.21	2.75b \pm 0.22	2.50a \pm 0.20
11		3.30c \pm 0.23	3.22c \pm 0.22	2.86b \pm 0.25	2.60a \pm 0.21
12		3.50c \pm 0.26	3.40c \pm 0.28	3.10b \pm 0.23	2.76a \pm 0.25

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

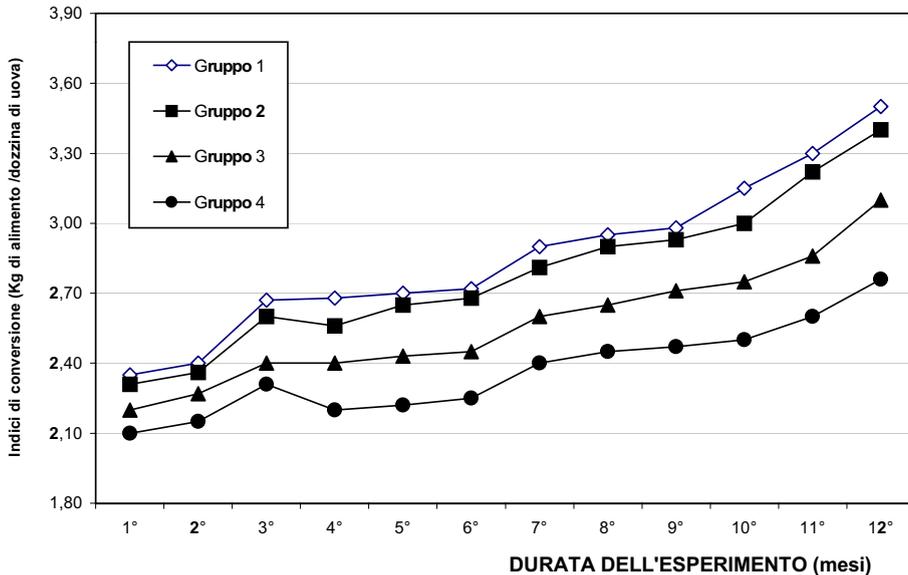


Grafico n. 3 - Il consumo di alimento

Risultanze pressoché analoghe a quelle dei controlli sono state registrate per i soggetti razionati con mangime contenente vanadio alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2);

4) – al termine del 10°, dell'11° e del 12° mese di esperimento, ultimi tre mesi di produzione, il vanadio impiegato alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. di mangime (gruppo 4) ha continuato a condizionare favorevolmente la pezzatura delle uova, facendo registrare differenze significative ($P < 0,05$), nel paragone fra i soggetti di esperimento e quelli di controllo (gruppo 1), pari, rispettivamente, al 5,00% e al 8,00% per il 10° mese, al 5,00% e al 8,00% per l'11°, al 7,00% e al 10,00% per il 12°.

Significative ($P < 0,05$) anche le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Non hanno trovato conferma ($P > 0,05$) le differenze fra i controlli e i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2).

D) – Il consumo di alimenti.

I valori medi mensili relativi alle quantità di alimento resisi necessarie per la produzione di una dozzina di uova sono riportati nella tabella n. 5 (v. anche grafico 3). Dall'esame della tabella appare evidente che gli indici di conversione sono stati condizionati positivamente dal vanadio contenuto nel mangime alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) in virtù di differenze significative ($P < 0,05$), nel paragone con il gruppo 1, pari, nell'ordine e per l'intero ciclo, al 10,00% e al 17,00%. Significativa anche la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Non significative ($P > 0,05$) le differenze fra i controlli e i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2).

E) – L'incremento ponderale.

L'indagine è stata effettuata allo scadere di ogni mese.

I risultati ottenuti, compendianti nella tabella n. 6 (v. anche grafico 4), consentono di osservare che:

1) - al termine del 1°, del 2° e del 3° mese di esperimento le differenze fra i soggetti dei quattro gruppi non hanno raggiunto la significatività statistica ($P > 0,05$);

2) - al termine del 4°, del 5° e del 6° mese di esperimento il vanadio, contenuto nel mangime alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4), ha condizionato positivamente l'accrescimento ponderale ($P < 0,05$), permettendo alle galline di avvantaggiarsi, rispetto ai controlli (gruppo 1), in ragione del 8,50% e del 15,00 per il 4° mese, del 9,00% e del 15,50% per il 5°, del 8,00% e del 13,00% per il 6°. Le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4 hanno trovato conferma ($P < 0,05$).

Risultanze non dissimili da quelle dei controlli sono state registrate per i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2);

3) - al termine del 7°, dell'8° e del 9° mese di esperimento il vanadio, addizionato al mangime alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4), ha continuato a manifestare la sua favorevole azione sulla crescita delle galline con una maggiore intensità rispetto al periodo precedente. Nei confronti dei controlli (gruppo 1) i soggetti trattati si sono rivelati più pesanti in virtù di differenze significative ($P < 0,05$) pari, rispettivamente, al 7,00% e al 13,00% per il 7° mese, al 7,00% e al 12,00% per l'8°, al 7,00% e al 13,00% per il 9°. Significative ($P < 0,05$) anche le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2) il vanadio non ha esercitato alcuna azione positiva ($P > 0,05$) sull'accrescimento ponderale;

4) - al termine del 10°, dell'11° e del 12° mese di esperimento il vanadio ha ulteriormente migliorato la sua efficacia sull'accrescimento ponderale allorché ha trovato posto nel mangime alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4), facendo registrare, nei confronti dei controlli (gruppo 1), differenze significative

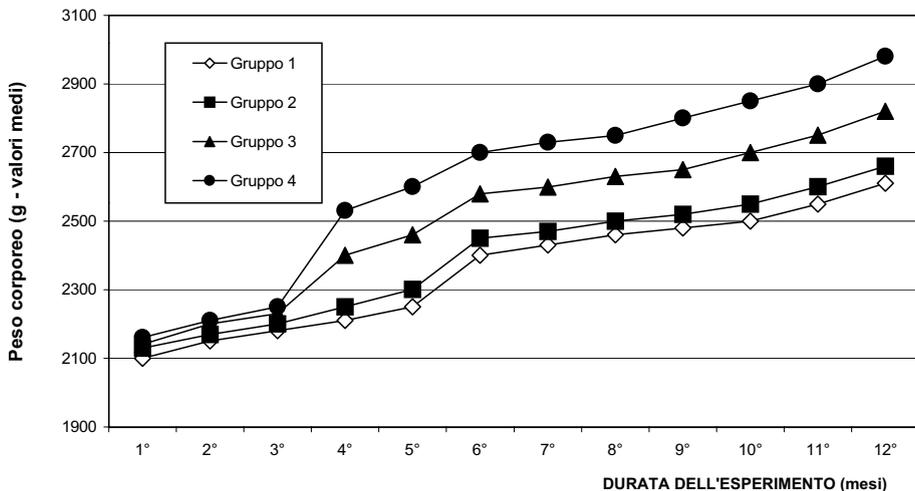


Grafico n. 4 - Incremento ponderale

Tab. 6 – Incremento ponderale (g – valori medi \pm D.S.)

Periodi Gruppi (mesi)	1	2	3	4
1	2.100,30 \pm 90,6	2.130,11 \pm 86,40	2.140,61 \pm 91,18	2.160,36 \pm 92,00
2	2.150,60 \pm 96,5	2.170,13 \pm 91,13	2.200,16 \pm 98,11	2.210,40 \pm 97,10
3	2.180,39 \pm 100,10	2.200,16 \pm 101,62	2.230,18 \pm 105,13	2.250,11 \pm 104,17
4	2.210,60a \pm 103,30	2.250,30a \pm 100,10	2.400,38b \pm 105,11	2.530,61c \pm 106,38
5	2.250,37a \pm 95,21	2.300,60a \pm 98,60	2.460,71b \pm 103,30	2.600,10c \pm 105,10
6	2.400,20a \pm 98,62	2.450,38a \pm 101,11	2.580,10b \pm 100,00	2.700,11c \pm 100,00
7	2.430,16a \pm 95,20	2.470,21a \pm 92,30	2.600,00b \pm 96,15	2.730,16c \pm 98,11
8	2.460,18a \pm 98,11	2.500,10a \pm 100,00	2.630,16b \pm 103,00	2.750,16c \pm 101,30
9	2.480,11a \pm 102,60	2.520,18a \pm 101,30	2.650,26b \pm 105,10	2.800,31c \pm 107,11
10	2.500,30a \pm 104,16	2.550,16a \pm 106,18	2.700,20b \pm 109,30	2.850,19c \pm 110,60
11	2.550,26a \pm 108,32	2.600,31a \pm 111,16	2.750,40b \pm 115,20	2.900,36c \pm 117,31
12	2.610,20a \pm 110,36	2.660,34a \pm 115,60	2.820,16b \pm 109,10	2.980,25c \pm 113,37

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

($P < 0,05$) pari, nell'ordine, al 8,00% e al 14,00% per il 10° mese, al 8,00% e al 15,00% per l'11°, al 9,00% e al 15,00% per il 12,00%. Il livello di significatività ($P < 0,05$) è stato raggiunto anche nella comparazione fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Non significative ($P > 0,05$) le differenze fra i controlli e i soggetti razionati con il mangime contenente il vanadio alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2).

F) – Il colore del tuorlo delle uova.

Per la valutazione del grado di pigmentazione dei tuorli è stata utilizzata la metodica riportata in A.O.A.C. (27). Con tale metodica l'intensità del colore dell'estratto acetone di una certa quantità di tuorlo viene stimata allo spettrofotometro in base ad una curva standard di assorbimento di soluzione acetone a diverse concentrazioni di β -carotene.

L'indagine è stata condotta mensilmente sulle uova prodotte nel corso di una settimana da 10 soggetti scelti nell'ambito di ciascun gruppo.

Nella tabella n. 7 sono raccolte le risultanze ottenute, le quali permettono di rilevare che:

1) - al termine del 1°, del 2° e del 3° mese di esperimento non si sono verificate modificazioni ($P > 0,05$) nel grado di pigmentazione dei tuorli comunque riferibili ai particolari regimi alimentari adottati;

2) - al termine del 4°, del 5°, del 6° e del 7° mese di esperimento il vanadio, addizionato al mangime alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) ha influenzato positivamente il grado di pigmentazione dei tuorli.

Dalla comparazione fra i controlli (gruppo 1) e i soggetti trattati sono emerse differenze significative ($P < 0,05$) pari, rispettivamente, al 5,00% e al 6,00% per il 4° mese, al 5,00% e al 7,00% per il 5°, al 8,00% e al 9,00% per il 6°, al 8,00% e al 10,00% per il 7°.

Non significative ($P > 0,05$) le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2) il vanadio non ha costituito fonte di variazione per la pigmentazione dei tuorli ($P > 0,05$);

3) - al termine dell'8°, del 9°, del 10°, dell'11° e del 12° mese di esperimento il vanadio contenuto nel mangime alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) ha continuato a svolgere la sua azione positiva sulla pigmentazione dei tuorli con una intensità più marcata rispetto al periodo precedente soprattutto con riferimento al dosaggio più elevato. Dal confronto fra i controlli (gruppo 1) e i soggetti interessati dal trattamento sono scaturite differenze significative ($P < 0,05$) pari, nell'ordine, al 8,00% e al 13,00% per l'8° mese, al 9,00% e al 15,00% per il 9°, al 9,50% e al 15,50% per il 10°, al 10,00% e al 16,00% per l'11°, al 11,00% e al 17,00% per il 12°.

Significative ($P < 0,05$) anche le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Non hanno trovato conferma ($P > 0,05$) le differenze fra i controlli e i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2).

G) – La composizione chimica-centesimale del tuorlo delle uova.

Analizzando mensilmente le uova prodotte da 10 galline, scelte nell'ambito di ciascun gruppo, sono stati ricavati i valori compendati nella tabella n. 8, i quali met-

Tab. 7- γ -equivalenti di β -carotene per cc di tuorlo (valori medi \pm D.S.)

Periodi (mesi)	Gruppi	1	2	3	4
1		30.60 \pm 0.62	30.75 \pm 0.56	30.86 \pm 0.58	30.91 \pm 0.63
2		30.84 \pm 0.70	31.91 \pm 0.66	31.10 \pm 0.64	31.15 \pm 0.69
3		31.50 \pm 0.64	31.78 \pm 0.68	31.83 \pm 0.72	31.96 \pm 0.75
4		31.63a \pm 1.00	31.80a \pm 0.95	33.00b \pm 0.97	33.25b \pm 1.05
5		31.85a \pm 1.12	32.00a \pm 1.15	33.40b \pm 1.10	33.62b \pm 1.10
6		32.12a \pm 1.20	32.27a \pm 1.18	34.50b \pm 1.16	34.71b \pm 1.16
7		32.60a \pm 1.15	32.85a \pm 1.17	34.90b \pm 1.13	35.22b \pm 1.14
8		32.90a \pm 1.20	33.20a \pm 1.12	35.38b \pm 1.20	37.00c \pm 1.15
9		33.20a \pm 1.30	33.56a \pm 1.26	35.70b \pm 1.28	37.68c \pm 1.25
10		33.62a \pm 1.24	33.80a \pm 1.28	35.92b \pm 1.31	38.00c \pm 1.30
11		33.90a \pm 1.37	34.50a \pm 1.39	36.70b \pm 1.42	39.10c \pm 1.40
12		34.30a \pm 1.28	34.70a \pm 1.25	37.00b \pm 1.20	39.50c \pm 1.24

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

Tab. 8 – Composizione chimica centesimale del tuorlo delle uova (valori medi \pm D.S.)

Gruppi	1	2	3	4
Umidità	50.30 \pm 0.38	50.10 \pm 0.41	50.45 \pm 0.45	50.62 \pm 0.40
Ceneri gregge	1.27 \pm 0.09	1.24 \pm 0.11	1.26 \pm 0.12	1.30 \pm 0.08
Proteina greggia	17.00 \pm 0.30	17.13 \pm 0.36	17.11 \pm 0.38	17.20 \pm 0.40
Sostanze grasse gregge	31.18 \pm 0.70	31.33 \pm 0.78	30.95 \pm 0.81	30.69 \pm 0.80
Estrattivi inazotati	0.25 \pm 0.09	0.20 \pm 0.08	0.23 \pm 0.08	0.19 \pm 0.10

tono in luce che i contenuti di acqua, di ceneri, di proteine e di lipidi del tuorlo sono rimasti entro i limiti della normalità senza il riscontro di variazioni ($P>0,05$) nel confronto fra i controlli (gruppo 1) e i soggetti di esperimento (gruppi 2, 3, 4).

H) – I parametri ematici.

Le indagini, condotte sui campioni di sangue prelevati con una periodicità mensile da 10 galline scelte nell'ambito di ciascun gruppo, hanno fornito le risultanze riportate nelle tabelle nn. 9 e 10. Dall'esame delle tabelle è possibile osservare che:

- i contenuti di proteine totali, di albumina e di globuline non hanno fatto registrare modificazioni ($P>0,05$) a seguito del ricorso al vanadio ai vari dosaggi considerati;

- il tasso di glucosio è risultato più elevato nel sangue delle galline razionate con mangime contenente vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4), sulla base di differenze significative ($P<0,05$), nei confronti dei controlli (gruppo 1), pari, nell'ordine, al 26,00% e al 42,00%. Pure significativa ($P<0,05$) la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Non ha raggiunto la significatività statistica ($P>0,05$) la differenza fra i controlli e i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2);

- i tenori di bilirubina totale, di colesterolo totale, di col. HDL, di col. LDL, di trigliceridi, di fosfatasi alcalina, di fosfolipidi, di lipidi totali sono stati caratterizzati da valori più bassi nelle galline alimentate con mangimi contenenti vanadio alle dosi di 2 p.p.m. (gruppo 2), di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.b. (gruppo 4) in virtù però di differenze, rispetto ai controlli (gruppo 1), che non sono risultate significative ($P>0,05$);

- le lipoproteine α e β , determinate nel sangue delle galline che hanno ricevuto vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. di mangime (gruppo 4), sono state caratterizzate, rispettivamente, da variazioni in più ed in meno nei confronti del lipidogramma dei controlli (gruppo 1), sulla base di differenze significative ($P<0,05$) pari, rispettivamente, al 35,00% e al 65,00% per le α , al 20,00% e al 37,00% per le β .

Hanno trovato conferma ($P<0,05$) anche le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Tab. 9 – Parametri ematici (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Proteine totali	g/100 ml	6.70 \pm 0.25	6.65 \pm 0.22	6.62 \pm 0.23	6.68 \pm 0.20
Albumina	"	2.28 \pm 0.16	2.24 \pm 0.18	2.20 \pm 0.20	2.26 \pm 0.15
Globuline	"	4.42 \pm 0.14	4.41 \pm 0.15	4.42 \pm 0.17	4.42 \pm 0.18
Glucosio	mg/100 ml	81.30a \pm 6.80	81.60a \pm 7.00	102.20b \pm 6.84	115.33c \pm 6.92
Colesterolo tot.	"	120.16 \pm 8.10	117.15 \pm 8.30	115.30 \pm 8.61	113.10 \pm 8.64
Colesterolo HDL	"	58.34 \pm 6.20	56.50 \pm 6.00	54.10 \pm 6.11	53.11 \pm 6.30
Colesterolo LDL	"	60.26 \pm 6.60	59.10 \pm 6.38	57.11 \pm 6.42	56.36 \pm 6.51
Trigliceridi	"	114.10 \pm 7.81	112.60 \pm 7.56	110.38 \pm 7.61	108.61 \pm 7.70
Bilirubina tot.	"	1.70 \pm 0.13	1.64 \pm 0.12	1.62 \pm 0.14	1.60 \pm 0.14
Fosfolipidi	"	60.41 \pm 9.10	56.30 \pm 9.20	54.10 \pm 9.30	52.20 \pm 9.10
Fosfatasi alcalina	mU/ml	85.30 \pm 6.35	82.26 \pm 6.40	81.15 \pm 6.51	80.10 \pm 6.23

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

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

Gruppi		1	2	3	4
Lipidi totali	mg/100 ml	410.60 \pm 9.12	408.23 \pm 9.36	405.16 \pm 9.51	403.11 \pm 9.28
Lipoproteine α	%	36.41a \pm 8.63	37.20a \pm 8.42	49.18b \pm 8.50	60.15c \pm 8.66
Lipoproteine β	%	63.59c \pm 8.63	62.80c \pm 8.42	50.82b \pm 8.50	39.85a \pm 8.66
Rapporto β/α		1.75c \pm 0.27	1.70c \pm 0.31	1.10b \pm 0.33	0.68a \pm 0.36

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

Non significative ($P>0,05$) le differenze fra i controlli e i soggetti alimentati con mangime addizionato di vanadio alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2).

CONCLUSIONI

Le risultanze ottenute a seguito delle nostre indagini rendono possibile la formulazione delle seguenti considerazioni e conclusioni:

1) – l'integrazione del mangime per galline produttrici di uova da consumo con vanadio alle dosi di 4 e di 8 p.p.m. ha influenzato favorevolmente la ovodeposizione soprattutto in corrispondenza del dosaggio più elevato. La differenza fra i soggetti trattati e i controlli, calcolata per l'intero periodo sperimentale (12 mesi), ha toccato quote pari, in valore assoluto e rispettivamente, al 7,85% e al 12,50%;

2) – sempre agli stessi dosaggi il vanadio ha determinato miglioramenti nella resa del mangime in uova (risp. 10,00% e 17,00%), nella pezzatura di queste ultime (risp. 4,50% e 7,50%), nell'accrescimento ponderale delle galline (risp. 8,00% e 14,00%) nonché nella pigmentazione del tuorlo delle uova (risp. 7,00% e 12,00%).

Anche con riferimento a questi parametri l'oligoelemento si è rivelato maggiormente efficace allorché ha trovato posto nel mangime alla dose di 8 p.p.m.;

3) – alla dose di 2 p.p.m. di mangime il vanadio non ha costituito fonte di variazione per l'estrinsecazione delle attitudini produttive delle galline;

4) – a prescindere dal dosaggio il vanadio non ha determinato modificazioni nella composizione chimica-centesimale del tuorlo delle uova e non ha condizionato, positivamente o negativamente, lo stato di salute delle galline.

Sembra pertanto possibile affermare che il vanadio, addizionato al mangime alle dosi di 4 e di 8 p.p.m., è possibilitato a svolgere il ruolo di integratore nell'alimentazione delle galline ovaiole.

Dal punto di vista biologico una spiegazione delle risultanze ottenute è fattibile alla luce dei reperti sortiti dalle indagini condotte a livello ematico.

E' stato infatti accertato che il vanadio determina aumenti dei contenuti di glucosio e di lipoproteine α , rivestendo così un ruolo importante in seno ai metabolismi glucidico e lipidico.

Naturalmente siamo in attesa di acquisire più ampie informazioni sul meccanismo d'azione e sulle funzioni metaboliche del vanadio da altre indagini già programmate ed in corso di svolgimento.

Parole chiave: vanadio, integrazione razione, galline ovaiole.

Key words: vanadium, ration integration, laying hens.

RIASSUNTO - Gli Autori espongono i risultati ottenuti a seguito di un esperimento circa l'impiego del vanadio, utilizzato nel ruolo di integratore, nell'alimentazione delle galline produttrici di uova da consumo. Il vanadio, alle dosi di 4 e di 8 p.p.m. di mangime, ha condizionato positivamente la ovodeposizione (risp. 7,85% e 12,50%), la resa del mangime in uova (risp. 10,00% e 17,00%) e la pezzatura di queste ultime (risp. 4,50% e 7,50%) nonché il grado di pigmentazione del tuorlo (risp. 7,00% e 12,00%) e l'accrescimento ponderale dei soggetti (risp. 8,00% e 14,00%).

L'utilizzazione del vanadio ad un dosaggio più basso (2 p.p.m.) non sembra offrire apprezzabili vantaggi.

SUMMARY - Vanadium in laying hens feeding.

The Authors refer the results obtained by a research about the use of vanadium as feed integrator in laying hens feeding. Vanadium at the doses of 4 and 8 p.p.m. has positively influenced laying (resp. 7,85% and 12,50%), feed consumption for twelve eggs produced (resp. 10,00% and 17,00%), eggs weight (resp. 4,50% and 7,50%), yolk pigmentation (resp. 7,00% and 12,00%) and weight gain of the hens (resp. 8,00% and 14,00%).

Vanadium at the dose of 2 p.p.m. did not have positive effects.

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

BIBLIOGRAFIA

1. WILLISKY G.R., GOLDFINE A.B., KOSTYNIK P.J. (1998) - Vanadium Compounds - Chemistry, Biochemistry and Therapeutic Applications. In: ACS Symposium Series 711, Tracey and Crans (Eds), American Chemistry Society, Washington, 279-296.
2. WILLISKY G.R., GOLDFINE A.B., KOSTYNIK P.J., McNEILL J.H., YANG L.Q., KHAN H.R., CRANS D.C. (2001) - Effects of Vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Journal of Inorganic Biochemistry*: 85, 33-42.
3. BARAN E.J. (2000) - Oxovanadium (IV) and oxovanadium (V) complexes relevant to biological systems. *Journal of Inorganic Biochemistry*: 80, 1-10.
4. WILLISKY G.R. (1990) - Vanadate in biological systems, N.D. Chasteen (ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1-24.
5. NIELSEN F.H. (1998) - The nutritional essentiality and physiological metabolism of vanadium in higher animals. In: ACS Symposium Series 711, Tracey and Crans (Eds.). American Chemical Society, 297-307.
6. HOPKINS L.L. Jr. e MOHR H.E. (1974) - Vanadium as an essential nutrient. *Fed. Proc.*: 33, 1773-1775.
7. NIELSEN F.H. e OLLERICH D.A. (1973) - Studies on a vanadium deficiency in chicks. *Fed. Proc.*: 32, 929 (Abstr.).
8. UEBERSCHAER K.H., VOGT H., MATTHES S. (1985) - Effect of various vanadium levels in broiler and laying hen rations on the performance of birds and on residues in tissues and eggs. *Archiv fuer Geflugelkunde*: 49, 23-30.
9. ANKE M., GROPPPEL B., KRONEMANN H., FUHRER E. (1983) - Influence of vanadium deficiency on growth, reproduction and life expectancy of female goats. *Spurenelement Symposium*: 4, 135-141.
10. ANKE M., GROPPPEL B., KRONEMANN H., FUHRER E. (1985) - Vanadium

deficiency in ruminants. Trace elements in man and animals. Proceedings of the fifth International Symposium: 275-278, discussion p. 279.

11. BOSTICCO A. e BONOMI A. (1958) - Rilievi ed osservazioni circa l'influenza esercitata dal vanadio sull'accrescimento del pollo da carne. L'Ateneo Parmense, 29, 5, 5-14.

12. BERG L.R., BEARSE G.E., MERRILL L.H. (1963) - Vanadium toxicity in laying hens. Poultry Science: 42, 1407-1411.

13. BERG L.R. (1963) - Evidence of vanadium toxicity resulting from the use of certain commercial phosphorus supplements in the chick rations. Poultry Science: 42, 766-769.

14. BERG L.R. (1966) - Effect of diet composition on vanadium toxicity for chick. Poultry Science: 45, 1346-1352.

15. BONOMI A., BONOMI B.M., SUPERCHI P., SUSSI C. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per i vitelli in fase di svezzamento. In corso di stampa.

16. BONOMI A., BONOMI B.M., SABBIONI A., SUSSI C. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per le manzette e le manze. In corso di stampa.

17. BONOMI A., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2002) - Il vanadio nell'alimentazione del vitello da macello a carne bianca. In corso di stampa.

18. BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per i vitelloni. In corso di stampa.

19. BONOMI A., BONOMI B.M., MAZZOTTI A., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per l'agnello leggero. In corso di stampa.

20. BONOMI A. (2002) - L'integrazione delle razioni per le scrofe con vanadio. Effetti sull'efficienza produttiva e riproduttiva. In corso di stampa.

21. BONOMI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per i suini in fase di svezzamento. In corso di stampa.

22. BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per il tacchino da carne. In corso di stampa.

23. BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per le faraone da carne. In corso di stampa.

24. BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per le anatre da carne. In corso di stampa.

25. BONOMI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per il coniglio da carne. In corso di stampa.

26. A.S.P.A. - Commissione Valutazione Alimenti (1980) - Valutazione degli alimenti di interesse -zootcnico. 1. Analisi chimica. Zoot. Nutr. Anim., 6, 1-19.

27. A.O.A.C. - Official Methods of Analysis, Washington D.C., Association of Official Analytical Chemists, 14th ed., 1984.

L'INTEGRAZIONE CON VANADIO DELLE RAZIONI PER IL CONIGLIO DA CARNE ⁽¹⁾

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

INTRODUZIONE

Le ricerche, di cui al titolo, sono parte integrante di un vasto piano di sperimentazione, programmato ed in corso di svolgimento presso il nostro Dipartimento, tendente ad approfondire le conoscenze su alcuni aspetti del problema relativo alla nutrizione oligominerale degli animali in produzione zootecnica.

Per quanto concerne gli oligoelementi considerati essenziali, a tutt'oggi la legislazione del nostro paese ne autorizza l'impiego, in qualità di integratori nella preparazione dei mangimi, limitatamente al cobalto, al ferro, allo iodio, al manganese, al molibdeno, al rame, al selenio ed allo zinco, mentre per altri l'autorizzazione non è ancora operante a motivo delle non sufficienti informazioni offerte dalla letteratura scientifica e tecnica.

Fra questi figura il vanadio, elemento che non da oggi è oggetto di attenzione da parte di numerosi ricercatori, soprattutto stranieri, a motivo delle funzioni che esso è in grado di svolgere nei processi biologici.

E' stato infatti accertato che il vanadio risulta indispensabile per il metabolismo delle catecolamine e dei lipidi e facilita le interazioni tra l'insulina ed i suoi recettori specifici presenti nei tessuti bersaglio, tra cui i muscoli ed il tessuto adiposo. Sembra essere inoltre coinvolto nel metabolismo del calcio, nello sviluppo e nella crescita di ossa e denti, nella riproduzione, nella regolazione degli zuccheri nel sangue, nella produzione dei globuli rossi (1, 2).

Con la dieta il vanadio viene assunto principalmente nella forma $H_2VO_4^-$, che penetra all'interno delle cellule attraverso il medesimo meccanismo di trasporto del fosforo. Nel tratto gastrointestinale va incontro ad una riduzione, trasformandosi in VO_2^+ e viene poi rapidamente escreto attraverso le feci. La quota ritenuta viene convertita rapidamente in forme chimiche più comuni e la sua distribuzione è indipendente dallo stato di ossidazione o dalla natura dell'elemento al momento dell'assunzione. L'organo di deposito per eccellenza sembra essere l'osso, dove il vanadio sotto forma VO_4^{3-} va a sostituire il PO_4^{3-} (3).

¹ Ricerche effettuate con il contributo finanziario del M.U.R.S.T. (quota 60%). Indirizzo per corrispondenza: Prof. Alberto Bonomi - Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione - Via del Taglio, 8 - 43100 PARMA. Tel. 0521 032620; fax 0521 032622; e-mail: alberto.bonomi@unipr.it

² Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti. Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione. Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma.

Per quanto riguarda il trasporto sono state osservate alcune relazioni fra il metabolismo del vanadio e quello del ferro, facendo supporre che la proteina transferrina possa essere coinvolta anche nel trasporto di tale elemento (4).

Il vanadio occupa un posto particolare fra i biometalli, in quanto, come il molibdeno, può partecipare ai processi biologici tanto nella sua forma cationica, quanto in quella anionica. In questa ultima forma esso si lega stabilmente con il fosforo, ma nella sua forma cationica presenta il caratteristico comportamento di un metallo di transizione, competendo cioè con altri cationi per i siti di coordinazione in composti e ligandi. Questo duplice comportamento, unitamente alla capacità di modificare la sua geometria di coordinazione e il suo stato ossidativo, rende il metabolismo del vanadio estremamente particolare (3).

L'attenzione dei ricercatori è volta principalmente allo studio delle interazioni delle diverse forme di vanadio con un notevole numero di biomolecole ed altri ligandi di interesse biologico e/o farmacologico, come contributo ad una migliore conoscenza delle possibili funzioni ed effetti che lo stesso potrebbe avere negli organismi superiori (5).

Circa il fabbisogno in vanadio degli animali in produzione zootecnica, la letteratura consultata non è e non può essere esauriente; infatti esistono non poche incertezze sia sulla quantità di vanadio necessaria per evitare turbe carenziali sia sulla quantità "ottimale", capace cioè di assicurare il perfetto stato di salute e di produttività.

D'altra parte bisogna ricordare che il fabbisogno in vanadio è legato alla presenza nella razione di altri elementi minerali, che possono condizionare l'assorbimento dell'elemento in questione.

Secondo alcuni ricercatori (6, 7) il dosaggio minimo di vanadio, al di sotto del quale potrebbero instaurarsi stati carenziali, potrebbe variare fra i 10 e i 30 p.p.b.

E' stato possibile accertare che in carenza di vanadio i broilers palesano un rallentamento della velocità di crescita, piumaggio difettoso e ridotto sviluppo delle ossa (8), mentre nelle capre la carenza dell'oligoelemento influenza negativamente l'efficienza riproduttiva e la produzione quanti-qualitativa del latte (9, 10).

Circa gli effetti del vanadio sulle performances degli animali e sui parametri zoeconomici la letteratura è estremamente parca di notizie.

E' stato osservato che l'integrazione della razione con vanadio alla dose di 4 p.p.m. è in grado di migliorare nei broilers l'accrescimento ponderale e l'utilizzazione dell'alimento (11).

Gli effetti tossici del vanadio sono stati studiati nei polli.

Nelle ovaiole l'aggiunta alla razione di 30 p.p.m. di vanadio ha fatto registrare un calo della ovodeposizione e un peggioramento della qualità delle uova (12+14).

Utilizzando l'ossido di vanadio (titolo in V 55%) abbiamo già effettuato una serie di sperimentazioni, che hanno interessato i vitelli in fase di svezzamento (15), le manzette e le manze (16), i vitelli da macello a carne bianca (17), i vitelloni (18), le scrofe (19) e i suini in fase di svezzamento (20).

Le nostre ricerche hanno consentito di rilevare che l'integrazione delle razioni con vanadio è in grado di condizionare favorevolmente l'efficienza produttiva degli animali.

Nel piano generale di ricerca, oltre le suddette sperimentazioni, è stato previsto lo studio del problema relativo all'integrazione con vanadio delle razioni per le pic-

cole specie, nei confronti delle quali le notizie riportate in letteratura sono piuttosto scarse.

Sperimentando sul tacchino da carne (21), sulle faraone da carne (22) e sulle anatre da carne (23), ci è stato dato di accertare che il vanadio, aggiunto ai mangimi alle dosi di 4 e di 8 p.p.m., influenza positivamente l'estrinsecazione delle attitudini produttive.

Sulla base delle favorevoli risultanze ottenute ci è sembrato interessante ampliare la ricerca andando a toccare l'allevamento del coniglio da carne.

MATERIALE E METODI

La prova è stata condotta su 200 conigli di razza Nuova Zelanda dell'età di circa 30 giorni, tutti maschi appena svezzati e distinti in quattro gruppi di 50 soggetti ciascuno, contrassegnati con i numeri dall'uno al quattro.

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 riportata nella tabella n. 1.

Tab. 1 – Formulazione dei mangimi composti integrati.

Periodi		1°	2°
Farina di mais	Kg	35.00	45.00
Farina di orzo	"	10.00	10.00
Farina di soia (estr. 50% prot.)	"	10.00	8.00
Farina di girasole (estr. 45% prot.)	"	5.00	5.00
Farina di pesce	"	2.00	2.00
Polvere di latte magro	"	3.00	3.00
Farina di medica integrale	"	9.00	6.00
Farina di medica dis.	"	4.00	4.00
Cruschello di frumento	"	14.00	9.00
Melasso di canna	"	4.00	4.00
Lievito di birra	"	1.00	1.00
Carbonato di calcio	"	1.00	1.00
Fosfato bicalcico	"	1.00	1.00
Cloruro di sodio	"	0.50	0.50
Complesso vit. e oligomin (¹)	"	0.50	0.50

(1) - 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 800; 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; supporto vegetale q.b. a g 1000.

Per l'alimentazione dei gruppi 2, 3 e 4, considerati di "esperimento", sono stati impiegati gli stessi mangimi integrati però con vanadio nelle rispettive dosi di 2, di 4 e di 8 p.p.m.

E' stato utilizzato ossido di vanadio (V:55%) di produzione Merck, messo gentilmente a nostra disposizione dalla Ditta Manteka di Bibbiano (RE).

Tab. 2 – Analisi chimica dei mangimi composti integrati.

Periodi		1°	2°
Acqua	%	12.00	12.20
Ceneri gregge	“	6.80	7.00
Proteina greggia	“	19.00	17.00
Sostanze grasse gregge	“	3.50	3.00
Cellulosa greggia	“	9.50	9.00
Estrattivi inazotati	“	49.20	51.80

Nella tabella n. 2 sono racchiusi i risultati dell'analisi chimica effettuata sui mangimi di 1° e di 2° periodo. La determinazione del contenuto in principi immediati è stata condotta secondo la tecnica consigliata dalla C.V.A. dell'A.S.P.A. (24).

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 bilirubina totale, di colesterolo totale, di col. HDL, di col. LDL, di trigliceridi, di lipidi totali e di lipoproteine α e β , di fosfolipidi, di NEFA, con kit della Boehringer Italia;

- d) – l'indagine sul contenuto in grasso delle feci.

Contemporaneamente ai prelievi di sangue, di cui al punto c) sono state raccolte le feci per la determinazione del grasso totale, dei grassi neutri, dei saponi e degli acidi grassi, adottando la metodica di Van de Kramer e coll., descritta da Varley (25);

e) - il controllo della resa di macellazione e la valutazione delle carcasse alla spolpatura;

f)- l'analisi chimico-bromatologica della carne secondo la metodica A.O.A.C. (26);

g) - la determinazione della digeribilità pepsinica "in vitro" della carne, secondo la ben nota tecnica di Sjollema - Wedemeyer;

h) - la valutazione della tenerezza della carne, secondo il procedimento proposto da Schömberg e Lochmann, elaborato da Krüger (27) e basato sull'impiego della tripsina, adottando gli accorgimenti resi noti da uno di noi in altra memoria (28), 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:

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

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.

Per tutta la durata della prova i conigli alimentati con mangimi contenenti vanadio alle dosi di 2, di 4 e di 8 p.p.m. hanno manifestato uno stato di salute decisamente buono. Analogamente ai controlli il sensorio e le grandi funzioni organiche hanno fatto registrare uno svolgimento regolare senza il riscontro di variazioni comunque riferibili ai particolari regimi alimentari adottati.

Il tasso di mortalità è risultato basso, avendo raggiunto quote comprese fra il 2 e il 3%.

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. 3 (v. anche grafico 1) figurano i risultati ottenuti a seguito dell'elaborazione condotta sui dati primitivi, mentre nella tabella n. 4 sono compendiate i valori medi relativi agli incrementi ponderali giornalieri.

L'esame delle tabelle permette di rilevare che:

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

2) - al 60° giorno di età i conigli razionati con mangimi contenenti vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) hanno fatto registrare un accrescimento ponderale superiore nei confronti dei controlli (gruppo 1) in virtù di differenze significative ($P < 0,05$) pari, nell'ordine, al 8,00% e al 17,00%. Pure significativa ($P < 0,05$) la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Non ha trovato conferma ($P > 0,05$) la differenza fra i controlli e i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2);

3) - al 90° giorno di età, cioè al termine della prova, il vanadio, contenuto nel mangime alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4), si è dimostrato capace di condizionare favorevolmente la velocità di crescita con una intensità maggiore rispetto al periodo precedente massime con riferimento al dosaggio più elevato. Le differenze fra i controlli (gruppo 1) e i soggetti dei gruppi 3 e 4 sono risultate significative ($P < 0,05$) e pari, nell'ordine, al 12,00% e al 20,00%.

Alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2) il vanadio ha prodotto risultanze non diverse ($P > 0,05$) rispetto a quelle registrate per i controlli.

Tab. 3 – Accrescimento ponderale (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Soggetti	n.	50	50	50	50
Durata della prova	d	60	60	60	60
Pesi medi iniziali (al 30° d)	g	800,20 \pm 52,10	780,39 \pm 48,50	790,16 \pm 50,61	797,39 \pm 53,48
Pesi medi al 60° d	"	1.850,34a \pm 81,16	1.875,42a \pm 83,40	1.995,30b \pm 85,18	2.178,46c \pm 80,20
Pesi medi al 90° d	"	2.900,26a \pm 96,13	2.957,11a \pm 95,00	3.240,86b \pm 98,60	3.400,12c \pm 97,00

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

Tab. 4 – Incrementi ponderali giornalieri (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
30° - 60° d	g	36.00a \pm 1.80	36.50a \pm 1.75	40.20b \pm 1.78	44.00c \pm 1.82
61° - 90° d	"	35.00a \pm 2.20	36.00a \pm 2.00	41.52b \pm 2.31	45.10c \pm 2.15
30° - 90° d	"	35.50a \pm 2.18	36.20a \pm 2.26	41.00b \pm 2.30	44.70c \pm 2.21

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

Nella tabella n. 5 (v. anche grafico 2) sono riportati i risultati relativi agli indici di conversione dell'alimento, in base ai quali è possibile osservare che i conigli trattati con vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. di mangime (gruppo 4) hanno prodotto il chilogrammo di peso vivo, usufruendo di una quantità di alimento inferiore nei confronti di quella consumata dai controlli (gruppo 1) sulla base di differenze, calcolate per l'intero ciclo produttivo, significative ($P < 0,05$) e pari, rispettivamente, al 10,00% e al 16,00%. Significativa ($P < 0,05$) anche la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Risultanze pressoché analoghe a quelle dei controlli ($P > 0,05$) sono state registrate per i soggetti che hanno assunto il mangime addizionato di vanadio alla dose di 2 p.p.m. (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, figurano, nei loro valori medi, nelle tabelle nn. 6 e 7. L'esame delle tabelle pone in evidenza che:

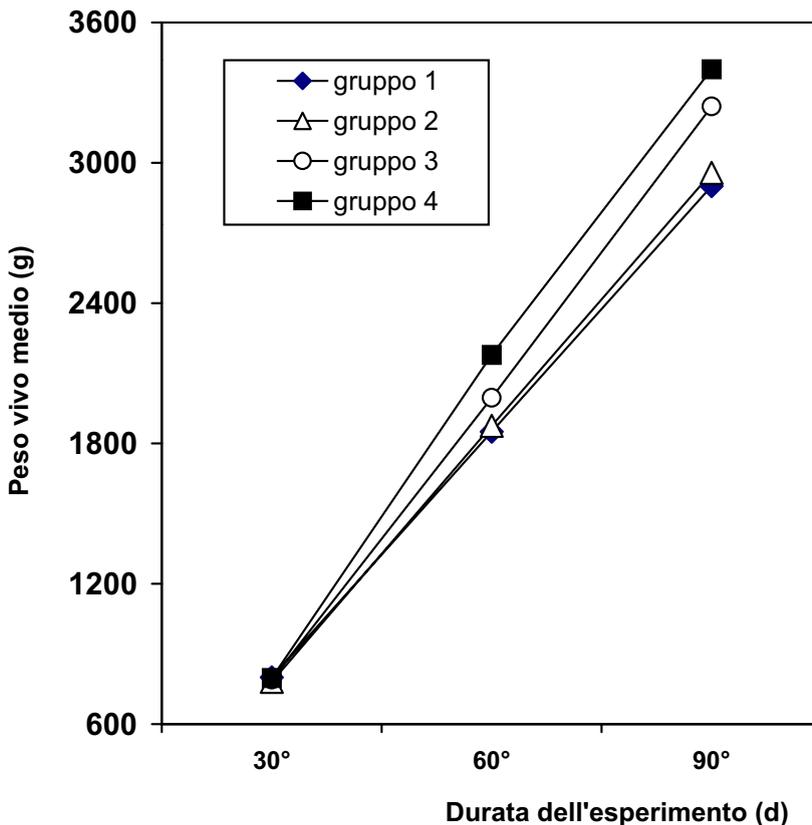


Grafico n. 1 - Accrescimento ponderale

Tab. 5 – Indice di conversione - Kg di mangime/Kg p.v. (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
30° - 60° d	Kg	3.60c \pm 0.10	3.54c \pm 0.12	3.35b \pm 0.12	3.15a \pm 0.11
61° - 90° d	"	3.85c \pm 0.15	3.80c \pm 0.13	3.50b \pm 0.16	3.20a \pm 0.17
30° - 90° d	"	3.75c \pm 0.09	3.68c \pm 0.10	3.40b \pm 0.10	3.17a \pm 0.11

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

Tab. 6 – Parametri ematici (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Proteine totali	g/100 ml	6.15 \pm 0.34	6.21 \pm 0.37	6.28 \pm 0.41	6.31 \pm 0.41
Albumina	"	2.40 \pm 0.26	2.53 \pm 0.28	2.58 \pm 0.30	2.61 \pm 0.32
Globuline	"	3.75 \pm 0.34	3.68 \pm 0.36	3.70 \pm 0.35	3.70 \pm 0.38
Glucosio	mg/100 ml	140.10a \pm 7.42	143.11a \pm 7.66	160.00b \pm 7.70	172.56c \pm 7.45
Colesterolo tot.	"	150.80 \pm 20.00	146.39 \pm 18.64	141.30 \pm 19.30	138.10 \pm 19.62
Colesterolo HDL	"	50.16 \pm 12.13	48.36 \pm 13.20	45.11 \pm 13.60	42.37 \pm 13.00
Colesterolo LDL	"	85.12 \pm 15.20	80.29 \pm 14.38	77.12 \pm 14.74	75.20 \pm 14.80
Trigliceridi	"	130.16 \pm 19.10	126.11 \pm 19.00	121.74 \pm 18.64	117.62 \pm 18.86
Bilirubina tot.	"	1.80 \pm 0.16	1.76 \pm 0.15	1.71 \pm 0.17	1.68 \pm 0.18
Fosfolipidi	"	105.11 \pm 15.30	102.69 \pm 14.86	100.00 \pm 14.91	94.30 \pm 15.10

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

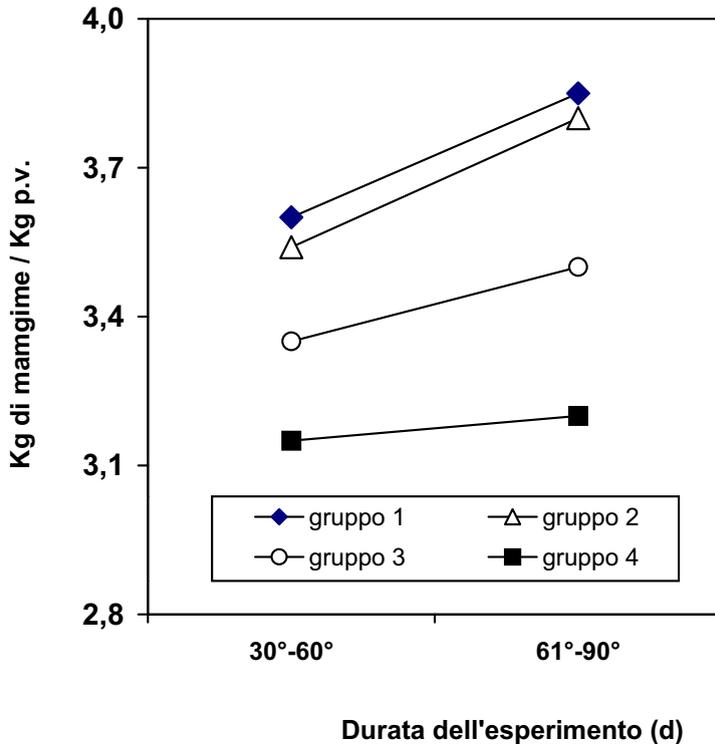


Grafico n. 2 - Indice di conversione

- i contenuti di proteine totali, di albumina e di globuline non hanno subito modificazioni ($P > 0,05$) riconducibili all'impiego del vanadio ai vari dosaggi considerati;

- il tenore di glucosio ha toccato quote più elevate nei conigli che hanno assunto il vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. di mangime (gruppo 4) in virtù di differenze significative ($P < 0,05$), rispetto ai controlli (gruppo 1), pari, nell'ordine, al 14,00% e al 23,00%. Pure significativa ($P < 0,05$) la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Non ha trovato conferma ($P > 0,05$) la differenza fra i controlli e i soggetti che hanno utilizzato mangimi contenenti vanadio alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2);

- i tassi di bilirubina totale, di colesterolo totale, di col. HDL, di col. LDL, di trigliceridi, di fosfolipidi, di fosfatasi alcalina, di NEFA e di lipidi totali sono stati caratterizzati da valori più bassi nei conigli trattati con vanadio ai vari dosaggi considerati sulla base però di differenze, nei confronti dei controlli, che non hanno raggiunto la significatività statistica ($P > 0,05$);

- le lipoproteine α e β , determinate nel sangue dei conigli trattati con il vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. di mangime (gruppo 4) hanno denunciato, rispettivamente, valori più alti e più bassi rispetto al lipidogramma dei controlli (gruppo 1), in virtù di differenze significative ($P < 0,05$) pari, nell'ordine, al 39,00% e al 75,00% per le α , al 24,50% e al 49,00% per le β .

Tab. 7 – Parametri ematici (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Fosfatasi alcalina	mU/ml	100.30 \pm 15.10	96.48 \pm 14.86	93.18 \pm 14.91	90.11 \pm 15.00
NEFA	mg/l	82.44 \pm 10.00	81.00 \pm 9.84	78.50 \pm 10.15	75.10 \pm 9.76
Lipidi totali	mg/100 ml	450.13 \pm 13.16	445.61 \pm 14.00	441.13 \pm 13.60	440.60 \pm 13.85
Lipoproteine α	%	38.61a \pm 10.00	40.10a \pm 9.71	53.61b \pm 9.86	68.54c \pm 9.94
Lipoproteine β	%	61.39c \pm 10.00	59.90c \pm 9.71	46.39b \pm 9.86	31.46a \pm 9.94
Rapporto β/α		1.60 \pm 0.32	1.50 \pm 0.35	0.86 \pm 0.28	0.47 \pm 0.27

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

Tab. 8 – Contenuto in grasso delle feci (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Grasso totale	%	4.00c \pm 0.15	3.91c \pm 0.17	3.62b \pm 0.18	3.30a \pm 0.17
Grassi neutri	"	2.20c \pm 0.10	2.12c \pm 0.12	1.30b \pm 0.14	0.45a \pm 0.15
Saponi	"	1.30a \pm 0.13	1.24a \pm 0.14	1.50b \pm 0.16	1.75c \pm 0.16
Acidi grassi	"	0.50a \pm 0.06	0.55a \pm 0.08	0.82b \pm 0.09	1.10c \pm 0.09

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

Per entrambi i parametri significative ($P < 0,05$) anche le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4. Non significative ($P > 0,05$) le differenze fra i controlli e i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2).

D) - Il contenuto in grasso delle feci.

Le risultanze ottenute, riportate nella tabella n. 8, consentono di accertare che le feci dei conigli alimentati con mangimi contenenti il vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) sono caratterizzate da valori più bassi di grasso totale e di grassi neutri e più elevati di saponi e di acidi grassi nei confronti di quelle dei controlli (gruppo 1) sulla base di differenze significative ($P < 0,05$) pari, rispettivamente, al 10,00% e al 17,00% per il grasso totale, al 41,00% e al 80,00% per i grassi neutri, al 16,00% e al 34,00% per i saponi, al 60,00% e al 100,00% per gli acidi grassi.

Per tutti i parametri pure significative le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Risultanze che collimano con quelle dei controlli ($P > 0,05$) sono state osservate per i soggetti alimentati con mangimi, in cui ha trovato posto il vanadio alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2).

E) - Le rese di macellazione.

A seguito delle indagini effettuate sono state ricavate le risultanze compendiate nella tabella n.9. L'esame della tabella permette di osservare 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 57,00%.

Le rese più elevate sono andate ad interessare i conigli trattati con vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. di mangime (gruppo 4) in virtù di differenze significative ($P < 0,05$), rispetto ai controlli (gruppo 1), pari, nell'ordine, al 11,00% e al 18,00%. Significativa ($P < 0,05$) anche la differenza fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Non ha trovato conferma ($P > 0,05$) la differenza fra i controlli e i soggetti razionati con mangimi contenenti vanadio alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2);

- le rese in quarti anteriori, in quarti posteriori, in lombo e in carne dei conigli che hanno assunto mangimi addizionati di vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) sono risultate più elevate nei confronti di quelle dei controlli (gruppo 1) sulla base di differenze significative ($P < 0,05$) pari, rispettivamente, al 8,00% e al 15,00% per i quarti anteriori, al 7,50% e al 17,00% per i quarti posteriori, al 17,00% e al 20,00% per il lombo, al 12,00% e al 23,00% per la carne. Per tutti i parametri hanno raggiunto la significatività statistica ($P < 0,05$) le differenze fra il gruppo 3 e il gruppo 4.

Risultanze non diverse da quelle dei controlli ($P > 0,05$) sono state registrate per i conigli che sono stati trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2);

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

Tab. 9 – Rilievi di macellazione a caldo (% p.v. - valori medi \pm D.S.).

Gruppi	1	2	3	4
Rese in:				
- carcassa	48.10a \pm 1.20	48.35a \pm 1.26	53.26b \pm 1.18	56.70c \pm 1.19
- quarti anteriori	13.70a \pm 0.48	14.00a \pm 0.45	14.75b \pm 0.52	15.80c \pm 0.55
- quarti posteriori	17.69a \pm 0.61	17.95a \pm 0.70	19.00b \pm 0.66	20.75c \pm 0.74
- lombo	16.71a \pm 0.50	16.40a \pm 0.48	19.51b \pm 0.46	20.15c \pm 0.49
- carne	31.30a \pm 1.10	31.50a \pm 1.15	35.20b \pm 1.18	38.62c \pm 1.20
- grasso	2.80 \pm 0.58	2.66 \pm 0.62	2.80 \pm 0.64	2.91 \pm 0.55
- ossa	14.00 \pm 1.40	14.19 \pm 1.50	15.26 \pm 1.53	15.17 \pm 1.48
- testa e collo	9.00 \pm 0.80	9.30 \pm 0.68	9.50 \pm 0.71	9.35 \pm 0.73
- pelle	11.30 \pm 0.71	11.24 \pm 0.76	11.18 \pm 0.83	11.10 \pm 0.80
- stinchi, zampe e coda	3.75 \pm 0.42	3.70 \pm 0.48	3.61 \pm 0.47	3.50 \pm 0.41
- fegato	2.38 \pm 0.51	2.50 \pm 0.47	2.64 \pm 0.56	2.40 \pm 0.54
- milza, cuore, polmoni, reni e testicoli	2.50 \pm 0.56	2.64 \pm 0.58	2.47 \pm 0.54	2.38 \pm 0.57
- stomaco pieno	4.56 \pm 0.47	4.47 \pm 0.49	4.40 \pm 0.45	4.31 \pm 0.42
- intestino pieno	13.60 \pm 1.35	13.20 \pm 1.41	13.00 \pm 1.28	12.70 \pm 1.30

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

Tab. 10 – Composizione chimico-bromatologica della carne (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Acqua	%	73.50 \pm 0.45	73.20 \pm 0.48	73.35 \pm 0.50	73.41 \pm 0.53
Ceneri gregge	“	1.61 \pm 0.13	1.57 \pm 0.11	1.59 \pm 0.14	1.56 \pm 0.14
Proteina greggia	“	22.26 \pm 0.30	22.30 \pm 0.33	22.34 \pm 0.38	22.40 \pm 0.37
Sostanze grasse gregge	“	2.30 \pm 0.17	2.24 \pm 0.18	2.28 \pm 0.20	2.31 \pm 0.19

Tab. 11 – Digeribilità pepsinica “in vitro” della carne (valori medi \pm D.S.).

Gruppi		1	2	3	4
Proteine totali	%	22.26 \pm 0.30	22.30 \pm 0.33	22.34 \pm 0.38	22.40 \pm 0.37
Proteine indigerite	“	2.50 \pm 0.37	2.46 \pm 0.41	1.70 \pm 0.40	1.20 \pm 0.38
Proteine digeribili	“	19.76 \pm 0.28	19.84 \pm 0.25	20.64 \pm 0.22	21.20 \pm 0.26
Coefficiente di digeribilità	“	88.75 \pm 1.30	89.00 \pm 1.38	92.40 \pm 1.41	95.00 \pm 1.45

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

F) – La composizione chimico-bromatologica della carne.

Sono stati determinati i contenuti in acqua, in ceneri gregge, in proteina greggia e in grasso greggio.

I risultati ottenuti, raccolti nella tabella n. 10, mettono in evidenza che la carne dei conigli denuncia una composizione chimico-bromatologica nella normalità senza il riscontro di variazioni a seguito del ricorso al vanadio ai vari dosaggi sperimentati.

G) - La digeribilità pepsinica “in vitro” della carne.

Sulla carne, essiccata e sgrassata, è stata determinata la digeribilità, secondo la metodica proposta da Sjollema-Wedemeyer.

I valori medi relativi alla proteina totale, indigerita, digeribile e al coefficiente di digeribilità sono riportati nella tabella n. 11.

Dall'esame della tabella è possibile rilevare che la carne dei conigli alimentati con mangimi addizionati di vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) è più digeribile nei confronti di quella dei controlli (gruppo 1). Il coefficiente di digeribilità delle proteine è stato infatti interessato da differenze significative ($P < 0,05$) pari, rispettivamente, al 4,50% e al 7,00%. Impiegato alla dose di 2 p.p.m. (gruppo 2) il vanadio non ha costituito fonte di variazione ($P > 0,05$) per la digeribilità della carne.

H) - La tenerezza della carne.

Per la valutazione della tenerezza della carne è stato adottato il procedimento proposto da Schönberg e Lochmann, elaborato da Krüger, basato sul ricorso alla 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.

Tab. 12 – Digestione tripsinica “in vitro” della carne. Sostanza indigerita espressa in % sulla carne essiccata e sgrassata (valori medi \pm D.S.).

Gruppi	Sostanza indigerita
1	2.86c \pm 0.40
2	2.70c \pm 0.36
3	1.85b \pm 0.32
4	1.38a \pm 0.31

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

Nella tabella n. 12 figurano le risultanze ottenute, le quali mettono in luce che la carne dei conigli alimentati con mangimi contenenti vanadio alle dosi di 4 p.p.m. (gruppo 3) e di 8 p.p.m. (gruppo 4) è più tenera rispetto a quella dei controlli (gruppo 1). Le differenze fra i contenuti di sostanza indigerita sono significative ($P < 0,05$) e pari, nell'ordine, al 35,00% e al 50,00%.

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

Statisticamente non diversa ($P > 0,05$) la differenza fra i controlli e i soggetti trattati con vanadio alla dose di 2 p.p.m. di mangime (gruppo 2).

CONCLUSIONI

Sulla base delle risultanze ottenute a seguito delle indagini effettuate è possibile la formulazione delle seguenti considerazioni e conclusioni:

1) - il vanadio, in qualità di integratore, alle dosi di 4 e di 8 p.p.m. di mangime ha influenzato positivamente l'efficienza produttiva dei conigli, migliorando l'accrescimento ponderale (risp. 12,00% e 20,00%) e l'utilizzazione dell'alimento (risp. 10,00% e 16,00%);

2) - agli stessi dosaggi il vanadio ha inoltre condizionato favorevolmente le rese in carcassa (risp. 11,00% e 18,00%), in quarti anteriori (risp. 8,00% e 15,00%), in quarti posteriori (risp. 7,50% e 17,00%), in lombo (risp. 17,00% e 20,00%) e in carne (risp. 12,00% e 23,00%) e alcune caratteristiche qualitative di quest'ultima con riferimento al grado di digeribilità (risp. 4,00% e 7,00% per le prot. dig. dopo digestione pepsinica "in vitro") e al grado di tenerezza (risp. - 35,00% e - 50,00% per il tessuto connettivo dopo digestione tripsinica "in vitro");

3) - alla dose di 2 p.p.m. di mangime il vanadio è risultato inefficace;

4) - a prescindere dal dosaggio il vanadio, non ha determinato variazioni nello stato sanitario dell'allevamento.

Devesi pertanto ammettere che il vanadio, nella veste di integratore alimentare, interviene efficacemente nell'estrinsecazione delle attitudini produttive del coniglio da carne.

Circa il dosaggio dell'oligoelemento ci sembra di poter consigliare una quota compresa fra le 4 e le 8 p.p.m. di mangime.

Dal punto di vista biologico i reperti sortiti dalla nostra sperimentazione possono trovare una giustificazione alla luce delle indagini condotte a livello ematico.

Il vanadio ha infatti determinato un aumento del contenuto di glucosio e riduzioni, anche se di modesta entità, dei tenori di bilirubina totale, di colesterolo totale, HDL e LDL, di trigliceridi, di fosfolipidi, di fosfatasi alcalina, di NEFA, di lipidi totali, risultanze queste che dimostrano chiaramente la possibilità del vanadio di svolgere un ruolo importante in seno ai metabolismi glucidico e lipidico.

In ordine a quest'ultimo aspetto necessita inoltre menzionare che il vanadio è capace di svolgere un'azione positiva sulla digeribilità dei grassi come lo testimonia l'aumento delle lipoproteine α nel sangue e del contenuto di saponi e di acidi grassi nelle feci.

Siamo in attesa di più ampie informazioni sul meccanismo d'azione e sulle funzioni metaboliche del vanadio che ci verranno offerte da altre indagini già in corso di svolgimento.

Parole chiave: vanadio, integrazione razione, conigli da carne.

Key words: vanadium, ration integration, rabbits.

RIASSUNTO - Gli Autori espongono i risultati ottenuti a seguito di un esperimento circa l'impiego del vanadio, nel ruolo di integratore, nell'alimentazione del coniglio da carne. Il vanadio, utilizzato alle dosi di 4 e di 8 p.p.m. di mangime durante l'intero ciclo di allevamento (dal 30° al 90° giorno di età), ha determinato miglioramenti nella velocità di crescita (risp. 12,00% e 20,00%), nell'utilizzazione dell'alimento (risp. 10,00% e 16,00%), nelle rese in carcassa (risp. 11,00% e 18,00%), in quarti anteriori (risp. 8,00% e 15,00%), in quarti posteriori (risp. 7,50% e 17,00%), in lombo (risp. 17,00% e 20,00%), in carne (risp. 12,00% e 23,00%) e in alcune caratteristiche qualitative di quest'ultima con riferimento al grado di digeribilità (risp. 4,00% e 7,00% per le prot. dig. dopo digestione pepsinica "in vitro") e al grado di tenerezza (risp. - 35,00% e - 50,00% per il tessuto connettivo dopo digestione tripsinica "in vitro").

In corrispondenza di un dosaggio più basso (2 p.p.m.) il vanadio è risultato meno efficace.

SUMMARY - Vanadium in the feeding of the rabbits.

The Authors refer the results of research about the use of vanadium as an integrator of rabbits feeding. Added to rations at the doses of 4 and 8 p.p.m. (from 30 to 90 d of age) vanadium has positive effects on the weight gain (resp. 12,00% and 20,00%), the feed utilization (resp. 10,00% and 16,00%), the carcass (resp. 11,00% and 18,00%), the fore quarters (resp. 8,00% and 15,00%), the rear quarters (resp. 7,50% and 17,00%), the loin (resp. 17,00% and 20,00%), the meat yield (resp. 12,00% and 23,00%), the meat digestibility (resp. 4,00% and 7,00% of digestible protein after "in vitro" pepsinic digestion) and tenderness (resp. -35,00% and -50,00% of connective tissue after "in vitro" tripsinic digestion).

At the lower dose (2 p.p.m.) vanadium doesn't seem to have any appreciable effect.

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

BIBLIOGRAFIA

1. WILLSKY G.R., GOLDFINE A.B., KOSTYNIK P.J. (1998) - Vanadium Compounds - Chemistry, Biochemistry and Therapeutic Applications. In: ACS Symposium Series 711, Tracey and Crans (Eds), American Chemistry Society, Washington, 279-296.
2. WILLSKY G.R., GOLDFINE A.B., KOSTYNIK P.J., McNEILL J.H., YANG L.Q., KHAN H.R., CRANS D.C. (2001) - Effects of Vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Journal of Inorganic Biochemistry*: 85, 33-42.
3. BARAN E.J. (2000) - Oxovanadium (IV) and oxovanadium (V) complexes relevant to biological systems. *Journal of Inorganic Biochemistry*: 80, 1-10.

4. WILLSKY G.R. (1990) - Vanadate in biological systems, N.D. Chasteen (ed.), Kluwar Academic Publishers, The Netherlands, 1-24.
5. NIELSEN F.H. (1998) - The nutritional essentiality and physiological metabolism of vanadium in higher animals. In: ACS Symposium Series 711, Tracey and Crans (Eds.). American Chemical Society, 297-307.
6. HOPKINS L.L. Jr. e MOHR H.E. (1974) - Vanadium as an essential nutrient. Fed. Proc.: 33, 1773-1775.
7. NIELSEN F.H. e OLLERICH D.A. (1973) - Studies on a vanadium deficiency in chicks. Fed. Proc.: 32, 929 (Abstr.).
8. UEBERSCHAER K.H., VOGT H., MATTHES S. (1985) - Effect of various vanadium levels in broiler and laying hen rations on the performance of birds and on residues in tissues and eggs. Archiv fuer Geflugelkunde: 49, 23-30.
9. ANKE M., GROPPPEL B., KRONEMANN H., FUHRER E. (1983) - Influence of vanadium deficiency on growth, reproduction and life expectancy of female goats. Spurenelement Symposium: 4, 135-141.
10. ANKE M., GROPPPEL B., KRONEMANN H., FUHRER E. (1985) - Vanadium deficiency in ruminants. Trace elements in man and animals. Proceedings of the fifth International Symposium: 275-278, discussion p. 279.
11. BOSTICCO A. e BONOMI A. (1958) - Rilievi ed osservazioni circa l'influenza esercitata dal vanadio sull'accrescimento del pollo da carne. L'Ateneo Parmense, 29, 5, 5-14.
12. BERG L.R., BEARSE G.E., MERRILL L.H. (1963) - Vanadium toxicity in laying hens. Poultry Science: 42, 1407-1411.
13. BERG L.R. (1963) - Evidence of vanadium toxicity resulting from the use of certain commercial phosphorus supplements in the chick rations. Poultry Science: 42, 766-769.
14. BERG L.R. (1966) - Effect of diet composition on vanadium toxicity for chick. Poultry Science: 45, 1346-1352.
15. BONOMI A., BONOMI B.M., SUPERCHI P., SUSSI C. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per i vitelli in fase di svezzamento. In corso di stampa.
16. BONOMI A., BONOMI B.M., SABBIONI A., SUSSI C. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per le manzette e le manze. In corso di stampa.
17. BONOMI A., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2002) - Il vanadio nell'alimentazione del vitello da macello a carne bianca. In corso di stampa.
18. BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A., VONGHIA G., CAPUTI IAMBRENGHI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per i vitelloni. In corso di stampa.
19. BONOMI A. (2002) - L'integrazione delle razioni per le scrofe con vanadio. Effetti sull'efficienza produttiva e riproduttiva. In corso di stampa.
20. BONOMI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per i suini in fase di svezzamento. In corso di stampa.

21. BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per il tacchino da carne. In corso di stampa.
22. BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per le faraone da carne. In corso di stampa.
23. BONOMI A., BONOMI B.M., QUARANTELLI A. (2002) - L'integrazione con vanadio delle razioni per le anatre da carne. In corso di stampa.
24. A.S.P.A. - Commissione Valutazione Alimenti (1980) - Valutazione degli alimenti di interesse -zootcnico. 1. Analisi chimica. Zoot. Nutr. Anim., 6, 1-19.
25. Varley H. (1969) - La diagnosi di laboratorio nella pratica clinica. Ed. Il Pensiero Scientifico, Roma.
26. A.O.A.C. - Official Methods of Analysis, Washingt D.C., Association of Official Analytical Chemists, 14th ed., 1984.
27. KRUGER H. (1965) – “Ein Beitrag zur Obiektiven Bestimmung der Fleischqualitat von Jungmastrindern”. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
28. BONOMI A. (1975) – Caratteristiche chimico-biologiche della carne di selvaggina in allevamento industriale - Avicoltura, 44, 3, 67.

**MISURAZIONI SOMATICHE E CURVE DI CRESCITA
NELLA POPOLAZIONE DI CAPRIOLI (*Capreolus capreolus c.*)
DELL'APPENNINO PARMENSE ¹**

Alberto Sabbioni ^{2,3}, Chiara Serena Soffiantini ², Gianmaria Pisani ⁴,
Valentino Beretti ², Claudia Sussi ², Paola Superchi ²

Introduzione

Il capriolo è un cervide presente solo nel continente Eurasiatico. Ne sono state individuate tre sottospecie, in relazione alla distribuzione geografica: *Capreolus capreolus capreolus* (Linneo, 1758), o capriolo europeo, presente in Europa e in Asia Minore; *C. capreolus pygargus* (Pallas, 1771), o capriolo siberiano, presente nel sud-est europeo e nella parte dell'Asia che si estende fino alla Corea; *C. capreolus bedfordi* (Thomas, 1908), o capriolo cinese, presente in Manciuria, Corea e nel nord-est della Cina.

In Europa, agli inizi degli anni '80 si è stimata l'esistenza di circa 6 milioni di capi, diffusi dai confini occidentali del Portogallo fino alla Russia (il capriolo risulta assente in Irlanda, in Islanda, nelle isole del Mediterraneo e nella penisola Scandinava a nord del Golfo di Botnia). In Italia una stima effettuata nel 1989 indicava la presenza di circa 150.000 capi. Questi numeri sono stati probabilmente superati negli ultimi anni, vista la forte espansione avvenuta da allora. La consistenza pare comunque bassa rispetto alle potenzialità del territorio italiano, che offre un ambiente particolarmente favorevole allo sviluppo di questo ungulato, avvantaggiato peraltro dalla sua estrema adattabilità, potendo colonizzare sia i comprensori di pianura, che quelli collinari e montani, ad eccezione solo delle zone a forte e prolungato innevamento. Il capriolo è infatti abbondante su tutto l'arco alpino nord-orientale e centrale (dal Friuli al Trentino e Alpi lombarde), mentre la sua presenza si riduce spostandosi sul versante occidentale. Per quanto riguarda l'Italia Centrale, la sua distribuzione può essere definita a macchie di leopardo. Sono comunque presenti popolazioni di un certo rilievo in Maremma e lungo tutta la dorsale appenninica della Toscana. Sembra evidente che questa presenza si stia velocemente estendendo anche all'Appennino Umbro-Marchigiano (Ladini, 1989, Ferloni, 1998). Nell'Italia Centro-Meridionale troviamo solo piccoli nuclei isolati. I più consistenti sono in Calabria, ma va ricordato che sono autoctoni solo quelli dei Monti di Orsomarso, mentre quelli della Sila sono stati reintrodotti e provengono dall'Arco Alpino. Anche nel Gargano pare vi

¹ Ricerche eseguite con il contributo finanziario del MIUR (fondi locali per la ricerca). Il lavoro spetta in parti uguali agli Autori.

² Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti - Università degli Studi - 43100 Parma

³ Indirizzo per corrispondenza - *Corresponding Author*: alberto.sabbioni@unipr.it

⁴ Medico Veterinario libero professionista, Noceto, PR.

fosse un nucleo indigeno, ormai non più puro. All'interno del Parco Nazionale d'Abruzzo gli animali sono invece stati del tutto reintrodotti (Fontana e Cerritelli, 2002).

In provincia di Parma, il più recente censimento (marzo 2002) effettuato su 42971 ettari, ha stimato la presenza di 8614 caprioli.

Dal punto di vista demografico, si assiste tuttora allo spostamento di esemplari dalle zone di origine verso altre, nelle quali la popolazione risulta in calo numerico. Le popolazioni, quindi, devono affrontare le problematiche relative alle reintroduzioni, che, pur rinforzando numericamente la popolazione di capriolo, possono, in qualche caso determinare variazioni nella morfologia dei soggetti, e vere e proprie contaminazioni genetiche, nel caso vengano impiegati soggetti appartenenti ad altri ceppi. Un'ulteriore causa di modificazioni morfologiche nella popolazione è data dall'intervento dell'uomo nella gestione numerica delle popolazioni selvatiche (prelievo selettivo), che potrebbe interferire con il normale svolgimento della selezione naturale, variandone l'impatto sulla popolazione.

Il prelievo venatorio selettivo dei caprioli in provincia di Parma

Il prelievo venatorio selettivo sulla popolazione di capriolo, nasce dalla consapevolezza che essa rappresenta una vera e propria ricchezza e come tale vada gestita (Simonic et al., 1996). L'abbattimento però deve rappresentare solo l'ultimo dei punti fondamentali per una corretta gestione. Certe considerazioni, più emotive che scientifiche, hanno portato talvolta a scegliere la cosiddetta "protezione passiva", soprattutto nei parchi, che consiste nel non attuare prelievo sulla popolazione. I risultati ottenuti hanno tuttavia dimostrato come questo tipo di approccio sia da evitare, perché deleterio per la salute della popolazione e del suo ecosistema. Gestire correttamente una popolazione di caprioli, infatti, vuol dire averne una numericamente accettabile per l'areale che occupa, in armonia con le altre componenti ambientali. Il fine ultimo è quello di contenerne il numero, perché non si creino squilibri all'interno dell'ecosistema e perché non si abbiano effetti negativi sulla qualità della popolazione stessa. Ciò vuole anche significare mantenere un rapporto fra i sessi di 1:1 e conservare i giusti rapporti fra le classi di età. E' evidente che il prelievo selettivo, operato dall'uomo, è cosa diversa dalla selezione, operata dai predatori naturali. Quest'ultima è, infatti, rivolta ai soggetti più deboli, ai malati o a quelli feriti, mentre la prima ha come obiettivo soggetti in genere sani, con una normale attività e quindi in grado di essere avvistati ed abbattuti. L'effetto del prelievo selettivo si limita quindi al solo controllo numerico degli individui, cercando di rispettare il naturale equilibrio dinamico che caratterizza una popolazione sana.

Per non incorrere in errori che porterebbero ad un sicuro insuccesso, è indispensabile prendere in considerazione il capriolo non come specie a sé stante, ma facente parte di un contesto biologico. A tal fine, bisogna tenere conto anche dell'ambiente che lo ospita, non trascurando le sue componenti biogeologiche, vegetazionali, le altre specie presenti e, non ultima, la presenza delle attività umane (Wotschikowski, 1996; Wotschikowski e Heidegger, 2001).

Diventa così possibile raggiungere la consistenza ottimale della popolazione e conservarla tale nel suo habitat, in modo da creare un equilibrio dinamico che coinvolga capriolo, ambiente e altre specie, compreso l'uomo.

Tenendo in considerazione tutte queste variabili saremo in grado di avere un ambiente in buone condizioni e una popolazione di qualità per quanto riguarda il trofeo, i parametri biometrici ma soprattutto per il suo aspetto sanitario (Ponti, 1992).

Per una corretta gestione della popolazione di capriolo bisogna toccare, con un ordine cronologico preciso, una serie di tappe fondamentali.

In primo luogo occorre valutare il territorio che ospita la popolazione, inserendolo per quanto possibile, in classi tipologiche relative all'altitudine, alla flora, al suolo, alla presenza di acqua, di predatori e di insediamenti umani. Questo ci permette di stabilire la capacità faunistica di un distretto.

In secondo luogo serve il censimento della popolazione. Esso può essere effettuato con diversi sistemi che prevedono, comunque, l'osservazione diretta degli animali o dei segni di presenza. E' importante sottolineare ancora una volta che, per avere un'idea precisa del patrimonio da gestire, è necessario raccogliere sia dati quantitativi che qualitativi sugli animali (sesso e classi di età).

In terzo luogo, sempre per il rilievo qualitativo dei capi, bisogna praticare un controllo sanitario. Già l'osservazione diretta degli animali ci è d'aiuto, in quanto ci permette di rilevare alcune alterazioni ben evidenti. E' il caso, ad esempio, di micosi o altre parassitosi cutanee molto estese; un efficace sistema di controllo sanitario ci dà anche indicazioni sullo stato di nutrizione dei soggetti. Importante è la raccolta dei capi eventualmente trovati morti sul territorio ed il loro conferimento presso strutture specializzate per i controlli sanitari (Istituti Zooprofilattici Sperimentali). Qui infatti sarà possibile effettuare indagini sull'eventuale presenza di forme parassitarie di diverso tipo, indagini batteriologiche e virologiche e avere indicazioni sulla presenza di una certa patologia all'interno della popolazione.

Il quarto punto della gestione consiste nel praticare degli interventi di assistenza, che si risolvono con il foraggiamento, con la creazione di saline e, saltuariamente, con l'abbeverata. Questo è un punto molto dibattuto, perché non tutti sono d'accordo sulla correttezza metodologica di tale pratica. Per sciogliere ogni dubbio basta ricordare che la somministrazione di foraggio non va intesa come un mezzo per aumentare e sostenere numericamente gli animali, ma per migliorarne la qualità. Ancora, è un mezzo per tutelare l'ambiente, sia per conservarlo che per prevenire eventuali danni alle colture boschive e alle coltivazioni agricole. Materialmente si tratta di mantenere una percentuale di coltivi appositamente per i caprioli per offrire loro un nutrimento ricco e vario durante tutto l'arco dell'anno e non solo durante gli inverni più rigidi come si faceva un tempo. In alcune riserve pilota e in altre foreste demaniali si è anche sperimentata la somministrazione diretta di alimento (barbabietole da zucchero, mele, concentrati). I risultati sono ovviamente positivi, anche se sul campo tale pratica è difficilmente attuabile. Ancora, è importante mettere a disposizione degli animali i minerali salini.

Il quinto punto prevede il controllo antibraconaggio, inteso come controllo costante per tutto l'anno, effettuato non più solo dagli agenti di Polizia Provinciale ma con la collaborazione di tutte le figure coinvolte nel piano di gestione, primi fra tutti i selecontrollori. E' certo che l'esperienza, l'acquisizione di un bagaglio culturale specifico e il rispetto delle normative vigenti da parte dei cacciatori, ci potrebbe portare nei prossimi anni ai livelli delle gestioni del Nord Europa, dove prioritario a tutto è il rispetto degli animali e dell'ambiente nei quali essi vivono. Si tratterebbe di

legare il cacciatore non tanto al territorio ma alle sue risorse. Da non dimenticare, poi, il monitoraggio della presenza di cani randagi, che costituiscono un notevole pericolo per la popolazione di capriolo.

Il sesto punto, è quello relativo al prelievo selettivo. La quota da prelevare va calcolata alla luce della capacità faunistica di un particolare distretto, dei risultati dei censimenti effettuati e della stima delle perdite che si hanno per cause naturali. Anche per il prelievo non è sufficiente parlare di quantità, ma serve precisare la qualità, cioè il tipo di animale che deve essere abbattuto. Infatti ad ogni cacciatore i capi sono assegnati specificando il sesso e la classe di età.

L'ultimo punto della gestione consiste nella compilazione, da parte del cacciatore, della scheda biometrica (Corradi e Musarò, 1995/96; Andina et al., 2001). Dopo ogni abbattimento, il selecontrollore deve conferire il capo alla casa di caccia, punto di riferimento per un intero distretto venatorio. Qui l'animale viene dotato di un'apposita targhetta di riconoscimento e successivamente viene effettuata una serie di rilievi che vengono annotati sulla scheda.

In dettaglio, vi troviamo i dati relativi al cacciatore, alla data, all'ora e al luogo di abbattimento, comprese le condizioni atmosferiche e la presenza di eventuali altri animali. Vengono poi richieste informazioni balistiche sul tiro, che potrebbero essere più esaustive, se abbinate ai dati relativi al calibro e al peso delle palle utilizzate. La restante parte è tutta dedicata all'animale: sesso, classe di età, peso pieno, peso eviscerato, lunghezza naso-coccigea, altezza al garrese, circonferenza toracica e della base del collo, lunghezza dell'orecchio, dell'arto anteriore, di quello posteriore, della mandibola. Per i maschi, poi, vanno raccolti i dati relativi al trofeo: lunghezza delle stanghe, forma del palco e circonferenza delle rose.

Questo lavoro ha un grande significato. Prima di tutto permette di controllare la corrispondenza fra il capo assegnato al selecontrollore e l'animale abbattuto, per poi poter redigere una relazione finale sull'adempimento più o meno corretto del piano d'abbattimento. Inoltre ha grande valore per la valutazione dell'evoluzione delle condizioni della popolazione del distretto con il passare degli anni e con la definizione delle caratteristiche biometriche degli animali, della ripartizione nelle classi di età, ecc..

Qualche critica si potrebbe avanzare relativamente all'accuratezza del rilevamento dei dati, affidata al singolo cacciatore e non ad una figura unica per tutti gli animali abbattuti. Tuttavia, analizzando la scheda biometrica si vede come venga lasciato poco spazio alla fantasia del selecontrollore, poiché su ognuna è riportato il disegno schematico che chiarisce il rilievo da effettuare. Per quanto riguarda poi la perizia impiegata per il rilievo, va ricordato che i cacciatori abilitati alla caccia di selezione sono culturalmente addestrati e preparati alla misurazione. Comunque, anche in prospettiva di un utilizzo omogeneo e generalizzato delle schede di abbattimento, che preveda collegamenti con altre province o regioni, auspichiamo, per il futuro, la nascita di una figura specifica, quella del rilevatore, con il preciso compito di effettuare al meglio e nel modo più omogeneo ed obiettivo possibile le valutazioni biometriche.

La provincia di Parma è divisa in nove Ambiti Territoriali di Caccia (ATC), a fianco dei quali troviamo le Aziende Faunistico-Venatorie (AFV). In questi territori si è sempre praticata la caccia tradizionale alla selvaggina stanziale e di passo; da circa

25 anni si caccia il cinghiale in squadre organizzate e parallelamente, in alcuni di essi, dal 1995, ha avuto inizio la caccia di selezione al capriolo.

Il primo distretto ad attuare un piano di prelievo fu il distretto 1 dell'ATC PR 8, che si colloca nelle vicinanze dei Boschi di Carrega (Sala Baganza), e le AFV che in esso ricadevano, nell'annata 1996-1997, per un esiguo numero di capi. Dalla stagione 1999-2000 vengono effettuati abbattimenti in tutti i distretti dell'ATC, che sono tuttora oggetto di prelievo.

Attualmente gli ATC e le AFV coinvolti nel prelievo selettivo del capriolo sono:

l'ATC PR 4 (superficie ha. 21.974) che comprende i comuni di Parma (circoscrizioni n° 6 e 7), Montechiarugolo, Traversetolo, Lesignano de' Bagni, Langhirano, Neviano degli Arduini, con l'AFV Villa S. Giovanni e Paolo;

l'ATC PR 5 (superficie ha. 30.815) che comprende i comuni di Berceto (parte), Corniglio, Tizzano Val Parma, Palanzano, Monchio delle Corti, con le AFV Alta Val Parma, Curatico-Signatico-Corniglio, Valle dei Cavalieri;

l'ATC PR 8 (superficie ha. 33.120) che comprende i comuni di Noceto, Parma (circoscrizioni n° 1, 2 e 3), Collecchio, Medesano, Sala Baganza, Felino, Varano Melegari, Fornovo Taro, Terenzo, Calestano, Solignano, Berceto (parte), con le AFV Cereto, Talignano, Casanova, Monte Sporno.

Altre AFV effettuano prelievo selettivo, ma non sono state prese in considerazione nella presente ricerca per l'esiguo numero di animali abbattuti o per la difficoltà di reperire i dati relativi.

Il numero di animali oggetto di prelievo è molto diverso nei diversi ATC e AFV, perché molto diverse sono la tipologia e l'estensione dei distretti interessati e, di conseguenza, anche la capacità faunistica e la densità degli animali.

Il calendario venatorio ha subito delle modifiche nel corso degli anni, poiché è stato plasmato a seconda dei risultati e delle esperienze raccolte negli anni precedenti.

Ad oggi, il calendario Regionale e quello Provinciale prevedono due diversi periodi di caccia. Il primo si colloca in agosto ed interessa l'abbattimento dei soli maschi subadulti, adulti e vecchi. Il secondo si colloca fra dicembre e gennaio ed interessa le femmine di tutte le età e i piccoli maschi. Nei primi anni di prelievo, invece, anche le femmine e i piccoli venivano abbattuti ad agosto.

Obiettivo della ricerca è stato, in primo luogo, quello di valutare le caratteristiche biometriche della popolazione di caprioli in provincia di Parma, quindi di stabilire l'andamento della crescita dei gruppi di animali presenti in areali diversi, anche se confinanti, allo scopo di verificare eventuali differenze.

Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta analizzando le schede biometriche di 1225 caprioli abbattuti negli anni dal 1997 al 2002 presso gli ATC PR4, PR5 e PR8.

E' stata utilizzata la scheda descritta in precedenza. I rilievi hanno interessato il sesso, l'età e l'ATC di abbattimento dei caprioli, nonché i dati biometrici degli animali (peso pieno ed eviscerato, lunghezza totale, altezza al garrese, circonferenza toracica, lunghezza dell'orecchio, lunghezza dell'arto anteriore e posteriore, circonferenza alla base del collo e lunghezza della mandibola). Con il termine di peso evi-

scerato si intende il peso della carcassa privata di tutti gli organi. L'età degli animali è stata stimata sulla base delle caratteristiche della tavola dentaria da personale qualificato ed espressa in mesi. Sono quindi state formate delle classi di età, in tal modo suddivise:

classe 0 : piccoli (animali che sono dipendenti dalla madre): corrispondente alle età da 0 a 12 mesi;

classe 1 : subadulti (animali che sono biologicamente maturi per la riproduzione ma che non hanno ancora raggiunto una posizione che permetta loro di accoppiarsi, cioè socialmente immaturi): corrispondente alle età dai 13 ai 23 mesi;

classe 2 : adulti (animali maturi ed in grado di riprodursi): corrispondente all'età da 24 a 84 mesi;

classe 3 : vecchi (animali che, sia dal punto di vista biologico che sociale, sono in regressione): corrispondente ad un'età superiore a 84 mesi.

I dati sono stati elaborati statisticamente con il package SPSS (ver. 10.0.6, 1999), applicando l'analisi della varianza, secondo un modello misto che prevedeva i fattori fissi ATC (3 livelli), sesso (2 livelli), classe di età (4 livelli) ed età entro classe (16 livelli), nonché le interazioni fra ATC e classe e fra ATC ed età entro classe. L'analisi ha permesso, quindi, di elaborare tabelle contenenti le medie stimate dei pesi e delle misurazioni biometriche per le combinazioni di ATC, sesso ed età.

Infine, attraverso l'applicazione della regressione non lineare, i dati sono stati adattati alla equazione di Gompertz (Emmans, 1989), nella seguente forma:

$$P = b_0 \exp(-\exp(-b_1(t-b_2)))$$

in cui P è il peso (kg) dell'animale al mese t; b₀ è il peso (kg) alla maturità; b₁ è il tasso di crescita e b₂ è l'età (mesi) alla quale si raggiunge il tasso di crescita più elevato.

Quando t = b₂, allora P = b₀/e, in cui e = base dei logaritmi naturali. In tale momento è possibile ricavare l'entità del tasso di crescita massimo:

$$(dP/dt)_{\max} = b_1 * b_0 / e.$$

Le differenze fra i parametri calcolati in relazione all'ATC ed al sesso sono state testate con il "t" di Student (Pilla, 1985).

Risultati e discussione

Le schede di abbattimento raccolte sono state, in totale, 1225; tuttavia, di esse, solo 655 (53,5%) riportavano il dato relativo all'età dei soggetti; pertanto, solo queste ultime sono state utilizzate per l'analisi statistica.

La ripartizione numerica dei soggetti per ATC, sesso ed età è riportata nella tabella n.1. Gli animali provenienti dagli ATC PR4, PR5 e PR8 sono stati rispettivamente 123 (18,8%), 186 (28,4%) e 346 (52,8%); i maschi rappresentavano il 51,9% del campione. Le classi di età maggiormente rappresentate sono state la 0 (28,1%) e la 1 (50,7%), mentre la classe 3, che comprende gli animali con più di 7 anni, ha rappresentato solo il 3,1% del campione.

La tabella n.2 riporta i risultati dell'analisi della varianza condotta sui dati desunti dalle schede di abbattimento. Il peso vivo ed il peso eviscerato sono risultati influenzati in modo significativo da tutti i fattori inseriti nel modello. La classe di età dei caprioli è l'unico fattore che influenza significativamente tutti i rilievi, fatta ecce-

Tabella n.1 - Ripartizione numerica del campione nelle classi di ATC, sesso, classe di età ed età.

ATC		PR 4		PR 5		PR 8		totale
SESSO		femmine	maschi	femmine	maschi	femmine	maschi	
CLASSE	ETA' (mesi)							
0	4	-	1	2	1	9	7	20
	9	22	3	15	20	66	38	164
1	15	-	43	1	35	13	99	191
	20	29	-	22	9	81	-	141
2	27	-	1	-	13	1	3	18
	32	3	-	2	-	1	-	6
	39	-	7	-	13	-	5	25
	44	2	-	8	-	4	-	14
	51	-	2	-	13	-	-	15
	56	-	-	10	-	1	-	11
	63	-	4	-	5	1	2	12
	68	1	-	4	-	5	-	10
	75	-	2	-	2	-	-	4
80	1	-	1	-	2	-	4	
3	87	-	-	-	4	-	2	6
	>90	1	1	2	4	5	1	14
totale		59	64	67	119	189	157	655

zione per la lunghezza dell'arto anteriore. A questo proposito, vale la pena di rilevare che tale rilievo presenta un comportamento abbastanza anomalo, diverso da quello relativo alla misura dell'arto posteriore, manifestando l'assenza di influenza significativa da parte di tutti i fattori del modello ($R^2 = 0,190$ e $0,356$, rispettivamente, per l'arto anteriore e posteriore). Probabilmente ciò è dovuto ad una certa imprecisione nella misurazione, cui contribuisce il disegno di riferimento sulla scheda di abbattimento. Infatti, mentre il profilo dell'arto posteriore (dalla punta del garretto alla punta degli unghia) è rettilineo, come deve essere la misurazione, quello dell'arto anteriore (dalla punta del gomito alla punta degli unghia) è curvilineo nella porzione dal carpo al gomito, mentre la misura dovrebbe essere presa sulla proiezione e non seguendo il profilo. Inoltre da un'analisi della correlazione effettuata sulle misure, la lunghezza dell'arto anteriore è risultata meno correlata con l'altezza al garrese e con la circonferenza toracica, rispetto a quella dell'arto posteriore (dati non tabulati).

Riteniamo pertanto consigliabile eliminare il rilievo della lunghezza dell'arto anteriore dalle schede o quanto meno definirne meglio le modalità applicative.

Il rilievo con il coefficiente di determinazione più basso è stato quello effettuato sulla lunghezza dell'orecchio. Esso riveste proprio per questo un'importante funzione pratica, perché, essendo tale misura abbastanza costante a tutte le età del capriolo, permette al selecontrollore di avere un riferimento per la valutazione a distanza della lunghezza del trofeo. Non stupisce quindi l'assenza di significatività dei fattori inseriti nel modello.

Tabella n.2 - Analisi della varianza.

	peso vivo	peso eviscerato	lunghezza corpo	altezza al garrese	circonf. toracica	lunghezza orecchio	lunghezza arto anteriore	lunghezza arto posteriore	circonf. base collo	lunghezza mandibola
	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2
ATC	41.26**	26.36**	12.71	129.56**	12.48	0.69	1.45	14.64*	48.52	5.29**
Sesso	57.86**	48.59**	11.43	20.68	13.41	0.82	0.26	7.14	599.05***	0.00
Classe	674.17***	456.37***	1460.96***	416.82***	376.74***	8.07**	5.12	106.18***	299.92***	15.23***
Età (classe)	21.75***	15.72***	66.78	28.91	39.25*	1.09	6.76*	10.92**	44.42**	1.36
ATC*classe	20.66**	17.63**	152.81**	26.72	88.37***	3.74*	6.12	4.18	93.12***	1.55
ATC*età	9.80*	10.33**	39.11	14.23	22.41	1.49	4.63	4.36	10.72	1.31
Errore	5.38	5.01	43.21	19.64	20.76	1.72	3.40	4.23	18.82	0.96
R ²	0.679	0.631	0.470	0.310	0.330	0.176	0.180	0.356	0.268	0.511

*: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.01

Il sesso risulta fortemente significativo sulla circonferenza alla base del collo, per l'evidente relazione che tale misura ha con la presenza del palco nei maschi.

L'ATC ha influenzato significativamente alcune misure, quali l'altezza al garrese, la lunghezza dell'arto posteriore e della mandibola, oltre che, come già detto in precedenza, il peso (sia vivo che eviscerato).

Le tabelle dalla n.3 alla n.8 riportano, in modo analitico, i pesi e le misure rilevati sui caprioli, ripartite per ATC, sesso ed età. In generale, è necessario notare, con riferimento al peso vivo, la presenza di variazioni in meno, che si riscontrano spesso in corrispondenza dei rilievi a 20, 32, 44 e 56 mesi, con valori inferiori, rispetto ai

Tabella n.3 - Caratteristiche ponderali e biometriche di caprioli presenti nell'ATC PR4 (Parma): maschi (medie stimate \pm e.s.).

età	peso vivo	peso eviscerato	lunghezza corpo	altezza al garrese	circonf. toracica	lunghezza orecchio	lunghezza arto anteriore	lunghezza arto post.	circonf. base collo	lunghezza mandibola
mesi	kg	kg	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
4	15.2 \pm 2.3	11.9 \pm 2.2	100.0 \pm 6.6	58.0 \pm 4.4	60.0 \pm 4.6	15.0 \pm 1.3	28.0 \pm 1.8	29.0 \pm 2.1	28.0 \pm 4.3	14.0 \pm 1.0
9	18.6 \pm 0.5	14.1 \pm 0.5	102.4 \pm 1.5	62.9 \pm 1.0	61.5 \pm 1.1	14.3 \pm 0.3	25.3 \pm 0.4	31.6 \pm 0.5	33.2 \pm 1.0	15.5 \pm 0.5
15	22.8 \pm 0.4	17.7 \pm 0.3	109.9 \pm 1.0	66.8 \pm 0.7	64.4 \pm 0.7	14.9 \pm 0.2	26.3 \pm 0.3	33.5 \pm 0.3	33.6 \pm 0.7	15.9 \pm 0.2
20	23.6 \pm 0.5	18.3 \pm 0.5	109.5 \pm 1.5	65.6 \pm 1.0	68.2 \pm 1.1	15.2 \pm 0.3	25.8 \pm 0.4	33.4 \pm 0.5	36.5 \pm 1.0	16.6 \pm 0.5
27	28.0 \pm 2.3	19.0 \pm 2.2	115.0 \pm 6.6	70.0 \pm 4.4	68.0 \pm 4.6	14.0 \pm 1.3	27.0 \pm 1.8	36.0 \pm 2.1	37.0 \pm 4.3	17.0 \pm 1.0
32	27.0 \pm 1.4	21.5 \pm 1.3	109.5 \pm 3.9	66.4 \pm 2.6	75.5 \pm 2.7	15.1 \pm 0.8	27.3 \pm 1.1	33.3 \pm 1.2	37.8 \pm 2.6	16.4 \pm 0.7
39	27.7 \pm 0.9	21.2 \pm 0.8	114.9 \pm 2.5	72.0 \pm 1.7	69.3 \pm 1.7	15.7 \pm 0.5	26.6 \pm 0.7	34.1 \pm 0.8	36.3 \pm 1.6	17.3 \pm 0.5
44	27.0 \pm 1.7	20.6 \pm 1.6	116.0 \pm 4.7	66.9 \pm 3.2	69.5 \pm 3.3	14.4 \pm 0.9	26.4 \pm 1.3	34.8 \pm 1.5	41.6 \pm 3.1	17.3 \pm 0.8
51	28.5 \pm 1.6	19.5 \pm 1.6	119.0 \pm 4.6	70.5 \pm 3.1	66.5 \pm 3.2	15.5 \pm 0.9	26.5 \pm 1.3	35.5 \pm 1.5	37.0 \pm 3.1	18.0 \pm 1.0
63	27.8 \pm 1.2	22.5 \pm 1.1	116.4 \pm 3.3	69.0 \pm 2.2	65.6 \pm 2.3	15.7 \pm 0.7	26.5 \pm 0.9	32.9 \pm 1.0	34.8 \pm 2.2	17.8 \pm 0.7
68	30.0 \pm 2.3	24.2 \pm 2.3	110.5 \pm 6.6	70.4 \pm 4.5	69.5 \pm 4.6	16.1 \pm 1.3	23.9 \pm 1.9	37.3 \pm 2.1	35.1 \pm 4.4	18.0 \pm 1.1
75	27.0 \pm 1.6	22.5 \pm 1.6	114.5 \pm 4.6	73.5 \pm 3.1	65.0 \pm 3.2	16.5 \pm 0.9	28.0 \pm 1.3	34.0 \pm 1.5	36.0 \pm 3.1	18.0 \pm 1.0
80	28.0 \pm 2.3	21.4 \pm 2.3	112.5 \pm 6.6	70.4 \pm 4.5	75.5 \pm 4.6	17.1 \pm 1.3	26.9 \pm 1.8	36.3 \pm 2.1	40.1 \pm 4.4	-
>90	29.8 \pm 1.6	22.5 \pm 1.6	117.7 \pm 4.7	69.2 \pm 3.1	70.3 \pm 3.2	16.8 \pm 0.9	28.0 \pm 1.3	34.9 \pm 1.5	47.1 \pm 3.1	18.0 \pm 0.7

Tabella n.4 - Caratteristiche ponderali e biometriche di caprioli presenti nell'ATC PR4 (Parma): femmine (medie stimate \pm e.s.).

età	peso vivo	peso eviscerato	lunghezza corpo	altezza al garrese	circonf. toracica	lunghezza orecchio	lunghezza arto anteriore	lunghezza arto post.	circonf. base collo	lunghezza mandibola
mesi	kg	kg	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
4	14.2 \pm 2.3	11.0 \pm 2.3	99.5 \pm 6.6	58.6 \pm 4.5	59.5 \pm 4.6	14.9 \pm 1.3	28.1 \pm 1.9	28.7 \pm 2.1	24.9 \pm 4.4	14.0 \pm 1.1
9	17.6 \pm 0.5	13.2 \pm 0.4	101.9 \pm 1.3	63.6 \pm 0.9	70.0 \pm 0.9	14.1 \pm 0.3	25.3 \pm 0.4	31.3 \pm 0.4	30.1 \pm 0.9	15.5 \pm 0.4
15	21.8 \pm 0.5	16.8 \pm 0.4	109.4 \pm 1.4	67.5 \pm 0.9	63.9 \pm 0.9	14.8 \pm 0.3	26.3 \pm 0.4	33.1 \pm 0.4	30.5 \pm 0.9	15.9 \pm 0.5
20	22.6 \pm 0.5	17.5 \pm 0.4	109.1 \pm 1.2	66.2 \pm 0.8	60.7 \pm 0.8	15.1 \pm 0.2	25.8 \pm 0.3	33.1 \pm 0.4	33.4 \pm 0.8	16.6 \pm 0.3
27	27.0 \pm 2.3	18.1 \pm 2.3	114.5 \pm 6.6	70.6 \pm 4.5	67.5 \pm 4.6	13.9 \pm 1.3	27.1 \pm 1.9	35.7 \pm 2.1	33.9 \pm 4.4	17.0 \pm 1.1
32	26.0 \pm 1.3	20.6 \pm 1.3	109.0 \pm 3.8	67.0 \pm 2.6	75.0 \pm 2.6	15.0 \pm 0.8	27.3 \pm 1.1	33.0 \pm 1.2	34.7 \pm 2.5	16.3 \pm 0.6
39	26.8 \pm 0.9	20.3 \pm 0.9	114.4 \pm 2.6	72.6 \pm 1.8	68.8 \pm 1.8	15.6 \pm 0.5	26.6 \pm 0.7	33.8 \pm 0.8	33.2 \pm 1.7	17.2 \pm 0.7
44	26.0 \pm 1.6	19.8 \pm 1.6	115.5 \pm 4.6	67.5 \pm 3.1	69.0 \pm 3.2	14.3 \pm 0.9	26.5 \pm 1.3	34.5 \pm 1.5	38.5 \pm 3.1	17.3 \pm 0.7
51	27.5 \pm 1.7	18.6 \pm 1.6	118.5 \pm 4.7	71.1 \pm 3.2	66.0 \pm 3.3	15.4 \pm 0.9	26.6 \pm 1.3	35.2 \pm 1.5	33.9 \pm 3.1	18.0 \pm 1.1
63	26.9 \pm 1.2	21.6 \pm 1.2	115.9 \pm 3.4	69.6 \pm 2.3	65.1 \pm 2.4	15.5 \pm 0.7	26.6 \pm 1.0	32.5 \pm 1.1	31.6 \pm 2.2	17.8 \pm 0.8
68	29.0 \pm 2.3	23.3 \pm 2.2	110.0 \pm 6.6	71.0 \pm 4.4	69.0 \pm 4.6	16.0 \pm 1.3	24.0 \pm 1.9	37.0 \pm 2.1	32.0 \pm 4.3	18.0 \pm 1.0
75	26.0 \pm 1.7	21.6 \pm 1.6	114.0 \pm 4.7	74.1 \pm 3.2	64.5 \pm 3.3	16.4 \pm 0.9	28.1 \pm 1.3	33.7 \pm 1.5	32.9 \pm 3.1	18.0 \pm 1.1
80	27.0 \pm 2.3	20.5 \pm 2.2	112.0 \pm 6.6	71.0 \pm 4.4	75.0 \pm 4.6	17.0 \pm 1.3	27.0 \pm 1.8	36.0 \pm 2.1	37.0 \pm 4.3	-
>90	28.9 \pm 1.6	21.7 \pm 1.6	117.3 \pm 4.7	69.8 \pm 3.1	69.7 \pm 3.2	16.7 \pm 0.9	28.0 \pm 1.3	34.6 \pm 1.5	43.9 \pm 3.1	18.0 \pm 0.7

Tabella n.5 - Caratteristiche ponderali e biometriche di caprioli presenti nell'ATC PR5 (Parma): maschi (medie stimate \pm e.s.).

età	peso vivo	peso eviscerato	lunghezza corpo	altezza al garrese	circonf. toracica	lungh. orecchio	lungh. arto anteriore	lungh. arto post.	circonf. base collo	lungh. mandibola
mesi	kg	kg	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
4	10.7 \pm 1.4	7.4 \pm 1.3	-	-	-	-	-	28.2 \pm 1.2	25.6 \pm 3.1	11.8 \pm 0.8
9	19.0 \pm 0.4	14.1 \pm 0.4	102.3 \pm 1.2	65.1 \pm 0.8	63.9 \pm 0.8	14.4 \pm 0.2	25.9 \pm 0.3	33.0 \pm 0.4	33.0 \pm 0.8	15.3 \pm 0.5
15	23.0 \pm 0.4	17.6 \pm 0.4	108.1 \pm 1.2	67.1 \pm 0.8	63.9 \pm 0.8	14.9 \pm 0.2	26.8 \pm 0.3	34.6 \pm 0.3	32.9 \pm 0.7	16.3 \pm 0.3
20	20.5 \pm 0.5	15.6 \pm 0.4	105.0 \pm 1.4	64.2 \pm 0.9	63.7 \pm 0.9	14.3 \pm 0.3	25.2 \pm 0.4	33.3 \pm 0.4	34.4 \pm 0.9	15.8 \pm 0.6
27	24.5 \pm 0.6	19.5 \pm 0.6	113.6 \pm 2.1	68.2 \pm 1.4	66.4 \pm 1.4	15.2 \pm 0.4	26.8 \pm 0.6	34.8 \pm 0.6	35.8 \pm 1.2	16.4 \pm 0.3
32	23.8 \pm 1.7	18.4 \pm 1.6	120.5 \pm 6.6	74.4 \pm 4.5	78.5 \pm 4.6	16.1 \pm 1.3	23.9 \pm 1.9	35.3 \pm 2.1	34.1 \pm 3.1	16.0 \pm 0.8
39	26.1 \pm 0.6	20.9 \pm 0.6	116.8 \pm 2.2	69.7 \pm 1.5	68.1 \pm 1.5	15.7 \pm 0.4	26.6 \pm 0.6	35.2 \pm 0.6	37.8 \pm 1.2	16.7 \pm 0.3
44	25.6 \pm 0.9	20.1 \pm 0.8	116.9 \pm 2.6	69.8 \pm 1.8	71.5 \pm 1.8	15.4 \pm 0.5	27.1 \pm 0.7	35.0 \pm 0.8	37.1 \pm 1.6	16.4 \pm 0.8
51	27.2 \pm 0.6	21.5 \pm 0.6	114.3 \pm 1.9	72.8 \pm 1.3	67.8 \pm 1.3	16.1 \pm 0.4	27.7 \pm 0.5	36.7 \pm 0.6	36.3 \pm 1.2	17.1 \pm 0.4
56	26.1 \pm 0.8	19.9 \pm 0.8	112.7 \pm 2.3	68.8 \pm 1.5	69.9 \pm 1.6	15.5 \pm 0.5	26.4 \pm 0.7	34.2 \pm 0.7	36.4 \pm 1.5	16.4 \pm 0.5
63	28.1 \pm 1.0	23.0 \pm 1.0	125.3 \pm 3.3	74.7 \pm 2.6	67.5 \pm 2.3	14.8 \pm 0.7	28.0 \pm 0.9	36.4 \pm 0.9	34.5 \pm 1.9	17.4 \pm 0.5
68	24.2 \pm 1.2	17.9 \pm 1.2	111.7 \pm 3.4	71.1 \pm 2.3	68.0 \pm 2.4	16.6 \pm 0.7	26.9 \pm 1.0	34.3 \pm 1.1	36.6 \pm 2.2	15.5 \pm 0.7
75	26.0 \pm 1.6	21.0 \pm 1.6	118.5 \pm 4.6	70.5 \pm 3.1	68.0 \pm 3.2	15.5 \pm 0.9	27.0 \pm 1.3	35.5 \pm 1.5	38.5 \pm 3.1	16.7 \pm 1.0
80	26.0 \pm 2.3	19.9 \pm 2.3	110.5 \pm 6.6	71.4 \pm 4.5	74.5 \pm 4.6	15.1 \pm 1.3	25.9 \pm 1.9	35.3 \pm 2.1	40.1 \pm 4.4	16.0 \pm 1.1
87	25.0 \pm 1.2	20.5 \pm 1.1	118.3 \pm 3.3	70.0 \pm 2.2	69.5 \pm 2.3	16.5 \pm 0.7	26.5 \pm 0.9	34.5 \pm 1.0	39.5 \pm 2.2	15.8 \pm 0.7
>90	26.7 \pm 1.0	21.5 \pm 0.9	123.4 \pm 3.0	73.6 \pm 2.0	72.2 \pm 2.1	15.9 \pm 0.6	27.4 \pm 0.8	36.1 \pm 0.9	39.7 \pm 1.8	17.2 \pm 0.4

Tabella n.6 - Caratteristiche ponderali e biometriche di caprioli presenti nell'ATC PR5 (Parma): femmine (medie stimate \pm e.s.).

età	peso vivo	peso eviscerato	lunghezza corpo	altezza al garrese	circonf. toracica	lungh. orecchio	lungh. arto anteriore	lungh. arto post.	circonf. base collo	lungh. mandibola
mesi	kg	kg	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
4	9.8 \pm 1.3	6.5 \pm 1.3	-	-	-	-	-	27.9 \pm 1.2	22.5 \pm 3.1	11.8 \pm 0.7
9	18.1 \pm 0.4	13.2 \pm 0.4	101.8 \pm 1.2	65.7 \pm 0.8	63.4 \pm 0.9	14.3 \pm 0.2	25.9 \pm 0.4	32.6 \pm 0.4	29.9 \pm 0.8	15.3 \pm 0.4
15	22.1 \pm 0.5	16.8 \pm 0.5	107.6 \pm 1.5	67.7 \pm 1.0	63.4 \pm 1.0	14.8 \pm 0.3	26.9 \pm 0.4	34.2 \pm 0.4	29.8 \pm 0.9	16.3 \pm 0.5
20	19.5 \pm 0.4	14.7 \pm 0.4	104.6 \pm 1.2	64.8 \pm 0.8	63.2 \pm 0.9	14.2 \pm 0.2	25.3 \pm 0.3	32.9 \pm 0.4	31.3 \pm 0.8	15.8 \pm 0.4
27	23.5 \pm 0.7	18.7 \pm 0.7	113.1 \pm 2.3	68.8 \pm 1.5	65.9 \pm 1.6	15.0 \pm 0.5	26.9 \pm 0.6	34.5 \pm 0.7	32.7 \pm 1.3	16.3 \pm 0.5
32	22.9 \pm 1.6	17.5 \pm 1.6	120.0 \pm 6.6	75.0 \pm 4.4	78.0 \pm 4.6	16.0 \pm 1.3	24.0 \pm 1.8	35.0 \pm 2.1	31.0 \pm 3.1	16.0 \pm 0.7
39	25.2 \pm 0.7	20.0 \pm 0.7	116.3 \pm 2.4	70.3 \pm 1.6	67.6 \pm 1.6	15.5 \pm 0.5	26.7 \pm 0.7	34.8 \pm 0.7	34.7 \pm 1.3	16.7 \pm 0.5
44	24.7 \pm 0.8	19.2 \pm 0.8	116.4 \pm 2.5	70.4 \pm 1.7	71.0 \pm 1.7	15.3 \pm 0.5	27.2 \pm 0.7	34.6 \pm 0.8	34.0 \pm 1.5	16.4 \pm 0.7
51	26.2 \pm 0.7	20.7 \pm 0.7	113.8 \pm 2.1	73.5 \pm 1.4	67.3 \pm 1.5	16.0 \pm 0.4	27.7 \pm 0.6	36.3 \pm 0.6	33.2 \pm 1.3	17.0 \pm 0.6
56	25.1 \pm 0.7	19.0 \pm 0.7	112.2 \pm 2.1	69.4 \pm 1.4	69.4 \pm 1.4	15.4 \pm 0.4	26.5 \pm 0.6	33.9 \pm 0.7	33.3 \pm 1.4	16.4 \pm 0.3
63	27.1 \pm 1.1	22.1 \pm 1.0	124.8 \pm 3.4	75.3 \pm 2.6	67.0 \pm 2.4	14.6 \pm 0.7	28.1 \pm 1.0	36.1 \pm 1.0	31.4 \pm 2.0	17.3 \pm 0.7
68	23.3 \pm 1.2	17.0 \pm 1.1	111.3 \pm 3.3	71.8 \pm 2.2	67.5 \pm 2.3	16.5 \pm 0.7	27.0 \pm 0.9	34.0 \pm 1.0	33.5 \pm 2.2	15.5 \pm 0.6
75	25.0 \pm 1.7	20.1 \pm 1.6	118.0 \pm 4.7	71.1 \pm 3.2	67.5 \pm 3.3	15.4 \pm 0.9	27.1 \pm 1.3	35.2 \pm 1.5	35.4 \pm 3.1	16.7 \pm 1.1
80	25.0 \pm 2.3	19.0 \pm 2.2	110.0 \pm 6.6	72.0 \pm 4.4	74.0 \pm 4.6	15.0 \pm 1.3	26.0 \pm 1.8	35.0 \pm 2.1	37.0 \pm 4.3	16.0 \pm 1.0
87	24.0 \pm 1.2	19.6 \pm 1.2	117.8 \pm 3.4	70.6 \pm 2.3	69.0 \pm 2.4	16.4 \pm 0.7	26.6 \pm 1.0	34.2 \pm 1.1	36.4 \pm 2.2	16.7 \pm 0.8
>90	25.8 \pm 1.0	20.6 \pm 0.9	122.9 \pm 3.0	74.2 \pm 2.0	71.7 \pm 2.1	15.7 \pm 0.6	27.4 \pm 0.8	35.8 \pm 0.9	36.6 \pm 1.8	17.2 \pm 0.5

pesi delle età immediatamente precedenti. Tale crescita a "gradini" è dovuta ai rilievi fatti in corrispondenza degli abbattimenti invernali, quando la disponibilità foraggera è minima. Tale considerazione si può fare anche con riferimento al peso eviscerato; l'entità delle differenze riscontrate è risultata, in questo caso, molto inferiore.

I parametri dell'equazione di Gompertz, riferiti sia al peso vivo sia a quello eviscerato, in funzione dell'età, sono riportati nelle tabelle nn. 9 (vedi anche grafici da 1 a 4) e 10, rispettivamente.

Tabella n.7 - Caratteristiche ponderali e biometriche di caprioli presenti nell'ATC PR8 (Parma): maschi (medie stimate \pm e.s.).

età	peso vivo	peso eviscerato	lunghezza corpo	altezza al garrese	circonf. toracica	lungh. orecchio	lungh. arto ant.	lungh. arto post.	circonf. base collo	lungh. mandibola
mesi	kg	kg	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
4	14.3 \pm 0.6	10.9 \pm 0.6	89.5 \pm 2.0	61.8 \pm 1.4	52.2 \pm 1.4	13.9 \pm 0.4	24.9 \pm 0.6	30.2 \pm 0.5	28.4 \pm 1.2	14.0 \pm 1.1
9	19.5 \pm 0.3	15.2 \pm 0.3	103.9 \pm 0.9	67.0 \pm 0.6	64.0 \pm 0.6	14.6 \pm 0.2	26.0 \pm 0.2	33.6 \pm 0.3	34.4 \pm 0.6	14.8 \pm 0.5
15	24.6 \pm 0.2	19.6 \pm 0.2	114.6 \pm 0.7	71.3 \pm 0.5	66.7 \pm 0.5	15.5 \pm 0.1	27.6 \pm 0.2	35.7 \pm 0.2	35.2 \pm 0.4	16.7 \pm 0.2
20	24.3 \pm 0.4	19.2 \pm 0.4	111.7 \pm 1.2	69.8 \pm 0.8	68.1 \pm 0.8	15.5 \pm 0.2	26.7 \pm 0.3	35.2 \pm 0.4	38.8 \pm 0.7	15.8 \pm 0.5
27	25.4 \pm 1.2	19.5 \pm 1.1	117.2 \pm 3.8	68.5 \pm 2.6	64.8 \pm 2.6	15.4 \pm 0.8	28.0 \pm 1.1	36.9 \pm 1.2	36.3 \pm 2.2	-
32	24.7 \pm 2.4	18.9 \pm 2.3	-	-	-	-	-	-	37.1 \pm 4.4	16.0 \pm 1.1
39	26.2 \pm 1.0	21.2 \pm 1.0	114.3 \pm 4.7	71.0 \pm 3.1	65.0 \pm 3.2	17.0 \pm 0.9	24.5 \pm 1.3	34.7 \pm 1.2	37.2 \pm 1.9	16.1 \pm 0.7
44	26.6 \pm 1.2	21.4 \pm 1.2	120.5 \pm 3.9	72.4 \pm 2.6	67.5 \pm 2.7	15.5 \pm 0.8	28.3 \pm 1.1	34.3 \pm 1.2	36.9 \pm 2.2	16.0 \pm 1.1
56	26.0 \pm 2.3	20.9 \pm 2.3	112.5 \pm 6.6	78.4 \pm 4.5	68.5 \pm 4.6	15.1 \pm 1.3	23.9 \pm 1.9	33.3 \pm 2.1	35.1 \pm 4.4	-
63	26.2 \pm 1.3	26.6 \pm 1.3	123.0 \pm 6.6	74.0 \pm 4.4	73.0 \pm 4.6	16.5 \pm 1.3	30.0 \pm 1.8	37.4 \pm 1.5	38.5 \pm 2.5	16.0 \pm 1.0
68	29.2 \pm 1.1	24.3 \pm 1.0	118.7 \pm 3.4	73.9 \pm 2.3	69.8 \pm 2.4	15.6 \pm 0.7	25.7 \pm 1.0	33.3 \pm 1.0	37.3 \pm 2.0	-
80	26.6 \pm 1.7	21.1 \pm 1.6	129.5 \pm 6.6	75.4 \pm 4.5	65.5 \pm 4.6	15.1 \pm 1.3	28.9 \pm 1.9	36.8 \pm 1.5	34.1 \pm 3.1	-
87	24.0 \pm 1.6	19.0 \pm 1.6	113.0 \pm 4.6	74.0 \pm 3.1	66.0 \pm 3.2	13.8 \pm 0.9	28.3 \pm 1.3	35.5 \pm 1.5	35.5 \pm 3.1	-
>90	25.2 \pm 1.0	19.7 \pm 0.9	116.5 \pm 6.6	74.4 \pm 4.5	69.5 \pm 4.6	15.1 \pm 1.3	26.0 \pm 1.9	35.5 \pm 1.1	32.8 \pm 1.8	16.0 \pm 1.0

Tabella n.8 - Caratteristiche ponderali e biometriche di caprioli presenti nell'ATC PR8 (Parma): femmine (medie stimate \pm e.s.).

età	peso vivo	peso eviscerato	lunghezza corpo	altezza al garrese	circonf. toracica	lungh. orecchio	lungh. arto anteriore	lungh. arto post.	circonf. base collo	lungh. mandibola
mesi	kg	kg	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
4	13.3 \pm 0.6	10.0 \pm 0.6	89.0 \pm 2.0	62.4 \pm 1.4	51.7 \pm 1.4	13.8 \pm 0.4	24.9 \pm 0.6	29.9 \pm 0.5	25.3 \pm 1.1	14.0 \pm 1.0
9	18.5 \pm 0.3	14.3 \pm 0.2	103.4 \pm 0.7	67.6 \pm 0.5	63.5 \pm 0.5	14.5 \pm 0.1	26.0 \pm 0.2	33.2 \pm 0.2	31.3 \pm 0.5	14.8 \pm 0.2
15	23.6 \pm 0.3	18.7 \pm 0.3	114.1 \pm 1.1	72.0 \pm 0.7	66.2 \pm 0.8	15.4 \pm 0.2	27.7 \pm 0.3	35.4 \pm 0.3	32.1 \pm 0.6	16.7 \pm 0.5
20	23.3 \pm 0.3	18.4 \pm 0.2	111.2 \pm 0.7	70.4 \pm 0.5	67.5 \pm 0.5	15.4 \pm 0.1	26.8 \pm 0.2	34.8 \pm 0.2	35.7 \pm 0.5	15.8 \pm 0.2
27	24.5 \pm 1.2	18.6 \pm 1.1	116.7 \pm 3.8	69.1 \pm 2.6	64.3 \pm 2.7	15.2 \pm 0.8	28.0 \pm 1.1	36.6 \pm 1.2	33.1 \pm 2.2	-
32	23.7 \pm 2.3	18.0 \pm 2.2	-	-	-	-	-	-	34.0 \pm 4.3	16.0 \pm 1.0
39	25.2 \pm 1.1	20.3 \pm 1.0	113.8 \pm 4.7	71.6 \pm 3.2	64.5 \pm 3.3	16.9 \pm 0.9	24.6 \pm 1.3	34.3 \pm 1.2	34.1 \pm 2.0	16.0 \pm 0.8
44	25.7 \pm 1.2	20.5 \pm 1.1	120.0 \pm 3.8	73.0 \pm 2.6	67.0 \pm 2.6	15.3 \pm 0.8	28.3 \pm 1.1	34.0 \pm 1.2	33.8 \pm 2.2	16.0 \pm 1.0
56	25.0 \pm 2.3	20.0 \pm 2.2	112.0 \pm 6.6	79.0 \pm 4.4	68.0 \pm 4.6	15.0 \pm 1.3	24.0 \pm 1.8	33.0 \pm 2.1	32.0 \pm 4.3	-
63	25.2 \pm 1.4	19.7 \pm 1.3	122.5 \pm 6.6	74.6 \pm 4.5	72.5 \pm 4.6	16.4 \pm 1.3	30.1 \pm 1.9	37.1 \pm 1.5	35.4 \pm 2.5	16.0 \pm 1.1
68	28.3 \pm 1.0	23.4 \pm 1.0	118.3 \pm 3.3	74.5 \pm 2.2	69.3 \pm 2.3	15.5 \pm 0.7	25.8 \pm 0.9	33.0 \pm 0.9	34.2 \pm 1.9	-
80	25.6 \pm 1.6	20.3 \pm 1.6	129.0 \pm 6.6	76.0 \pm 4.4	65.0 \pm 4.6	15.0 \pm 1.3	29.0 \pm 1.8	36.5 \pm 1.5	31.0 \pm 3.1	-
87	23.0 \pm 1.7	18.1 \pm 1.6	112.5 \pm 4.7	74.6 \pm 3.2	65.5 \pm 3.3	13.6 \pm 0.9	28.3 \pm 1.3	35.2 \pm 1.5	32.4 \pm 3.1	-
>90	24.2 \pm 0.9	18.9 \pm 0.9	116.0 \pm 6.6	75.0 \pm 4.4	69.0 \pm 4.6	15.0 \pm 1.3	26.0 \pm 1.8	35.1 \pm 1.0	29.7 \pm 1.8	16.0 \pm 1.1

L'accrescimento è un fenomeno fisiologico continuo che risente di fattori genetici ed ambientali che, nel caso degli animali domestici in produzione zootecnica, vengono generalmente tenuti sotto controllo ed ottimizzati, così da garantire le massime performance. In un selvatico, l'effetto di tali fattori è senz'altro più marcato ed il fenomeno può assumere, come rilevato in precedenza, un andamento a gradini, in corrispondenza dei periodi di restrizione alimentare. Una curva di crescita per definizione appiana le asperità legate all'azione dei fattori ambientali, rappresentando l'accrescimento come un fenomeno continuo e regolare. Ciò ha un indubbio valore pratico perché gli stessi parametri che permettono di disegnare la curva sono caratterizzati da un loro errore standard che permette di adottare dei limiti di confidenza

Tabella n.9 - Parametri delle curve di crescita dei caprioli in relazione all'ATC e al sesso.

	n.	Peso alla maturità (b0)			Velocità di crescita (b1)			Età alla massima crescita (b2)			ESR	R ²	
		kg	±	e.s.	±	e.s.	mesi	±	e.s.				
Tutti	655	25.23	±	0.21	0.183	±	0.011	2.287	±	0.319	2.73	0.600	
ATC													
PR4	123	27.13b	±	0.52	0.125	±	0.013	2.375b	±	0.757	2.41	0.717	
PR5	186	25.31a	±	0.37	0.131	±	0.016	1.095a	±	1.020	3.01	0.561	
PR8	346	25.20a	±	0.30	0.203	±	0.016	2.352b	±	0.365	2.54	0.623	
Sesso													
Femmine	315	24.63a	±	0.33	0.152	±	0.015	1.415a	±	0.572	2.70	0.614	
Maschi	340	26.23b	±	0.27	0.180	±	0.012	2.298b	±	0.408	2.49	0.625	
ATC Sesso													
PR4	F	59	26.83c	±	0.84	0.100	±	0.015	1.107a	±	1.012	1.92	0.801
	M	64	27.94d	±	0.66	0.135	±	0.018	2.996b	±	1.155	2.54	0.676
PR5	F	67	24.88a	±	0.78	0.079	±	0.018	-1.724*	±	2.574	3.13	0.591
	M	119	26.00c	±	0.38	0.147	±	0.020	1.717a	±	1.064	2.57	0.613
PR8	F	189	25.06b	±	0.47	0.154	±	0.020	1.324a	±	0.701	2.56	0.632
	M	157	26.50c	±	0.51	0.196	±	0.020	2.426b	±	0.431	2.16	0.693

a,b,c,d diversi per P<0.05 (entro fattore); *: valore negativo, escluso dal test "t".

Tabella n.10 - Parametri delle curve di crescita del peso eviscerato dei caprioli in relazione all'ATC e al sesso.

	n.	Peso eviscerato alla maturità (b0)			Velocità di crescita (b1)		Età alla massima crescita (b2)			ESR	R ²		
		kg	±	e.s.	±	e.s.	mesi	±	e.s.				
Tutti	655	19.87	±	0.20	0.180	±	0.012	2.656	±	0.366	2.61	0.528	
ATC													
PR4	123	20.96b	±	0.45	0.128	±	0.015	2.761b	±	0.800	2.09	0.680	
PR5	186	20.18a	±	0.38	0.109	±	0.016	1.321a	±	1.274	2.90	0.518	
PR8	346	20.04a	±	0.29	0.204	±	0.019	2.756b	±	0.404	2.43	0.559	
Sesso													
Femmine	315	19.27a	±	0.32	0.148	±	0.017	1.733a	±	0.654	2.56	0.541	
Maschi	340	20.82b	±	0.27	0.177	±	0.014	2.759b	±	0.472	2.44	0.552	
ATC Sesso													
PR4	F	59	20.39bc	±	0.72	0.111	±	0.019	2.077ab	±	1.019	1.73	0.764
	M	64	21.65d	±	0.57	0.133	±	0.019	2.896b	±	1.298	2.17	0.632
PR5	F	67	19.03a	±	0.72	0.082	±	0.022	-0.204*	±	2.625	2.94	0.526
	M	119	21.10cd	±	0.42	0.114	±	0.018	1.659a	±	1.422	2.53	0.583
PR8	F	189	20.12b	±	0.48	0.138	±	0.020	1.336a	±	0.817	2.40	0.574
	M	157	21.22d	±	0.51	0.201	±	0.025	2.994b	±	0.473	2.15	0.627

a,b,c,d diversi per P<0.05 (entro fattore); *: valore negativo, escluso dal test "t".

applicabili al fenomeno. Il confronto statistico, quindi, dei parametri calcolati su campioni di animali che si differenziano per uno o più fattori, permette di valutare l'effetto dei fattori stessi. In tal senso il calcolo delle curve di crescita ha, da un lato, il vantaggio di rappresentare il fenomeno dell'accrescimento in maniera regolare, dall'altro quello di rendere possibile l'evidenziazione dei fattori che lo influenzano, permettendo altresì di stimarne l'entità dell'effetto.

Nell'equazione di Gompertz il parametro b_0 rappresenta il peso dell'animale alla maturità. Il campione di tutti gli animali mette in luce un valore pari a kg $25,23 \pm 0,21$ per il peso vivo e kg $19,87 \pm 0,20$ per quello eviscerato. La resa in peso eviscerato sul peso vivo, in un animale maturo, è pari quindi al 78,76%, valore che si avvicina a quello empiricamente adottato da alcuni ATC, pari al 78%.

L'ATC di provenienza dei caprioli si è dimostrato un fattore di variazione significativo. I soggetti più pesanti alla maturità sono risultati quelli dell'ATC PR4 ($P < 0,05$), con differenze in più, nei confronti di quelli degli ATC PR5 e PR8, pari, rispettivamente, al 7,2% e al 7,7% per il peso vivo e al 3,9% e al 4,6% per quello eviscerato. Non sono emerse differenze significative ($P > 0,05$) fra i parametri b_0 relativi agli ATC PR5 e PR8 per entrambi i pesi.

Con riferimento al sesso e a conferma di quanto riportato in letteratura (Ford e Klindt, 1989), i maschi hanno presentato un peso alla maturità, sia vivo che eviscerato, superiore ($P < 0,05$) rispetto a quello delle femmine, con differenze in più, pari, rispettivamente, al 6,5% e all'8,0%. Anche all'interno di ciascun ATC è stato possibile riscontrare un effetto significativo del sesso ($P < 0,05$).

La velocità di crescita (b_1) non è mai risultata significativamente diversa sia in relazione all'ATC che al sesso ($P > 0,05$).

Invece, differenze significative ($P < 0,05$) sono emerse per quanto riguarda l'età di massima crescita (b_2). Valori bassi per tale parametro possono avere il significato di una maggiore precocità, come nel caso delle differenze emerse fra i sessi, ma anche

Grafico n.1 - Curve di crescita dei caprioli in relazione all'ATC.

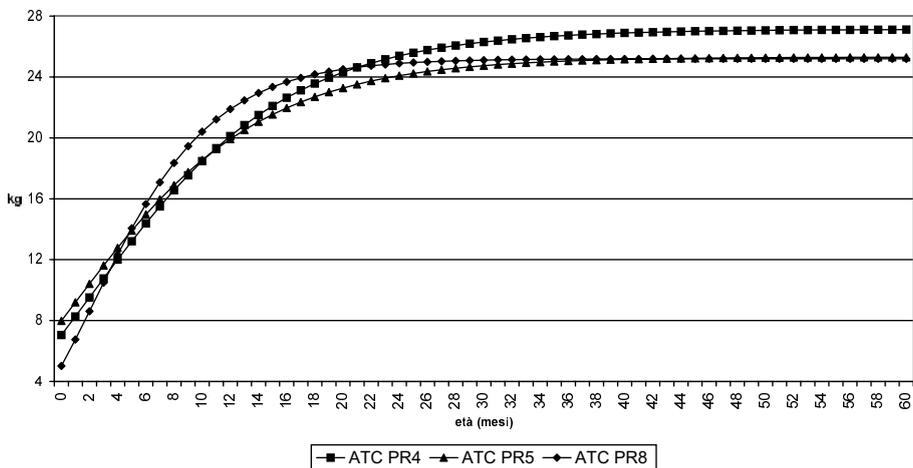


Grafico n.2 - Curve di crescita dei caprioli in relazione al sesso.

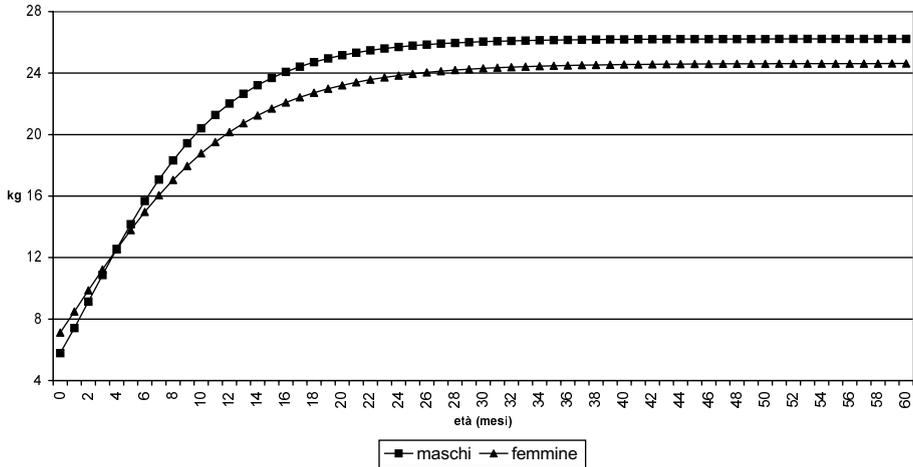
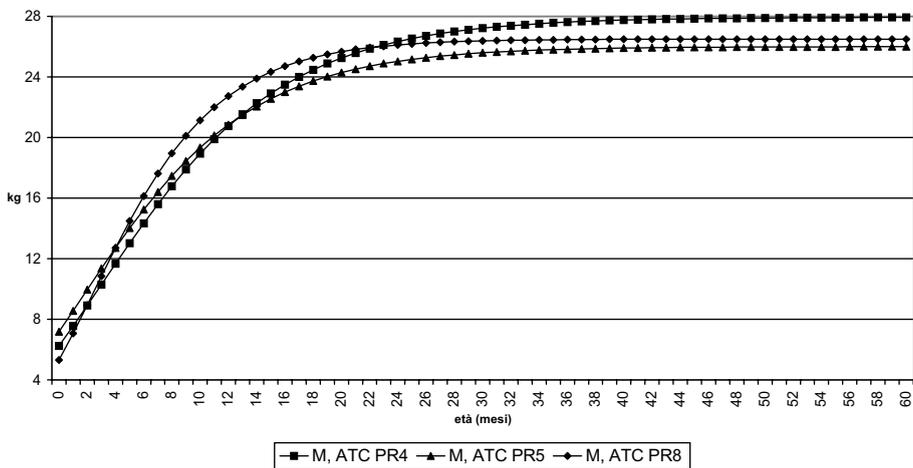


Grafico n.3 - Curve di crescita dei maschi in relazione all'ATC.



di limitazione ad un allungamento del periodo di crescita, legato a condizioni ambientali sfavorevoli, come nel caso delle differenze fra ATC.

Nel caso delle differenze fra i sessi, le femmine hanno manifestato la massima crescita, pari a 46 g/d a 43 giorni di vita, in corrispondenza di un peso vivo di kg 9,1. I maschi, invece, hanno evidenziato l'incremento ponderale più elevato, pari a 56 g/d a 70 giorni di vita e ad un peso di kg 9,6. Anche all'interno di ciascun ATC le femmine si sono sempre dimostrate più precoci dei maschi. Nell'ATC PR5 l'accrescimento delle femmine è risultato anomalo, rispetto all'applicazione dell'equazione di

Gompertz. In tale campione, infatti, sia per il peso vivo che per quello eviscerato, l'età alla massima crescita è risultata negativa e pertanto è stata esclusa dal confronto statistico. Anche la forma della curva di crescita ha risentito di tale anomalia (vd grafico 4). Il riscontro di una maggiore precocità nelle femmine è normale ed ampiamente descritto in letteratura nelle specie di interesse zootecnico (Parigi-Bini e Sameda de Marco, 1989).

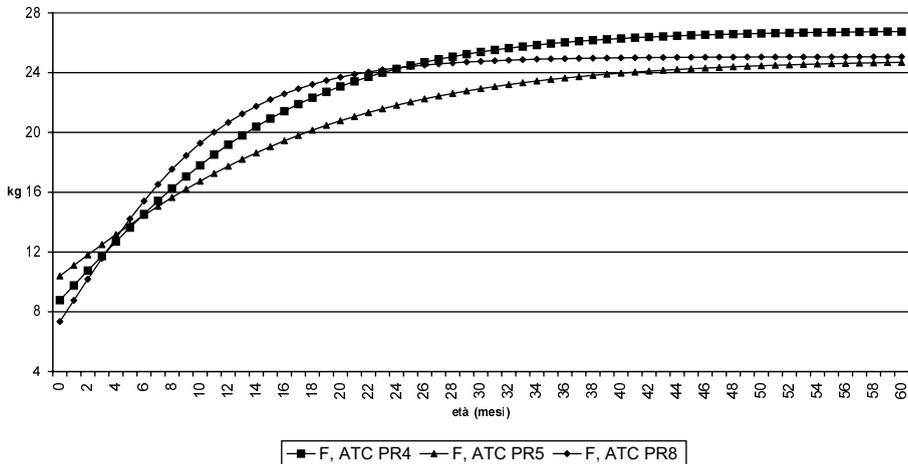
Le differenze fra ATC sembrano invece legate a fattori di tipo ambientale. Nei tre ATC presi in considerazione, l'età alla massima crescita è risultata pari a 72; 33; 72 giorni ed ha comportato un accrescimento giornaliero massimo di 39; 39; 62 g/d in corrispondenza di un peso vivo di 10,0; 9,3; 9,3 kg, rispettivamente per gli ATC PR4, PR5 e PR8.

Il massimo incremento giornaliero del peso eviscerato negli ATC PR4, PR5 e PR8 è risultato pari, rispettivamente, a 33; 26; 49 g/d, raggiunti ad un peso eviscerato di 7,7; 7,4; 7,4 kg e ad un'età di 84; 40; 84 giorni.

Dall'analisi dei dati esposti sembra possibile mettere in rilievo la particolare situazione degli ATC PR5 e PR8, rispetto all'ATC PR4.

Nell'ATC PR5 si trovano animali meno pesanti alla maturità e con un precoce periodo di massima crescita, caratterizzato, tra l'altro, da valori bassi dell'incremento ponderale giornaliero. Si può ritenere che le condizioni ambientali siano limitanti nei confronti di un normale accrescimento, anche in una stagione particolarmente favorevole nei riguardi delle disponibilità foraggere. Ciò potrebbe determinare una scarsa produzione di latte nella madre e, conseguentemente, bassi valori di accrescimento nei giovani. I motivi potrebbero essere ricercati in una eventuale competizione con altre specie (selvatiche e non) o nella mancanza di fonti alimentari, legata alla ridotta presenza nel comprensorio di attività agricole. L'ATC PR5 è infatti circoscritto a zone di montagna, contrariamente agli altri, per i quali il territorio presenta anche zone di collina e pianura, senz'altro più antropizzate e nelle quali l'attività agricola è diffusa.

Grafico n.4 - Curve di crescita delle femmine in relazione all'ATC.



Anche nell'ATC PR8 gli animali alla maturità risultano meno pesanti, mentre, al contrario dei precedenti, il periodo di massima crescita risulta posticipato e l'incremento ponderale massimo abbastanza elevato. La popolazione di caprioli che insiste su questo territorio presenta quindi grandi potenzialità di crescita che, ad un certo momento non vengono più espresse. L'accrescimento elevato nei primi mesi può essere dovuto alla presenza dei cereali autunno-vernini che sono una ricca fonte alimentare, legata alla attività agricola presente sul territorio, mentre l'inversione di tendenza, che si rende manifesta circa ad un anno di età (estate), potrebbe essere dovuta ad un'eccessiva presenza numerica non supportata da adeguate disponibilità alimentari. Lasciamo aperto l'interrogativo in attesa di ulteriori studi.

Conclusioni

I risultati ottenuti contribuiscono ad una migliore conoscenza della popolazione di caprioli della provincia di Parma, mettendo in evidenza differenze di accrescimento legate al sesso e alla zona in cui l'animale è vissuto. L'aspetto qualificante dell'indagine è risultata essere la trasposizione dei dati desunti dalle schede biometriche in grafici rappresentanti le curve di crescita, cioè il passaggio da una modalità di descrizione statica dell'animale ad una dinamica.

Inoltre riteniamo che il lavoro possa offrire utili spunti nei riguardi della gestione di questo ungulato. Ci riferiamo alla valutazione della presenza del capriolo e delle sue caratteristiche di accrescimento in un comprensorio provinciale come quello di Parma, caratterizzato dalla presenza di ambienti diversificati dal punto di vista vegetazionale, da una diversa antropizzazione e da un diverso utilizzo del suolo agricolo, dove il piccolo cervide si considera non più solo realtà di presenza ma viene ad essere valorizzato a risorsa economica importante, con la conseguente necessità di una gestione specifica. In questa fase gli ATC e le AFV hanno un ruolo fondamentale poichè con la loro presenza continua e costante sull'intero territorio di competenza, sono in grado di monitorare realmente questo patrimonio animale. Per rendere più efficiente questo servizio di informazione – che ha solo lo scopo di migliorare la capacità conoscitiva della specie – bisognerebbe, come evidenziato dal lavoro, rendere più uniformi ed accessibili agli operatori le modalità di rilievo delle caratteristiche degli animali (ad es. rendere omogenee le metodiche di rilievo). In tal senso, formare un gruppo di misuratori competenti ed addestrati darebbe omogeneità alla lettura dei valori numerici i quali potrebbero essere convogliati ad una unica banca dati, dove le elaborazioni risulterebbero complete, uniformi, gestibili per uno studio sempre più specialistico delle capacità faunistiche del territorio e disponibili per quanti volessero utilizzarle a scopo scientifico. Tale banca dati porterebbe, in pochi anni, ad avere un patrimonio di informazioni in grado di consentire di caratterizzare in modo più specifico la specie legata al nostro Appennino. La possibilità di gestire un così elevato numero di animali darebbe anche una garanzia sull'attendibilità dei riscontri sanitari.

Quali saranno le scelte gestionali in futuro è difficile dirlo. Restano, in conclusione, l'interesse per la conoscenza di questo ungulato e del suo rapporto con l'ambiente naturale in cui vive, che ne può condizionare l'accrescimento e la necessità di approfondire, in futuro, alcuni aspetti emersi dalla ricerca, ai fini di una gestione otti-

male della specie in rapporto al territorio, all'uomo ed alle altre specie. Importante è anche la considerazione della funzione essenziale dell'attività venatoria ai fini della salvaguardia di questa specie: al di là delle discussioni che animano il dibattito sull'opportunità della stessa e delle opinioni personali, va riconosciuto in questo caso alla gestione connessa con la caccia un ruolo importante al fine dell'acquisizione di un bagaglio di nozioni utili per una migliore conoscenza del capriolo.

Parole chiave: capriolo, misure somatiche, curve di crescita.

Key words: roe deer, somatic measurements, growth curves.

RIASSUNTO - Gli Autori hanno preso in esame le schede di abbattimento di 1225 caprioli in tre Ambiti Territoriali di Caccia (ATC) della provincia di Parma. I risultati dell'elaborazione hanno permesso di ricavare tabelle di misure somatiche distinte per ATC, sesso ed età. Le curve di crescita sono state calcolate applicando l'equazione di Gompertz. L'analisi delle stesse mette in evidenza differenze legate al sesso ed all'ATC di abbattimento, con riferimento al peso alla maturità, all'età ed al peso ai quali gli animali manifestano il massimo incremento ponderale ed all'entità dello stesso.

SUMMARY - SOMATIC MEASUREMENTS AND GROWTH CURVES IN ROE DEER (*Capreolus capreolus* c.) POPULATION OF PARMA APENNINE.

The Authors examined the slaughter cards of 1225 roe deer from three zones of Parma Apennine (Italy). The results allowed to obtain tables of somatic measurements for each zone, sex and age. The growth curves were calculated by applying the Gompertz equation. The curves analysis has shown differences between sex and among zone, with reference to mature weight, age and weight of maximum growth and maximum daily weight gain.

Riferimenti bibliografici

Andina L., Buratti R., Riva R. (2001) "Corso per aspiranti cacciatori con metodi selettivi", comunicazione personale.

Corradi M., Musarò C. (1995/96) "Appunti per la gestione", comunicazione personale.

Emmans G.C. (1989) The growth of turkeys. In "Recent advances in turkey science", Nixey C. and Grey T.C. Ed., Butterworths.

Ferloni M. (1998) In "Principi e tecniche di gestione faunistico-venatoria", di Simonetta A. M. e Dessì-Fulgheri F., Ed. Greentime

Fontana C. , Cerritelli S. (2002) Aspetti naturalistico-ambientali del Parco Nazionale del Gargano, con particolare riferimento al nucleo autoctono di Capriolo.

Ford J.J., Klindt J. (1989) Sexual differentiation and the growth process. In "Animal Growth Regulation", Campion D.R., Hausman G.J, Martin R.J. Ed., Plenum Press, N.Y. and London, p. 317-336.

Ladini F.(1989) – "Il capriolo", Ed. Ghedina e Tassoni.

Parigi-Bini R., Someda de Marco A. (1989) Zootecnica Speciale dei Bovini. Produzione della carne. Patron Editore, Bologna.

Pilla A.M. (1985) Metodologia statistica e programmazione degli esperimenti. Ed. Missio, Udine.

Ponti F. (1992) – “Il patrimonio capriolo”, Carlo Lorenzini editore.

Simonic A., Berginc M., Perco F., Cernac J., Wotschikowski U., Ozbolt I., Tarman K., Adamic M., Perusek M., Bidovec A. (1996) - The role of hunting in regulating the balance of nature. Gozdarski Vestnik, 54, 5-6, 249-320.

Wotschikowsky U. (1996) – “I caprioli della Foresta del Gallo”, Riess-Druck- und Verlags.

Wotschikowsky U., Heidegger A. (2001)– “Fauna e caccia in montagna”, Athesia.

ITALIAN OSTRICH (*Struthio camelus*) EGGS: PHYSICAL CHARACTERISTICS AND CHEMICAL COMPOSITION

Superchi P., Sussi C., Sabbioni A., Beretti V.

Introduction

Ostrich breeding started in Italy at the beginning of the '90s and it has rapidly evolved; as for every new activity, a lot of problems have to be faced and solved to make it a zootechnic reality.

Productive parameters like fertility and hatching percentage are unsatisfactory, especially when compared with other avicultural species. On average, 20% of eggs are unfertile and hatching ability is about 60% (Salghetti, 2000).

The avian egg is a highly complicated biological system, in which physical and chemical characteristics deeply affect incubation process, embryo's development and hatching (Narushin and Romanov, 2002). The value of each parameter is closely connected with all the others and the relationship between variables is so complex that it is very difficult to evaluate every single weight by itself; therefore, abnormality in their interactions can affect their physiological function.

Weight, shape index, shell thickness and porosity are the parameters that most affect both gas exchange necessary to embryonic metabolism and protective action against pathogenic and traumatic agents (Hunton, 1995).

In other commonly bred avian species, optimal ranges of these parameters for a good hatching have been determined (Narushin and Romanov, 2002), while for rarties reliable data are still lacking, also because of the poor standardization of ostrich breeding.

Moreover, very little research has been carried out regarding ostrich eggs' nutritional profile as indicator of nutritional chick status (Angel, 1994); therefore, the hypothesis that an unbalanced nutrition is the cause of bad reproductive efficiency (embryonic mortality, poor vitality of chicks) is the result of researches on other species (Wilson, 1997).

In practice, these problems increase during laying period and it could mean that a progressive consumption of nutritional reserves of laying ostriches occurs.

The aim of the current research, which is part of a wide programme directed to identify egg's intrinsic and extrinsic elements able to affect reproductive parameters, is a physical and chemical characterization of ostrich eggs produced in Italy, related to laying period cycle.

Material and methods

During laying period (February-September) in 2001, the 1st, 20th, 40th and 60th egg of 32 laying hens Blue Neck x African Black (5 ± 1.45 old) from 2 Tuscan farms

have been collected.

Couples or trios, housed in 60x15 m fenced pens, were fed 2.5 cm cutted alfalfa hay *ad libitum* and 1kg/bird/d of a pelleted ratite breeder ration (CP: 18.5% as fed; DE 2431 Kcal/kg feed). Water was supplied for *ad libitum* consumption.

Nests were routinely checked twice a day and collected eggs were kept at +4°C till they arrived at the laboratory.

Ponderal and morphological surveys - weight, length, breadth, short and long circumference have been recorded. On the basis of these measurements shape index (length/maximum breadth ratio), surface area (using the formulae of solids of revolution) and egg weight/surface area ratio have been calculated (Narushin, 1997).

Eggs have been opened at large end and yolk, albumen and shell have been collected and weighted. A homogeneous sample of each component has been sampled and frozen until chemical analysis (A.O.A.C., 1984).

On the shell portion corresponding to large end shell thickness has been measured by callipers.

Data have been processed by analysis of variance (SPSS 11.0, 1999) using the following statistical model:

$$Y_{ijkl} = m + U_i + A_j + F_{jk} + b_1 H_{ijkl} + e_{ijkl}$$

when:

Y_{ijkl} : single observation

m: average

U_i : fix effect of laying order (1,...,4)

A_j : fix effect of farm (1, 2)

F_{jk} : casual effect of female within farm

$b_1 H_{ijkl}$: regression coefficient with egg weight (H_1, g)

e_{ijkl} : residual error

Results and discussion

Physical characteristics of eggs have been reported in table 1. Average weight is 1444 g like value reported in literature (Sales *et al.*, 1996) and it varies during laying period. Particularly, the first egg is lighter than the 20th ($P < 0.05$) and the 40th ($P < 0.01$), while the difference with the 60th is not significant ($P > 0.05$).

Deeming (1995) and Gonzales *et al.* (1999) pointed out that also for ostrich there is a relationship between egg weight and hatchability: intermediate-sized eggs hatch better than small or large ones.

Several mathematical functions have been elaborated to better explain that and the most reliable among all formulae suggested in years seems to be the egg weight/surface area ratio (W/S) (Romanoff and Romanoff, 1949; Tsarenko, 1988).

According to that, with no relation with laying period, heavier the eggs are, higher is the W/S ($b = 0.001$; $P < 0.01$) and this means a less than proportional variation of surface compared with weight. These results are in good agreement with Narushin and Romanov (2002).

Eggs with W/S ratio diverging from average show high embryonic mortality because of abnormal development of the embryo in the initial phase or because of

asphyxia in the final days of incubation and this seems to be due to an inadequate eggshell conductance (gas quantity that it diffuses per time unit) as reported from Gonzales *et al.* (1999).

The same authors pointed out that a high shape index characterize ostrich eggs, which tend to differ from typical ovoid shape of the most of other avian species. The average is 82.86 like shape index of Keffen and Jarvis (1984) and 4% higher than the value reported by Sales *et al.* (1996).

During laying period shape index has varied in a not linear way, increasing from the 1st to the 40th egg ($P < 0.05$) and than decreasing at the 60th ($P > 0.05$).

Shell thickness of large end showed a progressive reduction during laying period ($P < 0.001$), from 2.02 to 1.82 mm and only the value of the 60th egg lays within the range given by Sales *et al.* (1996). Gonzales *et al.* (1999) pointed out the reverse relation between shell thickness and egg hatching and they observed that an increasing of 0,2 mm of thickness at equator can reduce hatchability by over 30%.

Proportional composition of eggs is presented in table 2; both yolk and albumen percentage are significantly related with egg weight, but with a negative relationship for yolk ($b = -0.008$; $P < 0.01$) and positive for albumen ($b = 0.012$; $P < 0.01$).

Eggs produced in Italy show a higher proportion of shell and lower of yolk compared with Sales *et al.* (1996).

The 1st egg has more yolk and less albumen than the 20th and 40th ($P < 0.05$); middle values have been reported for the 60th egg ($P > 0.05$).

Results of chemical analyses on shell, albumen and yolk are reported in table 3.

Shell moisture is deeply affected by season at laying moment. The first egg, laid in late winter, is characterized by a higher value compared with eggs laid in spring or summer ($P < 0.05$), which have incurred dehydration and ash concentration even if they were left in the nests for only a few hours.

Crude protein content of albumen varies during laying period, rising the highest value at the 60th egg ($P < 0.05$).

That is quite interesting because one of the biological functions of albumen, and particularly of protein fraction (ovoalbumin, ovotransferrin, ovomucoid, lysozyme, etc.), is embryo's protection against bacterial attack. This effect is due both to a higher albumen viscosity, which restricts bacterial movements, and to the direct action of lysozyme, an enzyme that catalyzes hydrolysis of β -glycosidic bonds of polysaccharides in the cell wall (MacDonnel *et al.*, 1954).

Moreover, the yolk fat concentration has an interesting variation: lipid content shows a progressive increase from the 1st to the 60th egg ($P < 0.05$).

It is common knowledge that lipids are 30% of yolk and that they are the primary nutrient source to assure embryo's vitality (Speake *et al.*, 1998). Lipids provide a range of essential components for tissue development and functionality (Noble *et al.*, 1996a) and also supply over 90% of energetic needs. The β -oxidation of fatty acids is the predominant pathway of energy provision in this system (Freeman and Vince, 1974) and approximately 50% of the initial fatty acid content of the yolk is recovered in the tissue lipids of the chick (Noble and Cocchi, 1990; Lin *et al.*, 1991), while the remaining part is used for energy production. On the contrary, the carbohydrate content of the egg is very low and its contribution to energy production is limited to the first few days of embryo's development.

Table 1 - Physical characteristics of eggs (estimated average \pm s. e.) related with laying order

		LAYING ORDER						
		average	1 st	20 th	40 th	60 th	b weight	SEM
Egg weight	g	1443.86	1383.01a \pm 22.43	1460.16b \pm 28.02	1516.80b \pm 47.07	1415.48ab \pm 85.89	-	126.89
W/S		2.65	2.66 \pm 0.02	2.61 \pm 0.02	2.65 \pm 0.04	2.66 \pm 0.09	0.001**	0.11
Shape index		82.86	80.51a \pm 0.72	82.92b \pm 0.85	85.45b \pm 1.47	82.55ab \pm 3.17	- 0.003	3.79
Shell thickness	mm	1.93	2.02A \pm 0.01	1.98B \pm 0.01	1.91C \pm 0.02	1.82D \pm 0.03	0.000**	0.10

a, b \neq per $P \leq 0.05$ A, B \neq per $P \leq 0.001$ ** $P \leq 0.01$ Table 2 - Proportional composition of eggs (estimated average \pm s. e.) related with laying order

		LAYING ORDER						
		average	1 st	20 th	40 th	60 th	b weight	SEM
Shell	%	19.86	19.81 \pm 0.25	20.12 \pm 0.30	19.76 \pm 0.51	19.77 \pm 1.09	- 0.005*	1.31
Albumen	%	55.25	53.29A \pm 0.42	56.18B \pm 0.49	56.08B \pm 0.85	55.44AB \pm 1.84	0.012**	2.20
Yolk	%	24.28	25.56b \pm 0.40	23.19a \pm 0.47	23.88a \pm 0.81	24.49ab \pm 1.75	- 0.008**	2.10

a, b \neq per $P \leq 0.05$ A, B \neq per $P \leq 0.01$ * $P \leq 0.05$ ** $P \leq 0.01$

Table 3 - Chemical composition of shell, albumen, yolk (estimated average \pm s. e.) related with laying order

			LAYING ORDER					
			average	1 st	20 th	40 th	60 th	SEM
Shell	% as fed	moisture	1.06	2.47b \pm 0.23	1.02a \pm 0.27	0.58a \pm 0.48	0.18a \pm 0.02	0.22
		ash	98.07	96.75a \pm 0.85	98.02ab \pm 1.02	98.52b \pm 1.76	98.97b \pm 3.79	4.53
Albumen	% as fed	moisture	89.51	90.09b \pm 0.19	90.14b \pm 0.22	89.81ab \pm 0.38	88.00a \pm 0.83	0.99
		protein	9.56	8.63a \pm 0.23	8.81a \pm 0.27	9.21a \pm 0.47	11.57b \pm 1.01	0.60
		ash	0.88	1.26 \pm 0.11	1.03 \pm 0.14	0.80 \pm 0.23	0.42 \pm 0.50	0.21
Yolk	% as fed	moisture	51.21	51.55 \pm 1.18	50.81 \pm 1.40	51.04 \pm 2.43	51.44 \pm 5.23	6.26
		protein	15.19	16.14 \pm 0.43	16.17 \pm 0.50	15.27 \pm 0.87	13.16 \pm 1.88	0.66
		fat	31.37	29.70a \pm 0.38	30.74b \pm 0.45	31.06b \pm 0.78	33.96b \pm 1.68	2.25
		ash	2.10	2.60b \pm 0.13	2.28ab \pm 0.15	2.07ab \pm 0.26	1.44a \pm 0.55	2.01

a, b \neq per $P \leq 0.05$

The results do not justify a depletion of maternal organic reserves during laying as the cause of bad reproductive efficiency; however, an adequate supply of essential fatty acids is more important than the total amount of lipid supplied by the parent bird.

Noble *et al.* (1996b) carried out a comparative study on lipid composition of egg yolks from ostriches reared wholly under natural conditions and from farmed birds, which have a worse hatching percentage. There were considerable differences throughout the fatty acid concentration; particularly, linolenic acid accounts were 80% less in eggs of farmed ostriches than in eggs of wild birds. As opposed to the domesticated chicken in which much weight is placed on the role of linoleic acid in embryo's development, the authors suggest for ostrich a considerably greater emphasis on linolenic acid.

Conclusion

Physical and morphological characteristics of eggs produced in Italy do not differ substantially from other countries. Nevertheless, the variability of parameters like weight, shape index, W/S ratio and shell thickness related to laying order must be taken into due consideration in incubation programme management to improve hatching percentage.

It is hoped that non-destructive techniques for the estimation of egg quality characteristics will be identified in the near future also for ostrich. This instrument will help to solve many biological and technological problems connected to incubation and hatching.

It will also be important to go into the variations of albumen and yolk composition during laying period and it will therefore be interesting to study whether peculiar feed integrations to reproductive animals can affect egg's nutritive value in relation with embryonic development.

Key words: ostrich, eggs, physical characteristics, chemical composition

Stichworte: Strauss, Ei, Physischmerkmale, chemischer Zusammensetzung

Parole chiave: struzzo, uova, caratteristiche fisiche, composizione chimica

SUMMARY - During the laying period (February-September), the 1st, 20th, 40th and 60th egg of 32 Blue Neck x African Black ostrich females (5 ± 1.45 years old) have been collected. Weight, shell thickness, length, breadth, short and long circumferences have been measured. Shape index and weight/surface area ratio have been calculated. Chemical analysis has been carried out on egg's constituents. These parameters are deeply affected by laying order: weight (1444 ± 27.6 g) and shape index show little values at the beginning and at the end of laying period. High shape index (82.86 ± 0.94) means that ostrich eggs are more spherical than eggs of other avian species. Shell thickness (1.93 ± 0.01 mm) has a linear decrease following laying order. Albumen protein content and yolk fat content increase from the 1st to the 60th egg (respectively from 9.63 to 11.57%; $P < 0.05$ and from 29.70 to 33.96%; $P < 0.05$).

RIASSUNTO - Caratteristiche fisiche e composizione chimica centesimale delle uova di struzzo (*Struthio camelus*) prodotte in Italia.

Il 1°, 20°, 40° e 60° uovo di 32 femmine di struzzo Blue Neck x African Black ($5\pm 1,45$ anni di età) sono stati raccolti nel corso del periodo di ovodeposizione (febbraio-settembre).

Su ciascun uovo è stato valutato lo spessore del guscio e sono stati effettuati rilievi di ordine ponderale (peso) e morfologico (lunghezza, larghezza, circonferenza all'asse maggiore e minore). Si sono ricavati l'indice di forma ed il rapporto peso/superficie. Sui costituenti dell'uovo si è proceduto ad effettuare l'analisi chimica centesimale.

Tali parametri vengono notevolmente influenzati dall'ordine di deposizione: il peso ($1444\pm 27,6$ g) presenta i valori inferiori nelle fasi iniziali e finali, analogamente all'indice di forma, il cui valore elevato ($82,86\pm 0,94$) indica uova tendenzialmente meno ellittiche delle altre specie avicole. Lo spessore del guscio ($1,93\pm 0,01$ mm) cala linearmente al progredire dell'ordine di deposizione. La composizione chimica presenta un progressivo aumento dal 1° al 60° uovo del contenuto proteico dell'albume (da 9,63 a 11,57%; $P<0,05$) e del contenuto lipidico del tuorlo (da 29,70 a 33,96%; $P<0,05$).

ZUSAMMENFASSUNG - Italienische Eier von Straussen (*Struthio camelus*): physische Merkmale und chemische Zusammensetzung

Während der Legezeit (Februar-September) wurden das 1., 20., 40. und 60. Ei von 32 Strausshennen Blue Neck x African Black (5 ± 1.45 Jahren alt) gesammelt. Eigewicht, Länge, Breite, Längeumfang, Breiteumfang, Schalendicke wurden gemessen. Der Formindex und das Verhältnis Gewicht/Schalfläche wurden errechnet. Chemischer Zusammensetzung von Eiweiß, Dotter und Schalen wurden analysiert. Die Legereihenfolge beeinflusst das Eigewicht (1444 ± 27.6 g) und das Formindex (82.86 ± 0.94) in ähnlicher Weise: es gibt Mindestwerte am Anfang und am Ende der Legezeit. Ein hoher Formindex bedeutet, dass Strausseier weniger ellip-tisch als die Eier von den anderen Vogelarten sind. Schalendicke (1.93 ± 0.01 mm) nimmt in linearer Weise mit der Legereihenfolge ab. Mit der Progression von der Legereihenfolge nehmen die Protein- (von 9.63 bis 11.57%; $P<0.05$) und Fettgehalt (von 29.70 bis 33.96%; $P<0.05$) zu.

Bibliografia

A.O.A.C. (1984) - Official Methods of Analysis. Washington DC, Association of Official Analytical Chemists, 14th Ed.

Angel R. (1994) - Diet effect on egg nutrients in a high producing ostrich. Proc. Assoc. Avian Vet., Reno, NV, 121-126.

Deeming D.C. (1995) - Factors affecting hatchability during commercial incubation of ostrich (*Struthio camelus*) eggs. Br. Poultry. Sci., 36, 51-56

Freeman B.M. and Vince M.A. (1974) - The development of the avian embryo. Chapman and Hall, London, 119-159.

- Gonzales A., Satterlee D.G., Moharer F., Cadd G.G. (1999) - Factors affecting ostrich egg hatchability. *Poultry Science*, 78, 1257-1262.
- Hunton P. (1995) - Understanding the architecture of the egg shell. *World's Poultry Science J.*, 51,141-147.
- Lin D.S., Connor W.E., Anderson G.J. (1991) - The incorporation of n-3 and n-6 essential fatty acids into the chick embryo from egg yolks having vastly different fatty acids compositions. *Pediatric research*, 29, 601-605.
- Keffen R.H. and Jarvis M.J.F. (1984) - Some measurements relating to ostrich eggs. *Ostrich.*, 55,182-187.
- MacDonnell LR., Feeney B.E., Hanson H.L., Campbell A., Sugihara T.F. (1954) The functional properties of egg white proteins. *Food Technology*, 9, 49-53.
- Narushin, V.G. (1997) - Non-destructive measurements of egg parameters and quality characteristics. *World's Poultry Science Journal*, 53, 141-152.
- Narushin V.G. and Romanov M.N. (2002) - Egg physical characteristics and hatchability. *World's Poultry Science J.*, 58, 297-303.
- Noble R.C. and Cocchi M. (1990) - Lipid metabolism and neonatal chicken. *Progress in lipid research*, 29, 107-140.
- Noble R.C., Speake B.H., McCartney R., Foggin C.M., Deeming D.C. (1996a) - Yolk lipids and their fatty acids in the wild and captive ostrich (*Struthio camelus*). *Comp. Biochem. Physiol.*,113B, 4, 753-756.
- Noble R.C., Speake B.H., McCartney R., Foggin C.M., Deeming D.C. (1996b) - Lipid composition of egg yolks derived from wild and farmed environments. *Proceedings Int. Conf. "Improving our understanding of ratites a farming environment"*. Manchester (UK), 27-29/3, 128-129.
- Romanoff A.L. and Romanoff A.J. (1949) - The avian egg. New York, John Wiley & sons, Inc.
- Sales J., Poggenpooel D.G., Cilliers S.C. (1996) - Comparative physical and nutritive characteristics of ostrich eggs. *World's Poultry Science J.*, 52, 45-52.
- Salghetti A. (2000) - Alcune caratteristiche strutturali ed economiche di allevamenti di struzzi. *Ann.Fac. di Med. Veterinaria di Parma*, 20,63-82.
- Speake B.J., Noble R.C., Murray A.M.B. (1998) - The utilization of yolk lipids by the chick embryo. *World's Poultry Sci. J.*, 54,319-334.
- Tsarenko P.P. (1988) - Increasing the quality of poultry products: tables and hatching eggs. *Agropromizdat*, Leningrad, Russia.
- Wilson H.R. (1997) - Effects of maternal Nutrition on hatchability. *Poultry Sci.*, 76,134-143.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF MODENESE COW MILK IN PARMIGIANO-REGGIANO CHEESE PRODUCTION ¹

A. Summer², M. Malacarne², F. Martuzzi², P. Mariani²

Introduction

Parmigiano-Reggiano cheese production consists in the formation and dehydration of an acid-rennet curd. The basic requirement of milk is its specific rennet-coagulation aptitude (1). The milk must have: a medium high casein content, caseins of a genetically favourable type, a good colloidal calcium phosphate content, a correct degree of titratable acidity, a moderate content of somatic cells and an optimal aptitude to rennet-coagulation (good reactivity with rennet, high degree of curd firming capacity and good ability to contraction and expulsion of whey) (2).

All these properties are influenced, more or less, by several factors. Genetic factors, in particular, play a very important role in the production of Parmigiano-Reggiano cheese (3-5). One of the cattle breeds reared in the Parmigiano-Reggiano production area is Modenese, also named Bianca Val Padana. Its population size today is about 500 (204 cows) head registered in the Herdbook, bred in the provinces of Modena, Mantova and Reggio Emilia (Northern Italy). According to FAO (6), Modenese is considered an endangered breed.

Modenese cattle has a white coat and black hooves, a black muzzle with a characteristic depigmented inverted V, white horns black tipped; 800-900 kg live weight for males and 650 kg for females; 155-160 cm withers height males and 145-150 cm females. This breed seems to originate from crosses of local Jurassic cattle with Podolic animals in the period after the fall of the Roman Empire. Baker and Manwell (7) include it among the Podolic Italian breeds derived from the *primigenius*, although recognising the initial contribution of *Bos brachyceros*. On the other hand, the phylogenetic analysis made by Astolfi *et al.* (8) seems to give preference to the origin from the *brachyceros* branch since it is included among the lowland cattle populations living south of the Alps rather than among the Podolic ones. The decay of Modenese cattle (in origin three purpose breed) arises from the introduction of the most productive Friesian cattle.

The aim of this note was to report data related to the structural and functional characteristics of Modenese (MO) cow milk in the Parmigiano-Reggiano cheese pro-

¹ Poster presented at the 53rd Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Cairo, Egypt, 1-4 September, 2002.

² Scienze Zootecniche e Qualità delle Produzioni Animali - Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti - Università degli Studi; Via del Taglio 8, 43100 Parma.

duction, and compare them to those of Italian Friesian milk (MO vs IF).

Casein content and casein number

Casein is the true raw material of cheese. On casein most of the rheological characteristics of the curd, the contracting capacity of cheese mass and the yield of dairy transformation depend, as well as the physico-chemical and functional properties of the finished product. Milks with low casein content originate weak curds, characterised by low elasticity, from which excessively moist cheese masses with scarce contractility arise (9, 10) and therefore cheese with structural and organoleptic alterations. The cheese yield, which is strongly related to the casein content, results lower (11).

Relevant differences in protein and casein content and casein number emerge from surveys carried out on herd milk samples belonging to the principal cattle breeds reared in Parmigiano-Reggiano production area (12) (Table 1).

The Modenese cow milk contains 0.4 percent more units of crude protein (3.48 vs 3.01 g/100g) and casein (2.75 vs 2.32 g/100g). This difference has a great economic relevance considering that to each part of casein about three parts of ripened cheese correspond. Casein number is clearly higher in Modenese milk (79.05 vs 76.92%). The Italian Friesian cow milk shows a casein number similar to the conventional value (77%), while the Modenese milk is 2 percent units higher. The values concerning Modenese milk result in accordance to other researches (13).

Distribution of casein fractions

Distribution of casein fractions (α_{s1} , α_{s2} , β and k), even if rather constant, could undergo such variation that the micellar dispersion degree can be affected significantly and consequently the properties of the whole casein system can vary, with great influence on the rennet-coagulation characteristics. The system is particularly influenced by the proportional variations of k -casein, the bearing element of the micellar structure.

Table 1 - Protein and casein contents and casein number (12).

Tabella 1 - Contenuti di proteina e caseina e indice di caseina (12).

		Modenese ⁽¹⁾ <i>Modenese⁽¹⁾</i>	It. Friesian ⁽¹⁾ <i>Frisona it.⁽¹⁾</i>	P
Protein (Nx6.38) <i>Proteina</i>	g/100g	3.48 ± 0.14	3.01 ± 0.11	**
Casein <i>Caseina</i>	g/100g	2.75 ± 0.11	2.32 ± 0.10	**
Casein number <i>Indice di caseina</i>	—	79.05 ± 1.79	76.92 ± 1.70	*

⁽¹⁾ 12 herd milk samples; *12 campioni di latte di allevamento*

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$

The percentage repartition of caseins of Modenese cow differ to that of Italian Friesian cow (12) (Table 2), especially concerning the k-casein and α_{s2} -casein. The casein of Modenese cow contains more k-casein (12.28%) than that of Italian Friesian (11.25%). Such a difference is probably correlated with the higher expression level of the B allele toward the A allele (14-17), the former with higher frequency in Modenese cow.

Table 2 - Percentage distribution of the caseins (12).
Tabella 2 - Ripartizione percentuale delle caseine (12).

	Modenese ⁽¹⁾ <i>Modenese</i> ⁽¹⁾	It. Friesian ⁽¹⁾ <i>Frisona it.</i> ⁽¹⁾	P
k_p major k-casein ⁽²⁾ <i>k_p k-caseina principale</i> ⁽²⁾	6.77 ± 0.61	5.46 ± 0.34	**
k_m "minor" k-caseins ⁽²⁾ <i>k_m k-caseine "minori"</i> ⁽²⁾	5.51 ± 1.07	5.79 ± 0.70	ns
α_{s2} -casein <i>α_{s2}-caseina</i>	13.61 ± 0.80	11.39 ± 0.49	**
α_{s1} -casein <i>α_{s1}-caseina</i>	34.15 ± 1.61	36.27 ± 0.92	*
$\beta(+\gamma)$ -casein <i>$\beta(+\gamma)$-caseina</i>	37.42 ± 1.73	38.09 ± 0.95	ns
γ_m other γ -caseins <i>γ_m altre γ-caseine</i>	2.54 ± 1.04	3.00 ± 1.18	ns
k-casein ($k_p + k_m$) <i>k-caseina ($k_p + k_m$)</i>	12.28 ± 1.36	11.25 ± 0.67	*
α_s -casein ($\alpha_{s1} + \alpha_{s2}$) <i>α_s-caseina ($\alpha_{s1} + \alpha_{s2}$)</i>	47.76 ± 1.44	47.66 ± 0.87	ns
($\beta + \gamma$)-casein <i>($\beta + \gamma$)-caseina</i>	39.96 ± 1.27	41.09 ± 0.95	*
k to α_{s1} ratio <i>k/α_{s1}</i>	0.36 ± 0.05	0.31 ± 0.02	*

(1) 12 herd milk samples (RP-HPLC according to Visser *et al.* (25)); 12 campioni di latte di allevamento (RP-HPLC secondo Visser *et al.* (25)).

(2) Major k-casein (k_p): is the principal fraction of the k-casein, non-glycosylated, corresponding to the chromatographic peak which identifies the genetic variant(s) of the protein; the other fractions of the k-casein are grouped in k_m and named "minor" k-caseins; *k-caseina principale (k_p): è la frazione principale della k-caseina, non-glicosilata, corrispondente al picco cromatografico che identifica la variante(i) genetica della proteina; le altre frazioni della k-caseina sono raggruppate in k_m e chiamate k-caseine "minori".*

ns, P>0.05; * P≤0.05; ** P≤0.01

The different distribution of k-casein is mainly related to its principal fraction (k_p , non glycosylated), which proportion in Modenese (6.77%) is higher than in Italian Friesian (5.46%). The Modenese is also characterised by a different *ratio* between glycosylated k-casein (k_m) and non glycosylated k-casein (k_p) (0.81 vs 1.06).

Anyway, the observation is of undoubted interest (18, 19), especially with reference to the influence of k-casein proportional variations on the size (20) and the reactivity toward chymosin (21-24) of micelles (more k-casein, smaller micelles, more reactive micelles).

The difference regarding α_{s2} -casein is as much important. The casein of Modenese milk is richer in α_{s2} -casein (13.61%) than that of Italian Friesian milk (11.39%).

The casein of Modenese milk contains lower amount of α_{s1} -casein; this latter characteristic further differentiate the micellar system of Modenese, which κ/α_{s1} *ratio*, equal to 0.36, is significantly higher than that of the Italian Friesian (0.31) (Table 2).

Calcium, phosphorus and chloride

The Modenese cow milk is richer of calcium (122.1 vs 116.9 mg/100ml) and phosphorus (101.9 vs 91.7 mg/100ml) than the Italian Friesian cow milk (26) (Table 3).

Since about 2/3 of calcium and a half of the phosphorus are integral part of the micellar system, such differences appear to be related principally to the different casein content of the two milks. Modenese milk, because of its remarkable richness of phosphorus, tends to be characterised on average by a lower Ca/P ratio (1.20 vs 1.27).

Also the chloride content (27) (Table 3) varies considerably: the Modenese milk has a chloride ion concentration markedly lower (82.1 vs 101.4 mg/100g) and therefore more favourable for cheesemaking.

Micellar system composition

The colloidal fraction of the milk, structured in micelles, is the basic constituent of the cheese mass. Colloidal calcium phosphate, strictly associated to caseins, is essential for the formation and the integrity of this particular structure; furthermore, it plays a very important role in all phases of milk coagulation. Compared to that of Italian Friesian, Modenese milk (26) (Table 4) is characterised by a higher concentration of all principal constituents of the micellar system; it contains more casein and there are also relevant differences regarding colloidal phosphorus (51.7 vs 48.0 mg/100ml), particularly in relation to the fraction covalently bound to the casein (24.8 vs 22.4 mg/100ml). Moreover, from these surveys can be observed that the micellar system of Modenese milk shows generally a lower mineralisation degree compared to that of Italian Friesian (26). In fact, it contains a lower content of colloidal inorganic phosphate per 100 casein units (2.97 vs 3.07%).

Table 3 - Calcium, phosphorus and chloride contents (mg/100ml) (26).
 Tabella 3 - Contenuti di calcio, fosforo e cloruri (mg/100ml) (26).

	Modenese ⁽¹⁾ <i>Modenese⁽¹⁾</i>	It. Friesian ⁽¹⁾ <i>Frisona it.⁽¹⁾</i>
Calcium, Ca <i>Calcio, Ca</i>	122.1	116.9
Colloidal Ca <i>Ca colloidale</i>	82.2 ± 3.5	78.5 ± 4.1
Soluble Ca <i>Ca solubile</i>	39.9 ± 2.2	38.4 ± 1.4
Phosphorus, P <i>Fosforo, P</i>	101.9	91.7
Colloidal P <i>P colloidale</i>	51.7 ± 1.7	48.0 ± 2.3
Soluble P <i>P solubile</i>	48.8 ± 2.5	42.3 ± 2.6
Ca to P ratio <i>Ca/P</i>	1.20	1.27
Chloride ⁽²⁾ <i>Cloruri⁽²⁾</i>	82.1 ± 14.9	101.4 ± 10.0

(1) 10 dairy herds (4 milk samples for each herd); *10 allevamenti (4 campioni di latte per allevamento)*

(2) Data from Mariani *et al.* (27): 12 herd milk samples for each breed (mg Cl-/100g); *Dati ripresi da Mariani et al. (27): 12 campioni di latte di allevamento per ciascuna razza (mg Cl-/100g)*

Genetic variants of caseins and of β -lactoglobulin

The polymorphism of α_{s1} -, β - and k- caseins and of β -lactoglobulin are a very particular aspect in the complex subject of milk quality. The genetic structure of Modenese (28) is markedly different than that of Italian Friesian (29) concerning the casein variants (Table 5).

In Modenese milk there is a substantial equilibrium between the frequencies of the A and B k-casein variants (0.505A vs 0.495B), while in Italian Friesian the A variant is remarkably more frequent than B (0.755A vs 0.245B). The same happens for the two variants more representative at the β -casein *locus* (A and B).

The influence of the β -lactoglobulin genetic types is remarkable. Cows with β -lactoglobulin A type give a milk with higher content of whey proteins, while cows with β -lactoglobulin B type produce a milk on average more rich of casein, with significant effects particularly on cheese yield. Modenese milk is characterised by a higher frequency of β -lactoglobulin B variant (0.722 MO vs 0.541 IF) than that of Italian Friesian (30).

Table 4 - Micellar system composition (mg / 100 ml milk) (26).

Tabella 4 - Composizione del sistema micellare (mg / 100 ml di latte) (26).

	Modenese ⁽¹⁾ <i>Modenese⁽¹⁾</i>	It. Friesian ⁽¹⁾ <i>Frisona it.⁽¹⁾</i>
Casein <i>Caseina</i>	2780 ± 10	2560 ± 11
Colloidal calcium <i>Calcio colloidale</i>	82.2 ± 3.5	78.5 ± 4.1
Colloidal phosphorus <i>Fosforo colloidale</i>	51.7 ± 1.7	48.0 ± 2.3
Casein P <i>P caseina</i>	24.8 ± 1.4	22.4 ± 0.8
Coll. inorg. P <i>P coll. inorg.</i>	26.9 ± 2.0	25.6 ± 1.8
Colloidal magnesium <i>Magnesio colloidale</i>	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.3
Colloidal citric acid <i>Acido citrico colloidale</i>	9.9 ± 2.3	8.7 ± 1.8

(1) 10 dairy herds (4 milk samples for each herd); *10 allevamenti (4 campioni di latte per allevamento)*

Table 5 - Genetic variants of caseins and β -lactoglobulin.*Tabella 5 - Varianti genetiche delle caseine e della β -lattoglobulina.*

	Alleles <i>Alleli</i>	Modenese ⁽¹⁾ <i>Modenese⁽¹⁾</i>	It. Friesian ⁽²⁾ <i>Frisona it.⁽²⁾</i>
α_{s1} -Cn	B	0.820	0.969
	C	0.180	0.031
β -Cn	A	0.797	0.952
	B	0.156	0.046
	C	0.047	<0.02
κ -Cn	A	0.505	0.755
	B	0.495	0.247
β -Lg	A	0.277	0.459
	B	0.722	0.541
	D	0.001	

(1) 424 individual milk samples collected from 59 dairy herds (28); *424 campioni di latte individuale raccolti da 59 allevamenti (28)*

(2) 748 individual milk samples collected from 60 dairy herds (29); *748 campioni di latte individuale raccolti da 60 allevamenti (29)*

Micelle size

The genetic differences in the principal casein systems assume a very particular significance from the dairy-technological point of view. Milks characterised by the presence of k-casein B variant have a higher content, absolute and relative, of k-casein. This implies the presence of micelles with a lower average diameter. Concerning the coagulation properties, smaller micelles have higher reactivity with the rennet and a higher rate of curd formation, with positive repercussions on the rheological characteristics of the curd (31-32).

Also the micellar structure of the milks with the β -casein B variant is characterised by micelles with a lower average micellar diameter with respect to A variant, with positive repercussions on the reactivity with rennet and the aggregation rate of the paracaseinate micelles (33-34). These observations are partially confirmed by Morini *et al.* (21) who observed an average micellar diameter lower for Modenese milk (62 vs 68 nm) (Table 6).

Table 6 - Micelle size distribution (21).
Tabella 6 - Distribuzione delle micelle (21).

		Modenese ⁽¹⁾ <i>Modenese⁽¹⁾</i>	It. Friesian ⁽²⁾ <i>Frisona it.⁽²⁾</i>
Submicelles (under 12 nm) <i>Submicelle (fino a 12 nm)</i>	%	39.82	37.57
Small micelles (12-68 nm) <i>Micelle piccole (12-68 nm)</i>	%	40.90	36.58
Medium micelles (68-162 nm) <i>Micelle medie (68-162 nm)</i>	%	17.57	24.31
Large micelles (over 162 nm) <i>Micelle grandi (sopra 162 nm)</i>	%	1.71	1.54
Mean micellar diameter <i>Diametro micellare medio</i>	nm	62	68

(1) 1753 particles measured on microphotographies; *Misurate 1753 particelle su microfotografie*

(2) 3040 particles measured on microphotographies; *Misurate 3040 particelle su microfotografie*

Note: milk samples were examined by TEM (transmission electron microscopy) after freeze-fracturing sample preparation according to Buchheim (35) and Resmini and Volonterio (36).

Nota: i campioni di latte, preparati con la tecnica freeze-fracturing secondo Buchheim (35) e Resmini e Volonterio (36), sono stati esaminati al microscopio elettronico.

Rennet coagulation properties

Acidity markedly influences the rennet-coagulation aptitude of the milk, both in the primary and secondary phase of the coagulation. The fundamental role is played by pH (whose values are negatively related to those of titratable acidity) that strongly influences the primary reaction of the rennet and the curd firming rate.

According to the observations of Pecorari *et al.* (4), Modenese cow milk is characterised by a clearly higher titratable acidity (3.59 vs 3.29 °SH/50ml) with respect to that of the Italian Friesian.

Modenese cow milk has very peculiar coagulation properties (Table 7), confirming its several specific characteristics. It coagulates with tendentially longer times (17.9 vs 16.5 min), has a reasonable curd firming time (10.5 vs 14.1 min) but not such as to let the curd reach technologically favourable values, both in terms of firmness a_{30} (25.4 vs 22.2 mm) and in terms of resistance to compression (30.3 vs 29.8 g) and resistance to cut (51.0 vs 47.9 g); however, the curd reaches values of consistence and strength lightly higher than those of Italian Friesian.

Anyway the rennet-coagulation properties of Modenese milk are not technologically suitable for Parmigiano-Reggiano cheese production, even if better than those of Italian Friesian: probably because of the lower content of colloidal calcium phos-

Table 7 - Rennet-coagulation properties (4).

Tabella 7 - Proprietà di coagulazione presamica (4).

		Modenese ⁽¹⁾ Modenese ⁽¹⁾	It. Friesian ⁽²⁾ Frisona it. ⁽²⁾
Titratable acidity <i>Acidità titolabile</i>	°SH/50ml	3.59	3.29
Clotting time r ⁽³⁾ <i>Tempo coagulazione r</i> ⁽³⁾	min	17.9	16.5
Curd firming time k_{20} ⁽³⁾ <i>Tempo rassodamento k_{20}</i> ⁽³⁾	min	10.5	14.1
Curd firmness a_{30} ⁽³⁾ <i>Consistenza coagulo a_{30}</i> ⁽³⁾	mm	25.4	22.2
Resistance to compression ⁽⁴⁾ <i>Resistenza alla compressione</i> ⁽⁴⁾	g	30.3	29.8
Resistance to cut ⁽⁴⁾ <i>Resistenza al taglio</i> ⁽⁴⁾	g	51.0	47.9

(1) 75 individual milk samples; 75 *campioni di latte individuale*(2) 239 individual milk samples; 239 *campioni di latte individuale*(3) Lactodynamography according to McMahon and Brown (37); *Lattodinamografia secondo McMahon e Brown* (37)(4) Gelometry according to Annibaldi (38); *Gelometria secondo Annibaldi* (38)

phate per casein unit (lower mineralisation degree of the micelle), the Modenese milk tends to form a curd of mealy type, less elastic and considerably different from those “gelatinous” typical of the milk of other breeds, as Italian Brown and Reggiana (4, 39).

Conclusions

Modenese milk is rich of casein and is characterised by high casein number. These peculiarities are favourable to a high cheese yield in dairy transformation.

Nevertheless, the Modenese coagulum tends to be “mealy”, provided of rheological properties different from those characterising the “gelatinous” coagulum considered technologically more suitable for Parmigiano-Reggiano cheese. Probably, these unfavourable rheological peculiarities of the Modenese milk are due to the lower mineralisation degree of the native micelles.

Key words: cow milk, Modenese cattle, Italian Friesian cattle, Parmigiano-Reggiano cheese

Parole chiave: latte di vacca, Modenese, Frisona Italiana, Parmigiano-Reggiano

SUMMARY - The aim of this study was to compare the characteristics of Modenese cow milk (MO) with those of Italian Friesian (IF). Modenese milk is rich of casein (2.75 vs 2.32%) and characterised by a high casein number (79.05 vs 76.92%). Casein has high proportions of α_{s2} (13.61 vs 11.39%) and k-casein (12.28 vs 11.25%); the k to α_{s1} ratio is favourable (0.36 vs 0.31). About half of the k-casein variants are B type (49 vs 25%). Modenese milk is sufficiently provided with total calcium (122.1 vs 116.9mg/100ml) and rich of total phosphorus (101.9 vs 91.7mg/100ml); it contains less chloride (82.1 vs 101.4mgCl⁻/100g). Mineralisation degree of micellar system seems not sufficiently adequate (2.97 vs 3.07% colloidal inorganic PO₄). Micelles have smaller size (62 vs 68nm). Modenese milk has a good titratable acidity (3.59 vs 3.29 °SH/50ml). It shows a rather long coagulation time (17.9 vs 16.5min); curd firmness (a_{30}) is substantially poor (25.4 vs 22.2mm). Although the MO values of curd resistance to compression (30.3 vs 29.8g) and to cut (51.0 vs 47.9g) are better than IF, anyway they have to be considered low. On a whole, the coagulum tends to be “mealy”, provided of rheological properties different from those characterising the “gelatinous” coagulum, considered technologically more suitable for Parmigiano-Reggiano cheese manufacture.

RIASSUNTO - Caratteristiche strutturali e funzionali del latte di vacche di razza Modenese nella produzione del Parmigiano-Reggiano.

Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare le principali caratteristiche strutturali e funzionali del latte di vacche di razza Modenese con quelle di vacche di razza Frisona italiana. Il latte della Modenese risulta più ricco di caseina (2,75 vs 2,32%) e caratterizzato da un elevato indice di caseina (79,05 vs 76,92%). La caseina è contraddistinta da un'elevata proporzione delle frazioni α_{s2} -caseina (13,61 vs 11,39%) e k-caseina (12,28 vs 11,25%); il rapporto k/ α_{s1} risulta tecnologicamente favorevole alla Modenese (0,36 vs 0,31). La frequenza allelica della variante B al

locus k-caseina raggiunge valori prossimi al 50% (49 vs 25%). Il latte della Modenese è sufficientemente provvisto di calcio totale (122,1 vs 116,9 mg/100ml), particolarmente ricco di fosforo totale (101,9 vs 91,7 mg/100ml) e caratterizzato da un minor contenuto di cloruri (82,1 vs 101,4 mgCl/100g). Il grado di mineralizzazione del sistema micellare sembra non essere sufficientemente adeguato (2,97 vs 3,07% di fosfato colloidale inorganico). Le micelle hanno un diametro mediamente più piccolo (62 vs 68 nm). Il latte della Modenese risulta provvisto di una buona acidità titolabile (3,59 vs 3,29 °SH/50ml). Per quanto riguarda le caratteristiche di coagulazione presamica, il latte della Modenese mostra un tempo di coagulazione (τ) piuttosto lento (17,9 vs 16,5 min) ed il coagulo presenta una consistenza (a_{30}) sostanzialmente bassa (25,4 vs 22,3 mm). Anche se i valori di resistenza alla compressione (30,3 vs 29,8 g) e di resistenza al taglio (51,0 vs 47,9 g) del coagulo sono migliori rispetto a quelli della Frisona, essi devono essere considerati, in assoluto, piuttosto carenti. In generale, il coagulo della Modenese tende ad essere "farinoso", provvisto di proprietà reologiche diverse rispetto a quelle del caratteristico coagulo "gelatinoso", considerato tecnologicamente più idoneo per la produzione di Parmigiano-Reggiano.

Bibliografia

- 1) Pecorari M., Mariani P. (1990). *Caseina, attitudine alla coagulazione del latte, resa e qualità del formaggio*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 41, 225-244.
- 2) 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.
- 3) Mariani P., Pecorari M. (1987). *Fattori genetici, attitudine alla caseificazione e resa del latte in formaggio*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 38, 286-326.
- 4) Pecorari M., Sandri S., Mariani P. (1987). *Attitudine alla coagulazione dei latt delle razze Frisona, Bruna, Reggiana e Modenese*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 38, 376-384.
- 5) Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Malacarne M. (2002). *La qualità casearia del latte di differenti razze bovine*. La razza Bruna, 42 (1), 7-13.
- 6) FAO (1995). *World watch list for domestic animal diversity*. Scherf B.D. (ed.), Rome, Italy.
- 7) Baker C.M.A., Manwell C. (1980). *Chemical classification of cattle. I. Breed groups*. Anim. Blood Grps. and Biochem. Genet., 11, 127-150.
- 8) Astolfi P., Pagnacco G., Gugliemino-Matessi C.R. (1983). *Phylogenetic analysis of native Italian cattle breeds*. Z. Tierz. ZüchtBiol., 100, 87-100.
- 9) Losi G., Castagnetti G.B. (1981). *Problemi legati alla trasformazione del latte prodotto nei grandi allevamenti*. Proceedings "Gestione Tecnico-Economica Allevamenti da Latte", Reggio Emilia 8-9 October.
- 10) Mora R., Zannoni M. (1986). *L'importanza della caseina nella produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano*. Il Parmigiano-Reggiano, 16 (2), 23-25.
- 11) Gilles J., Lawrence R.C. (1985). *The yield of cheese*. N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 20, 205-214.

- 12) Mariani P., Summer A., Franchetti M., Vecchia P., Fossa E. (1998). *Ripartizione percentuale delle caseine in latti di massa delle vacche di razza Frisona, Bruna, Reggiana e Modenese*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 49, 181-192.
- 13) Mariani P. (1975). *Ripartizione delle proteine del latte nelle razze Frisona, Bruna alpina, Reggiana e Modenese*. Riv. Zoot. Vet., 3, 13-35.
- 14) 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.
- 15) Law A.J.R. (1993). *Quantitative examination of genetic polymorphism in κ - and β -caseins by anion- and cation-exchange FPLC*. Milchwissenschaft, 48, 243-247.
- 16) Mariani P., Zanzucchi G., Masoni M., Serventi P., Pecorari M. (1995). *Proporzioni delle caseine e delle frazioni di κ -caseina, separate mediante RP-HPLC, in vacche di razza Bruna con differente genotipo al locus κ -Cn*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 46, 20-35.
- 17) 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. I. Casein micelle size and the content of non-glycosylated κ -casein*. Milchwissenschaft, 51, 368-373.
- 18) Sullivan R.A., Fitzpatrick M.M., Stanton E.K. (1959). *Distribution of κ -casein in skim milk*. Nature, 183, 616-617.
- 19) Barry J.G., Donnelly W.J. (1980). *Casein compositional studies. I. The composition of casein from Friesian herd milks*. J. Dairy Res., 47, 71-81.
- 20) 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 (1984).
- 21) Morini D., Losi G., Castagnetti G.B., Benevelli M., Resmini P., Volonterio G. (1975). *L'influenza delle varianti genetiche della κ -caseina sulla dimensione delle micelle caseiniche*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 26, 437-444.
- 22) Niki R., Arima S. (1984). *Effects of size of casein micelle on firmness of rennet curd*. Jpn. J. Zootech. Sci., 55, 409-415.
- 23) Ford G.D., Grandison A.S. (1986). *Effect of size casein micelles on coagulation properties of skim milk*. J. Dairy Res., 53, 129-133.
- 24) Lodes A. (1995). *Beziehungen zwischen Zusammensetzung und Labgerinnungseigenschaften der Milch und genetischen Varianten der Milchproteine*. Thesis, Techn. Univ. München, Verl. Shaker, Aachen, pp. 185.
- 25) 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.
- 26) Mariani P. (1985). *Osservazioni sul contenuto e la ripartizione dei principali costituenti del sistema micellare del latte in quattro razze bovine*. Ann. Fac. Med. Vet., Univ. Parma, 5, 173-183.

- 27) Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Malacarne M., Fossa E. (2001). *Casein content, salt equilibria and rheological properties of bulk milk from different cattle breeds in the production of Parmigiano-Reggiano cheese*. Atti 36° Simposio Internazionale di Zootecnia, vol. 2, 161-168.
- 28) Russo V., Mariani P. (1972). *Polimorfismo genetico delle caseine e della β -lattoglobulina nella razza bovina Modenese*. Riv. Zoot., 45, 43-51.
- 29) Mariani P., Russo V. (1971). *Studio elettroforetico delle varianti genetiche delle proteine nel latte di bovine di razza Frisona allevate in Italia*. Soc. Ital. Gen. Agr., 25(1-2), 118-130.
- 30) Russo V., Mariani P. (1978). *Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico tecnologico e caseario*. Riv. Zoot. Vet., 6, 289-304 and 365-379.
- 31) Mariani P., Pecorari M. (1991). *Il ruolo delle varianti genetiche della k-caseina nella produzione del formaggio*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 42, 255-285.
- 32) Di Stasio L., Mariani P. (2000). *The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production*. Zoot. Nutr. Anim., 26(3), 69-90.
- 33) 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.
- 34) Ng-Kwai-Hang K.F. (1998). *Genetic polymorphism of milk proteins: relationships with production traits, milk composition and technological properties*. Can. J. Anim. Sci., 78(Suppl.1), 131-147.
- 35) Buchheim W. (1970). *"The process of fat crystallization in the fat globules of milk: electron microscopical studies by means of the freeze-etching method"*. Milch-wissenschaft, 25, 65-70.
- 36) Resmini P., Volonterio G. (1975). *Riconoscimento del latte in polvere ricostituito nel latte alimentare*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 26, 170-191.
- 37) McMahon D.J., Brown, R.J. (1982). *Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions*. J. Dairy Sci., 65, 1639-1642.
- 38) Annibaldi S. (1973). *"Application of lactodynamography, gelometry and tensiometry in the evaluation of the aptitude of milk to cheese-making."* In Proceedings of the Corso Aggiornamento Tecnico Produzione Parmigiano-Reggiano, pp. 129-145 (Ed. Consorzio Parmigiano-Reggiano). Reggio Emilia, Italy.
- 39) Mariani P., Battistotti B. (1999). *Milk quality for cheesemaking*. Proceedings XIII° ASPA Congress, 499-516.

LIMITI E POSSIBILITA' DI SVILUPPO DELL'ALLEVAMENTO DELLO STRUZZO¹

A. Salghetti²

1. Introduzione

L'allevamento dello struzzo rientra a pieno titolo tra gli allevamenti da reddito oggi presenti in Italia. Il numero degli allevamenti (1.574) e quello della consistenza dei capi (38.385), secondo le rilevazioni del 5° Censimento generale dell'agricoltura del 2000, sono la testimonianza della dinamicità degli imprenditori agricoli italiani, che in un decennio hanno creato dal nulla una nuova realtà produttiva.

Rispetto al 1999, secondo una precedente indagine Istat (Istituto nazionale di statistica), la consistenza degli allevamenti di struzzi sarebbe cresciuta del 10,5%, mentre il numero dei capi si sarebbe ridotto del 3,6%. Naturalmente acquistano maggiore rilevanza i dati del Censimento rispetto a quelli dell'indagine campionaria, anche se questa è da ritenere abbastanza coerente.

In ogni caso i risultati del Censimento mettono in evidenza la precarietà di molti allevamenti, visto che la consistenza media dei capi è di solo 24 unità, di cui 8 riproduttori, che si riducono a circa 6 oppure 4 femmine se le combinazioni vengono fatte con i tris (1 maschio e 2 femmine) oppure con le copie (1 maschio e 1 femmina).

La fase della "catena degli animali da vita" ha fatto il suo tempo e i prezzi dei riproduttori si stanno ridimensionando agli effettivi scopi della produzione di carne. Esaurita la domanda dei riproduttori, finalizzata all'apertura di nuovi allevamenti, si è fatta avanti la vera destinazione economica degli animali, cioè la produzione di carne e di pelle, essendo marginale la produzione delle uova da consumo e delle piume.

In questi ultimi anni, gli animali da macello hanno scontato prezzi in continuo calo, per attestarsi recentemente al di sotto dei 200 euro a capo. Un prezzo analogo viene offerto sul mercato per i riproduttori a coloro che intendono chiudere l'allevamento.

Di qui il ridimensionamento delle attività con la chiusura degli allevamenti di piccola dimensione e condotti in forma hobbistica.

Il mercato della carne di struzzo è ancora tutto da costruire essendo un prodotto nuovo per i consumatori e di recente introduzione. In realtà i consumi sono per la maggior parte soddisfatti dalla carne di importazione, con la quale i nostri allevatori sono chiamati a competere.

¹ Ricerca eseguita con il cofinanziamento del M.U.R.S.T.; Coordinatore Scientifico del Programma di Ricerca: Prof. A. Sabbioni.

² Istituto di Economia Rurale e Zoonomia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

Nel 2001 si stima che siano state vendute in Italia circa 1.300 tonnellate di carne di struzzo (Fasone, 2001), delle quali oltre l'80% è di provenienza estera, prevalentemente da Israele e Sudafrica.

Gli allevamenti di struzzi che intendono proseguire l'attività ed affrontare il mercato sono chiamati a rivedere la struttura, la gestione e l'organizzazione aziendale per ottenere la carne ad un costo competitivo sul mercato.

Strettamente collegata alla produzione è la fase di commercializzazione della carne, che è ancora tutta da costruire. Le difficoltà sono legate innanzitutto alla dispersione degli allevamenti, che fanno lievitare i costi di trasporto e di macellazione, essendo ancora pochi i macelli abilitati; in secondo luogo è necessario trovare una adeguata collocazione del prodotto sul mercato. I tentativi in corso di aggregazione dell'offerta cercano proprio di affrontare le problematiche mercantili.

La presente ricerca si pone l'obiettivo di approfondire le conoscenze sulla gestione degli allevamenti di struzzi per verificare i livelli di efficienza raggiunti e le prospettive di sviluppo per rimanere sul mercato.

2. Materiali e metodi

Per avere un quadro complessivo dello stato attuale del comparto e delle sue prospettive non è sufficiente conoscere la situazione macroeconomica, che è quella delle rilevazioni censuarie, ma è necessario approfondire le conoscenze di tipo microeconomico.

Si tratta di rilevare gli elementi strutturali ed economici di allevamenti in attività, secondo una metodologia uniforme in un arco di tempo definito.

La metodologia dell'indagine è quella in uso presso il Laboratorio di gestione e contabilità agraria annesso all'Istituto, con la raccolta dei dati strutturali ed economici di un gruppo di allevamenti dell'Emilia-Romagna e della Toscana e la successiva elaborazione elettronica con la redazione degli inventari, della contabilità in partita doppia, del bilancio economico e di quello patrimoniale.

Dagli elaborati così ottenuti vengono estratti alcuni parametri di efficienza economica degli allevamenti per individuare i punti forti e quelli deboli della gestione. L'analisi si estende anche alle strategie messe in atto per l'organizzazione delle imprese e la commercializzazione dei prodotti.

I risultati della ricerca ci consentiranno di fare il punto sulla gestione degli allevamenti, di quantificare i fattori produttivi posti in essere e il livello dei risultati economici raggiunti dalle aziende nella prospettiva di ulteriori sviluppi. I risultati delle ricerche potranno rappresentare un punto di riferimento anche per eventuali nuove iniziative.

Per la individuazione degli allevamenti ci siamo avvalsi della collaborazione dell'AVAS (Associazione per la Valorizzazione dell'Allevamento dello Struzzo), scegliendo le aziende da rilevare in modo che il campione fosse rappresentativo della realtà del territorio in cui operiamo.

La scelta delle aziende è stata effettuata in base alla dimensione dell'allevamento riferito ai riproduttori femmine, con un minimo di 4 femmine riproduttrici e un massimo di 33, allo scopo di escludere i piccolissimi allevamenti, cosiddetti hobbi-

stici, e quelli di grosse dimensioni, che sono pochi e con caratteristiche molto peculiari. La media è di 13 femmine per allevamento.

Le rilevazioni aziendali hanno interessato 26 allevamenti, collocati in Emilia-Romagna (21) e Toscana (5). Per quanto riguarda la prima regione la distribuzione delle unità produttive interessa tutte le province, tranne quella di Ferrara. Nella seconda regione sono coinvolte le province di Livorno, Pisa e Siena.

La maggior parte delle aziende si trova in pianura (15), la rimanente parte è situata in collina (10). L'adattabilità degli animali consente la collocazione a diverse altitudini; i terreni con una certa pendenza favoriscono un migliore scolo delle acque, con minori problemi di calpestabilità.

E' diffusa negli allevatori l'estrazione extragricola. Anche coloro che esercitano a tempo pieno l'attività agricola hanno avuto spesso esperienze lavorative in altri settori produttivi. Gli allevatori di struzzi analizzati si dividono in pari quota tra agricoltori full-time e allevatori part-time, con un'attività esterna al settore agricolo. Gli imprenditori hanno mediamente 45 anni d'età e un livello di istruzione medio-alto, con diffusa provenienza extragricola.

Lo stimolo ad investire nell'allevamento di struzzi parte dalla disponibilità di terra e di capitali da dedicare ad una attività alternativa, con la prospettiva di un ritorno alla vita in campagna e di ottenere una quota di reddito integrativo.

Da notare che accanto alle presenza di ditte individuali figurano ben 11 forme societarie. In questo caso assistiamo ad iniziative di gruppo con una divisione di compiti ed una diluizione dei rischi, spesse volte con l'acquisizione di terreno e strutture in affitto, mentre nelle imprese individuali è comune il titolo di possesso in proprietà della terra.

Sono tutti allevamenti di recente costituzione, infatti il primo allevamento è sorto nel 1991, il gruppo più numeroso (8 allevamenti) è stato aperto nel 1996, sino ad arrivare a quelli con un solo anno di vita.

Pertanto ci troviamo ancora in una fase pionieristica perché legata alla "catena degli animali da vita". In realtà l'apertura di nuovi allevamenti è praticamente cessata e sta iniziando la selezione su quelli esistenti. Infatti si fa avanti una fase di ripensamento e di assestamento degli allevamenti, alla ricerca di un equilibrio tra costi e ricavi, nella prospettiva di produrre carne al minor costo possibile per il mercato al consumo, salvaguardando un reddito soddisfacente.

Per ciascun allevamento si è proceduto alla rilevazione delle schede aziendali e dell'inventario iniziale al primo gennaio 2000, con la successiva raccolta dei fatti amministrativi per l'intera annata agraria. Il lavoro di raccolta dei dati si è concluso il 31 dicembre con la rilevazione dell'inventario finale. Pertanto l'annata agraria è stata fatta coincidere con l'anno solare.

Accanto alle rilevazioni contabili analitiche sull'azienda agraria nel 2000, sono state raccolte ulteriori informazioni sull'annata agraria del 1999, con l'ausilio di un questionario, i cui risultati sono già stati oggetto di pubblicazione (Salghetti, 2000).

La successiva elaborazione dei dati ci ha consentito di ottenere un tabulato di contabilità analitica dal quale sono stati estratti il bilancio patrimoniale e quello economico-contabile per conoscere i redditi conseguiti dalle aziende. Successive elaborazioni ci hanno consentito di ottenere alcuni indici di efficienza tecnica ed economica degli allevamenti che andiamo a presentare.

I valori sono espressi in euro, convertendo le lire correnti del 2000 per il tasso di conversione fisso di 1.936,27 lire per euro.

3. Gli investimenti aziendali

La superficie media delle aziende è di 16,9 ettari, mentre le recinzioni interessano solamente 1,2 ettari, il 7% della superficie aziendale; in ogni modo il recinto più grande non supera i 3 ettari. L'attività di allevamento dello struzzo rappresenta una parte marginale dell'azienda agricola in termini di strutture e di impegno lavorativo. Il ridotto fabbisogno di terreno rappresenta un'occasione per valorizzare delle superfici altrimenti poco utilizzate.

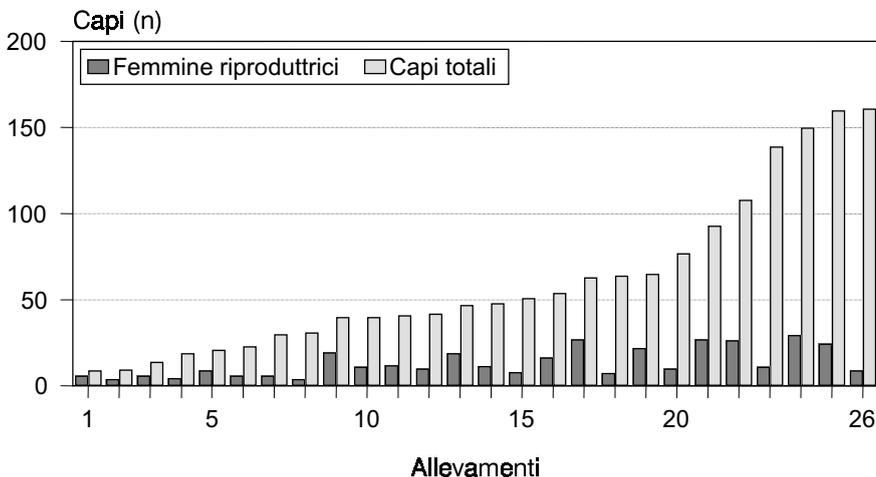
Infatti negli allevamenti indagati è impegnata mediamente una unità lavoratrice a metà tempo (1.248 ore), in prevalenza familiare (88%); alcuni allevamenti fanno ricorso a manodopera salariata fissa o avventizia per far fronte ai fabbisogni lavorativi conseguenti alla dimensione dell'allevamento, alle esigenze stagionali o all'impegno dell'imprenditore in altre attività.

I nuovi investimenti di capitali nell'azienda variano in funzione della dimensione della mandria e del ciclo produttivo che viene attuato. Solo la metà degli imprenditori adotta il ciclo completo, mentre gli altri si occupano di alcune fasi della produzione, e pertanto con minori investimenti di capitale.

I valori più consistenti dei capitali investiti (escludendo il terreno) riguardano il bestiame, con un valore medio per azienda di 32.787 euro, attribuibile principalmente ai riproduttori, in ragione dei prezzi notevolmente superiori rispetto a quelli dei soggetti da rimonta e da ingrasso.

Il numero complessivo dei capi presenti è di 1.595, con una media di 61 per azienda. I riproduttori sono rappresentati da 347 femmine e 228 maschi, i restanti 1.020 capi sono in allevamento e all'ingrasso.

Graf. 1 - Distribuzione degli allevamenti per numero di capi



Dalla distribuzione degli allevamenti per numero complessivo di capi non troviamo una correlazione con la consistenza dei riproduttori. Questo dimostra una estrema variabilità nella capacità riproduttiva con la presenza di allevamenti che, con pochi riproduttori, ottengono un consistente numero di capi ed altri allevamenti con numerosi riproduttori ma con risultati scadenti.

Mediamente i capi sotto controllo rappresentano il 16 % della consistenza complessiva di capi presenti nelle due regioni secondo il censimento dell'Istat. Il rapporto femmine-maschi è di 3 a 2, in prevalenza si tratta di coppie, seguite dai tris (2 femmine e 1 maschio) e solo saltuariamente si rileva la presenza del branco (più femmine e più maschi). In ogni modo si tratta di rapporti dinamici perché gli allevatori sono ancora alla ricerca della combinazione migliore, compatibilmente con le risorse disponibili.

Tra l'inizio e la fine dell'anno non vi sono state variazioni di consistenza complessiva, anche se all'interno abbiamo rilevato una crescita del numero dei riproduttori alla quale ha corrisposto un analogo calo degli altri capi. Rispetto all'anno precedente la crescita è stata notevole (+ 83%), dovuto per i tre quarti agli altri capi, mentre il numero dei riproduttori è cresciuto della quota rimanente in un rapporto di 2 a 1 tra femmine e maschi.

La selezione dei riproduttori è stata trascurata nel passato e i risultati si rilevano dai bassi indici di produttività dei capi rispetto agli obiettivi potenzialmente raggiungibili.

E' difficile individuare delle razze in purezza perché le origini dei soggetti sono le più diverse con la presenza diffusa di incroci. Sembra comunque che l'ordine di consistenza delle razze presenti sia la seguente: Black Neck, Blue Neck Zimbabwe, Blue Neck Namibia e Red Neck. Per la produzione di carne i migliori incroci sono quelli ottenuti tra riproduttori di razze pure con maschio Blue Neck Zimbabwe e femmina Black Neck (chiamato anche African Black).

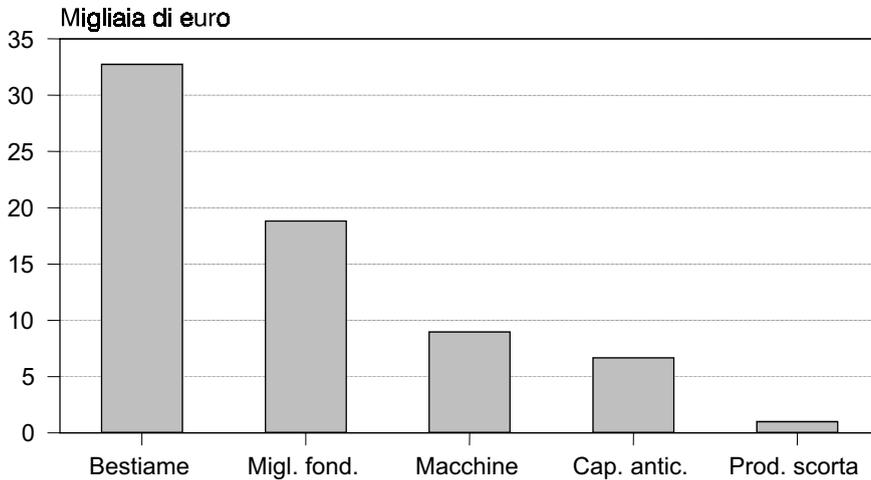
Gli altri investimenti aziendali di maggior rilievo, dopo il bestiame, sono rappresentati dai fabbricati, dai recinti e dalle tettoie con 18.876 euro per azienda. In parte sono strutture preesistenti e in parte sono nuove costruzioni. Le spese per le recinzioni e le tettoie sono piuttosto contenute perché gli allevatori fanno ricorso a materiali di recupero e a lavori in economia.

Sono gli allevamenti più grandi che investono in nuove strutture, mentre quelli più piccoli si limitano allo sfruttamento delle strutture aziendali già esistenti. L'impegno maggiore di spesa è legato alla sala di incubazione, a quella di schiusa e alle pulcinaie, dove esistono.

Per quanto riguarda i macchinari e le attrezzature i livelli di investimento sono molto variabili. Sono abbastanza consistenti quando interessano le macchine per l'incubazione e per la schiusa, che riguardano gli allevamenti più grandi. Negli altri casi le spese sono contenute, anche perché diverse attrezzature sono già disponibili in azienda. Infatti solo la metà delle aziende è dotata di incubatrice, le altre aziende, che sono quelle più piccole, preferiscono appoggiarsi alle dotazioni e alle esperienze delle prime.

Gli investimenti in macchine ed attrezzature sono mediamente di 9.017 euro per azienda; nelle aziende che non hanno incubatrice e non raccolgono il foraggio i fabbisogni di macchine sono molto esigui, sino ad annullarsi in alcuni allevamenti.

Graf. 2 - Capi mediamente investiti per allevamento



Anche per i prodotti di scorta gli investimenti sono ridotti e si limitano a 1.061 euro per azienda, rappresentati dalle scorte di mangimi e foraggi presenti all'inizio dell'anno. La possibilità di reperire i prodotti sul mercato riduce la necessità di costituire delle scorte, se non per brevi periodi. La tendenza sembra essere quella di fare sempre più affidamento ad alimenti di origine mercantile, per ridurre gli impegni di lavoro aziendali per l'approvvigionamento di alimenti cerealicoli e foraggeri.

Non va trascurata l'importanza del capitale di anticipazione, che ammonta mediamente a 6.727 euro. Pertanto il capitale agrario raggiunge i 49.592 euro per azienda.

Il dato medio degli investimenti aziendali nasconde una realtà molto diversificata, la variabilità è infatti molto accentuata e sottolinea ancora una volta lo stato di precarietà di molti allevamenti.

Rispetto all'anno precedente la consistenza degli investimenti appare stabile, nella probabile attesa di valutare meglio le possibili prospettive future dell'attività. Pertanto nel corso del 2000 gli allevatori di struzzi si sono concessi una pausa di riflessione negli investimenti, soprattutto a livello di mandria.

La situazione sembra evolversi verso una netta differenziazione tra allevatori che intendono perseguire l'obiettivo di un possibile sviluppo, con l'ampliamento della mandria per avvalersi dei vantaggi delle economie di scala, e allevatori che cercano la collocazione sul mercato dei loro riproduttori alle condizioni meno svantaggiose possibili rispetto ai prezzi pagati all'origine, in vista di un disimpegno dall'attività.

Pertanto, le due tipologie imprenditoriali si possono così rappresentare:

- quella delle aziende con prospettive di sviluppo che si stanno organizzando per rendere l'allevamento più efficiente dotandolo delle strutture necessarie alla gestione di mandrie sempre più numerose;
- quella delle aziende rinunciarie che si stanno destrutturando, cedendo gradualmente le attrezzature sino ad arrivare alla chiusura dell'allevamento.

Queste ultime sono le vittime della "catena degli animali da vita", mentre le

Tab. 1 - Indici strutturali degli allevamenti

Descrizione	Valori per azienda		
	Media	Minimo	Massimo
Aziende (n)	26	-	-
Superficie aziendale (ha)	16,9	1,2	99,0
Superficie recintata (ha)	1,2	0,2	3,0
Unità lavoratrici (n)	0,54	0,13	1,83
Unità lavoratrici familiari (n)	0,45	0,02	1,83
Ore di lavoro familiare (n)	1.248	50	4.200
Femmine riproduttrici (n)	13,3	4	33
Maschi riproduttori (n)	8,8	2	29
Capi totali (n)	60,5	6	202
Miglioramenti fondiari (€)	18.876	964	83.942
Capitale agrario (€):	49.592	12.907	119.989
- Bestiame (€)	32.787	6.662	84.544
- Macchine (€)	9.017	-	37.901
- Prodotti di scorta (€)	1.061	246	3.497
- Capitale di anticipazione (€)	6.727	1.159	20.917

prime daranno origine ad allevamenti in grado di gestire grosse mandrie, nella prospettiva di affrontare con maggior forza e competitività la fase mercantile.

4. I risultati economici

La tenuta sotto controllo contabile degli allevamenti nel corso del 2000 ci consente di analizzare in dettaglio la composizione dei ricavi e delle spese, per evidenziare i risultati economici delle aziende riferiti ad una intera annata agraria.

E' opportuno premettere che alcune aziende, non avendo ancora raggiunto la fase di maturità, sono carenti di volume d'affari, a fronte di spese in continua crescita, senza contare le spese anticipate negli anni precedenti per la costituzione e l'avvio dell'allevamento.

Pertanto nella valutazione dei risultati economici è necessario tenere conto di queste condizioni, che interessano gli allevamenti che sono ancora in attesa di raggiungere una gestione ordinaria. L'analisi economica prende in esame l'allevamento nella sua interezza, senza disaggregare le varie fasi produttive.

Nelle analisi economiche che si trovano in letteratura è più frequente incontrare elaborati relativi al calcolo del costo di produzione per singoli processi produttivi (uovo, pulcino, capo da macello ecc.). Ciò presuppone una attribuzione stimata di

voci di spesa in condizioni di allevamento ideale, che non trovano riscontro nelle condizioni operative.

Nella nostra analisi abbiamo ritenuto più oggettivo quantificare i risultati economici sul campo, considerando l'azienda nella sua interezza e finalizzata alla massimizzazione del reddito netto. E' questo l'elemento caratterizzante l'efficienza dell'allevamento e su questo si dovranno confrontare gli imprenditori, indipendentemente dalla specializzazione adottata.

4.1 La produzione

I ricavi conseguiti dalle aziende si riferiscono alla vendita di animali da carne, di soggetti riproduttori e da ristallo. A questi si aggiungono le vendite di uova da consumo e da cova. I prodotti trasformati sono rappresentati dalla carne confezionata in tagli pronti al consumo, da insaccati, a cui aggiungere la vendita di pelli grezze e confezionate. Infine troviamo anche la vendita di gusci vuoti naturali o dipinti su supporto. Non risulta invece alcuna entrata per le piume, che sono considerate materiale di scarto.

La produzione lorda vendibile media per azienda ammonta a 17.352 euro. Rapportando il dato alla superficie recintata si ottiene un valore medio per ettaro di 14.601 euro, mentre in rapporto alle unità lavoratrici impiegate la produttività media raggiunge i 31.997 euro.

Sono valori di tutto rilievo a prima vista, perché la terra interessata alla recinzione è ridotta ed anche l'impegno lavorativo è limitato ad una unità impiegata a metà tempo. In realtà alle entrate medie aziendali è sottesa una elevata variabilità, con solo tre aziende che superano i 50 mila euro di entrate e ben 8 aziende che non raggiungono i 5 mila euro.

La voce principale è rappresentata dall'utile lordo di stalla, che raggiunge il 90,5% della Plv (Produzione lorda vendibile). I nostri allevamenti sono orientati alla produzione della carne, mentre nei paesi d'origine degli struzzi riveste molta importanza la pelle.

Più in particolare la produzione di carne è frutto della vendita di animali e dagli incrementi della mandria, dedotti naturalmente gli eventuali acquisti di capi. E' la vendita di animali da macello che riveste maggiore importanza economica, si tratta di 599 capi venduti ad un peso oscillante tra gli 80 e 110 chilogrammi che hanno raggiunto l'età di 11-13 mesi. I relativi prezzi sono legati al peso degli animali e alle loro caratteristiche di finissaggio, nonché alle peculiarità del mercato locale. Si parte da 155 euro a capo sino ad arrivare a 400 euro in condizioni particolari. Sono prezzi decisamente inferiori rispetto a quelli realizzati nell'annata 1999.

In realtà i prezzi più elevati sono il risultato dell'attività di macellazione e di vendita diretta della carne che alcuni allevatori hanno intrapreso e che portano alla valorizzazione del loro prodotto. Volendo escludere questi casi e limitando l'analisi ai prezzi di mercato realizzati dai capi venduti vivi per la macellazione i valori scendono al di sotto dei 200 euro a capo. Per tali motivi i produttori si stanno organizzando per acquisire più spazio nella catena distributiva. Questa è la strada che stanno percorrendo le nascenti Associazioni produttori e le forme cooperative per la commer-

cializzazione diretta della carne, sino ad arrivare alla Gdo (Grande distribuzione organizzata).

La vendita diretta della carne in confezioni sottovuoto ha consentito di realizzare prezzi di 14-15 euro il chilogrammo, mentre per la vendita in mezzene i prezzi si sono attestati sui 5 euro il chilogrammo.

Secondo le indicazioni fornite dai produttori, le rese al macello in mezzene possono variare tra il 43 e il 50%, mentre la resa in polpa si mantiene tra il 27 e il 36%. Anche in questo caso le rese sembrano inferiori a quelle attese.

Tab. 2 - Indici sulle produzioni degli allevamenti (€)

Descrizione	Valori per azienda		
	Media	Minimo	Massimo
Produzione lorda vendibile (Plv)	17.352	258	74.055
Produzione di carne	15.698	26	71.896
Altre produzioni	1.561	-	13.554
Plv/Unità lavoratrice	31.997	1.134	172.160
Plv/Ettaro di superficie recintata	14.601	362	58.834
Uova prodotte (n)	331	26	892
Uova per femmina riproduttrice (n)	25	3	58
Uova incubate (n)	270	0	723
Uova schiuse (%)	58,9	6,7	96,6
Pulcini svezzati (%)	76,2	0	93,3
Pulcini svezzati per femmina riproduttrice (n)	9	0	28
Prezzo delle uova		10	21
Prezzo dei pulcini		41	62
Prezzo dei riproduttori		258	775
Prezzo degli animali da macello		155	200
Prezzo della carne in mezzena		5	5
Prezzo della carne in tagli pronti		14	15
Prezzo delle pelli grezze		46	93
Prezzo dei gusci interi		4	10

La vendita di animali da riproduzione è limitata a 36 capi. In questo caso l'oscillazione dei prezzi è ancora maggiore perché si parte da 258 euro a capo sino ad arrivare a 775 euro. Siamo certamente lontani dai prezzi praticati all'inizio della "catena degli animali da vita" con 5-10 mila euro, ma anche a quelli di due anni fa con 1,5-2,5 mila euro a capo. Oggi i riproduttori posti sul mercato dagli allevatori che intendono chiudere l'attività riescono a malapena a realizzare i prezzi degli animali da macello.

Più consistente è il numero dei pulcini venduti, che sono stati 1.476, i cui prezzi dipendono dallo stadio di svezzamento e dal peso. Quelli più piccoli sono stati venduti tra i 41 e i 62 euro l'uno.

Infine abbiamo rilevato l'acquisto di 205 capi, rappresentati per la maggior parte da pulcini, a partire da 31 euro a capo. In realtà questi pulcini sono stati acquistati presso i piccoli allevatori per riunirli con altri e raggiungere una massa critica per la vendita all'estero, in particolare in Grecia e in Polonia. In tali occasioni si sono stabiliti dei legami di collaborazione con gli allevatori di altri paesi che potrebbero avere ulteriori sviluppi, ad esempio come fonte di approvvigionamento di animali da macello in un prossimo futuro, come in effetti sta già avvenendo.

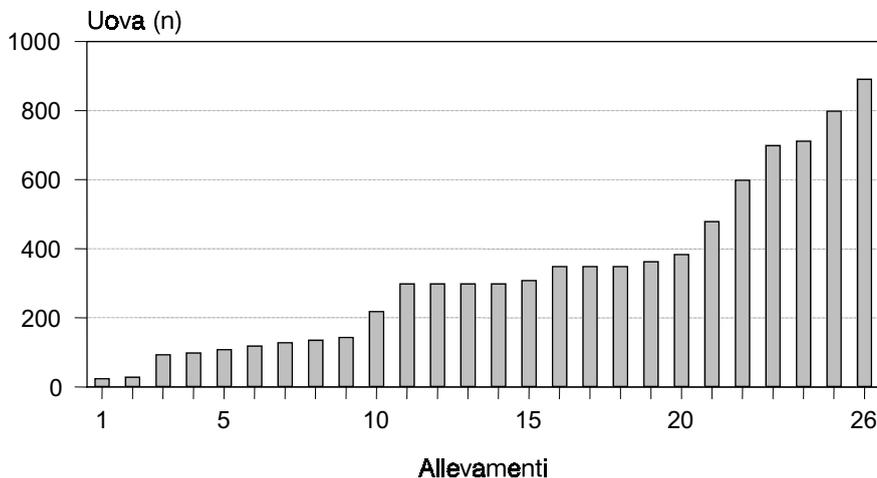
Non è mancato l'acquisto di alcuni riproduttori ad un prezzo medio di 1.300 euro, prezzo decisamente superiore a quello dei riproduttori che sono stati venduti dalle aziende. Oppure di animali da macello ad un prezzo di 206 euro a capo per rimpinguare le scorte dei capi aziendali da destinare alla commercializzazione diretta della carne, per carenza di soggetti maturi in azienda.

La vendita delle uova interessa gli allevatori che non dispongono dell'incubatrice e non intendono ricorrere all'incubazione per conto terzi. Si tratta di 815 uova vendute ad un prezzo oscillante tra i 10 e i 21 euro se destinate all'incubazione; per la vendita al consumo e per le uova da svuotare i prezzi sono stati al di sotto dei 10 euro; i prezzi sono nettamente inferiori a quelli realizzati nel 1999.

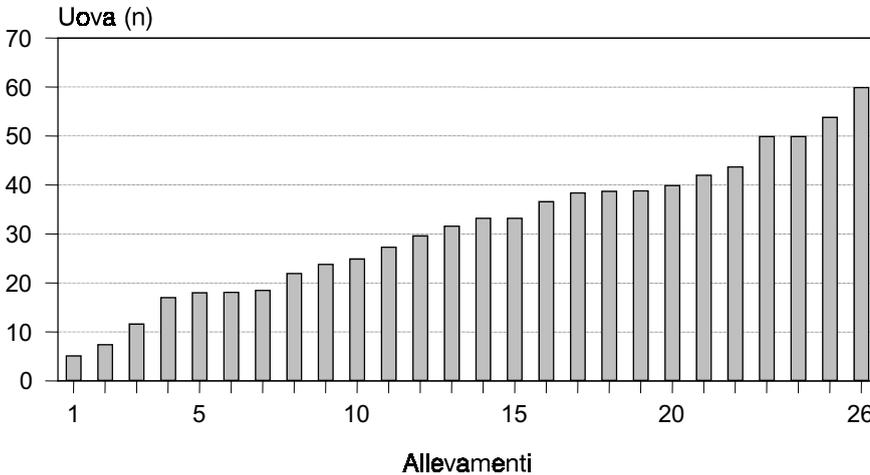
In realtà il prezzo delle uova di incubazione è spesso rapportato al tasso di schiusa, in modo da distribuire i rischi. In questo caso vengono pagate solo le uova fertili ad un prezzo nettamente superiore alla media.

Le uova incubate fuori azienda sono state complessivamente 2.259 ed hanno interessato 10 allevamenti. Gli allevamenti che incubano in azienda sono 14, i rimanenti due non hanno incubato le loro uova e si sono limitati alla vendita diretta. L'acquisto di uova da incubare è stato limitato, si tratta di 150 unità al prezzo di 15-18 euro l'una.

Graf. 3 - Distribuzione degli allevamenti per numero complessivo di uova prodotte



Graf. 4 - Distribuzione degli allevamenti per numero di uova prodotte per femmina



Complessivamente le uova prodotte sono state 8.607, con una media di 331 per allevamento e 25 uova per femmina riproduttrice. Se escludiamo le femmine giovani non ancora in piena produzione la media si eleva a 30 uova procapite. I risultati sono stati decisamente migliori rispetto a quelli del 1999, con una crescita di produttività del 75% per allevamento e del 66% per femmina riproduttrice.

Praticamente si riscontra che un quarto degli allevamenti supera le 40 uova per femmina ed altrettanti sono quelli che non raggiungono le 20 uova, i rimanenti allevamenti si trovano in una condizione intermedia.

Le uova effettivamente incubate sono state 7.015, con un tasso di natalità del 58,9%, analogo a quello dell'anno precedente. Sui 4.115 pulcini nati vi è stata una mortalità del 23,5%, per cui alla fine sono stati svezzati 3.146 pulcini, pari al 76,5% dei nati e al 44,6% delle uova incubate, con un certo miglioramento sull'anno precedente.

Rapportando i pulcini alle femmine in produzione otteniamo una media di 9 capi, che si porta a 11 con riferimento alle sole femmine in piena attività. Anche se notiamo un miglioramento rispetto all'anno precedente, non sono ancora stati raggiunti i risultati attesi, secondo le potenzialità indicate dagli esperti del comparto (Anderloni, 2000).

I risultati raggiungibili dovrebbero essere di almeno 50 uova deposte per femmina riproduttrice, con una fertilità del 90%, una schiusa delle uova del 91% ed uno svezzamento dei pulcini dell'86%, per arrivare ad almeno 25-30 struzzi venduti per femmina, tenuto conto delle uova scartate dalla incubazione e dei capi morti. Vi sono ancora ampi spazi di manovra per avvicinarsi a questi risultati, soprattutto nella selezione genetica (Burlini, 1998).

La selezione genetica è stata trascurata nel recente passato e poco si sta facendo anche oggi per le obiettive difficoltà ad intervenire. Infatti risulta incerta la conoscenza sul materiale genetico presente, frutto di incroci spesso difficilmente distinguibili l'uno dall'altro, per i quali è impossibile risalire all'origine.

Proprio le scarse conoscenze sul materiale genetico esistente rende problematico l'intervento per selezionare alcuni caratteri, se non facendo delle sperimentazioni dirette che richiedono tempo e notevoli costi.

L'ideale sarebbe di avere a disposizione delle linee pure con caratteristiche note, sulle quali impostare un piano di incroci in funzione degli obiettivi che si vogliono raggiungere (carne, pelle o entrambe le produzioni).

Agli allevatori non rimane che adoperarsi nel selezionare il materiale esistente, fissando dei limiti minimi di prestazioni, al di sotto dei quali bisogna avere il coraggio di eliminare gli animali che non rispondono ai requisiti richiesti, pena la compromissione dei risultati economici di tutto l'allevamento e degli anni a venire.

La selezione impostata in termini scientifici richiede esperienze su grandi numeri, partendo da linee pure e con una metodologia corretta, tenuto conto degli obiettivi da raggiungere. Per affrontare compiutamente questo tema è necessario ricorrere all'intervento di esperti, o comunque alla loro collaborazione con gli allevatori.

L'orientamento degli allevatori è quello di limitare l'incubazione alle uova prodotte sino a maggio-giugno perché i soggetti sono più robusti e con bassa mortalità.

Le uova incubate successivamente sono meno fertili e i pulcini hanno minore vitalità con conseguente elevata mortalità. Inoltre le condizioni ambientali da affrontare a breve sono meno favorevoli con necessità di riscaldamento e ulteriori spese, senza essere sicuri della sopravvivenza dei piccoli e con scarsi incrementi ponderali. Ciò mette a rischio l'economicità dell'incubazione delle uova di fine stagione.

La presenza di uova chiare è ancora troppo elevata per cui si presume vi siano problemi di fecondità dei maschi e di infezioni nelle femmine, soprattutto nelle ultime uova deposte.

E' anche vero che nel campione si riscontra una notevole variabilità e nella media incidono negativamente i risultati degli allevamenti in fase di chiusura, che sono quelli meno efficienti. Bisogna per altro riconoscere che alcuni allevatori hanno raggiunto risultati soddisfacenti, dimostrando di avere le capacità per perseguire gli standard consigliati; non si tratta quindi di obiettivi teorici ma anche operativi.

La perdita del 24% dei pulcini nati, praticamente 1 su 4, per mortalità neonatale rappresenta un forte handicap per gli allevatori. In un allevamento normale la mortalità dovrebbe essere compresa tra il 5% e il 10%. La riduzione di questo rischio è pregiudiziale alla buona riuscita economica. Un ostacolo ad intervenire è legato alle scarse conoscenze sulle cause di mortalità. Accanto a problemi di ordine sanitario emergono condizioni poco razionali di conduzione dell'allevamento che portano a tecnopatie, le cui origini non sono sempre individuabili, lasciando nella incertezza i produttori.

La mancanza di esperienze induce ad una serie di errori diffusi con pesanti ricadute sui risultati tecnici ed economici. Basti ricordare alcuni errori di vaccinazione, gli imprevisti ambientali (maltempo, predatori), traumi, cause accidentali nell'uso di macchine e attrezzature e le forme più varie di impaccamento.

La natura e il comportamento da "selvatico" degli struzzi allevati in un ambiente confinato (recinti) è da considerare ancora un motivo di difficoltà nella gestione produttiva. Infatti queste condizioni sono causa di notevoli stress per gli animali, con conseguenze patologiche, anche mortali.

L'elevata mortalità dei giovani animali non sempre trova una specifica motiva-

zione infettiva. Spesse volte le analisi hanno escluso la presenza di patogeni e purtroppo in alcuni allevamenti gli animali continuano a morire senza possibilità di porvi rimedio.

Vi sono poi le cause accidentali più disparate e imprevedute che provocano danni agli allevamenti. Basti citare alcuni casi che abbiamo verificato:

- elicotteri ed altri mezzi aerei provocano panico e disorientamento degli animali che si danno alla fuga in cerca di ripari con rischio di traumi anche letali o con conseguenze che si trascinano nel medio e lungo termine. Lo stress si riflette sulla riproduzione, sull'alimentazione e la crescita degli animali (infarti, abbattimento, rifiuto del cibo, maschi senza libido, interruzione della ovodeposizione ecc.);
- la presenza di cantieri edili, con l'erezione di gru e con il loro movimento, sono altrettanti fattori di spavento e di stress;
- transito di veicoli e di persone vicino al recinto senza le opportune distanze o le barriere di protezione;
- freddo improvviso che provoca nei piccoli un ammassamento con rischio di morte per soffocamento;
- gelate improvvise in terreni bagnati possono bloccare al terreno gli animali con frequenti mortalità (ci vuole il piccone per estrarli); in altri casi le ali si appesantiscono di fango e di ghiaccio, con abbattimento degli animali e deperimento, per cui è necessario intervenire con il taglio delle piume e delle penne;
- forti vibrazioni dei mezzi meccanici vicino all'incubatrice che si trasmettono alle uova con mancata schiusa;
- predatori che riescono ad entrare nei recinti e fanno strage di animali, con conseguenze negative anche per quelli sopravvissuti;
- inconvenienti tecnici alle incubatrici, interruzioni di corrente, ecc. fanno saltare intere covate.

In alcuni casi si riscontrano allevamenti apparentemente analoghi nella gestione aziendale: negli uni si riscontra una bassa mortalità, negli altri un'alta mortalità, senza cause apparenti.

Sembra addirittura che gli inconvenienti e la mortalità siano maggiori negli allevamenti che adottano strutture moderne in cemento, con condizionamento ambientale, rispetto a quelli che mettono all'aperto i piccoli entro recinti con erba medica e una semplice tettoia mobile di protezione. Infatti gli ambienti chiusi e riscaldati con pavimenti in cemento portano a sviluppo di gas (ammoniaca) che intossicano i piccoli tenuti al chiuso con conseguenze che possono essere letali.

Non ci dobbiamo dimenticare inoltre che gli allevatori stanno affrontando solo recentemente la fase di ingrasso, infatti le recinzioni predisposte sono funzionali ai soli riproduttori.

Capita spesso che i recinti siano collocati su terreni argillosi, con difficoltà di scolo dell'acqua. In questi casi con la pioggia vi possono essere dei problemi per gli stessi riproduttori. A maggior ragione questo si verifica per gli animali all'ingrasso, la cui densità e il continuo calpestio portano rapidamente a formare un acquitrino con vere e proprie trappole per gli animali, con traumi e perdite di capi, debilitazione di altri, con crescita ridotta e l'introduzione di patologie che allungano il periodo di ingrasso, con soggetti sotto peso, di scarsa qualità e che richiedono più tempo e più spese per il finissaggio. Gli struzzi infatti ingeriscono feci mescolate all'argilla che

si accumula nell'intestino con tutti gli inconvenienti digestivi e di impaccamento. La scelta del terreno è quindi un elemento fondamentale per lo struzzo (Anderloni e Martinelli, 1993).

Da qui è nata l'esigenza di spostare la fase di ingrasso in ambienti più idonei, pena la perdita degli animali stessi, dove il terreno sia drenabile e calpestable senza recare inconvenienti agli animali.

Minori problemi tecnici e sanitari presentano gli animali adulti, in particolare gli animali all'ingrasso; maggiore attenzione richiedono i controlli sanitari sui riproduttori relativamente alla sfera genitale, causa frequente di scarsa deposizione ed fertilità delle uova.

Oltre alla produzione di carne e alla vendita delle uova, vi sono altri ricavi da prendere in considerazione, come la vendita dei gusci e delle pelli. Sono entrate marginali perché interessano solo alcune aziende e parte della produzione. I gusci utilizzati sono quelli delle uova chiare che vengono svuotate, in quanto quelle schiuse sono praticamente inutilizzabili. Il loro uso è legato all'artigianato locale dei piccoli mercati di nicchia per decorazioni ecc. I prezzi oscillano tra i 4 e i 10 euro per guscio.

Per quanto riguarda le pelli, la prassi più frequente è quella di compensare il loro valore con il costo della macellazione dei capi. La disponibilità di pelli è pertanto limitata. Alcuni allevatori le fanno conciare per poi avviarle alla confezione in laboratori specializzati per soddisfare le richieste di oggetti d'abbigliamento (borse, portafogli, cinture ecc.).

Le 160 pelli grezze che sono state vendute hanno ottenuto prezzi oscillanti tra i 46 e i 93 euro, secondo la dimensione e le caratteristiche qualitative. L'oscillazione dei prezzi è anche legata al mercato perché nel 1999 si attestavano sui 40 euro e nel 2000 hanno superato i 90 euro, per poi stabilizzarsi.

Complessivamente le produzioni che si aggiungono a quelle dell'utile loro di stalla ammontano a 1.561 euro per azienda, ed incidono per il 9,5% sulla Plv.

Si sta studiando di valorizzare anche le piume adeguando il metodo di macellazione e spiumatura che deve avvenire a secco, senza bagnare l'animale.

L'obiettivo è quello di valorizzare tutte le parti dell'animale in maniera di raggiungere un maggiore valore aggiunto, frutto di piccoli ma successivi incassi che alla fine fanno emergere la differenza di produttività.

4.2 I costi di produzione

Alla voce ricavi vanno contrapposte le spese, rappresentate dai costi espliciti, che ci consentono di calcolare il reddito netto aziendale.

La voce principale di spesa è quella per l'alimentazione. Per semplificare i calcoli abbiamo quantificato gli apporti di alimenti aziendali ai prezzi di mercato.

La spesa alimentare è mediamente di 7 mila euro per allevamento, corrispondenti al 40,4% della Plv. In particolare riveste maggiore importanza il consumo di MCI (Mangimi Concentrati Integrati), che da solo interessa l'82,5% della spesa alimentare e un terzo della Plv; a seguire la spesa per l'acquisto di medica disidratata (13,2%), del fieno (3,0%) e il consumo di erba medica fresca (1,3%). Da notare uno spostamento dell'interesse degli allevatori verso l'erba medica disidratata nel 2000 rispetto al 1999, che aumenta la sua incidenza a scapito dei mangimi. Rimane comunque

una alimentazione onerosa e ancora troppo squilibrata sui mangimi. Per ridurre i costi alimentari è necessario valorizzare maggiormente i foraggi, attingendo alle risorse aziendali anziché al mercato.

L'erba medica fresca viene utilizzata solo da un quarto degli allevatori. Si tratta di un uso limitato rispetto ai pressanti consigli degli esperti, che danno particolare importanza all'impiego dell'erba medica fresca nella fase di svezzamento dei pulcini. Potrebbe essere questo uno dei motivi che contribuiscono a mantenere elevata la mortalità dei piccoli (Burlini, 1999).

Le spese sanitarie, compreso il veterinario, sono alquanto limitate e incidono per il 2,2% sulla Plv. L'incidenza delle quote di ammortamento è del 13,4% sulla Plv, mentre hanno poco peso le quote di manutenzione e assicurazione.

Se sottraiamo anche le "altre spese" (22,9% della Plv) per completare le reintegrazioni aziendali otteniamo il prodotto netto aziendale, cioè la vera ricchezza prodotta dalle aziende e da ripartire tra i fattori della produzione quale compenso.

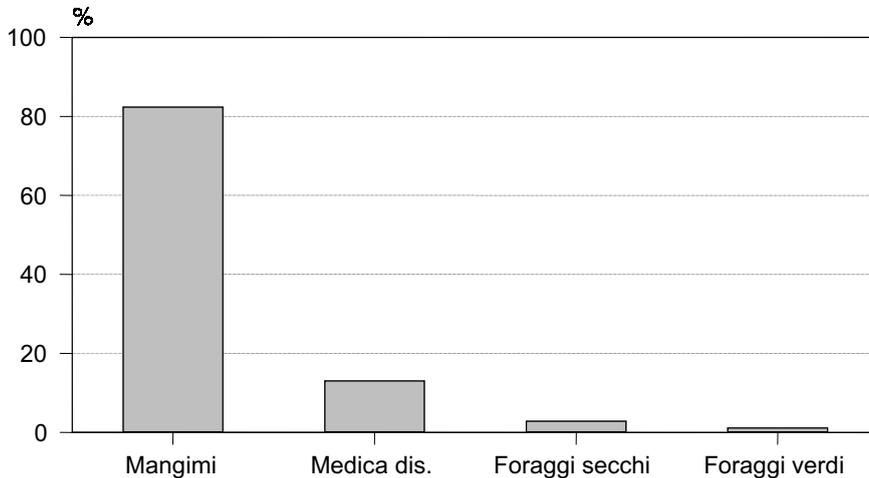
Mediante ogni azienda ha realizzato un prodotto netto di 3.514 euro, pari al 20,3% della Plv. Anche in questo caso il risultato medio sottintende una forte variabilità, perché si parte da un valore negativo di 16 mila euro e si arriva ad un massimo positivo di 43 mila euro. Alcune aziende si trovano ancora lontane dall'ordinarietà e ciò si manifesta con il diffuso stato di precarietà delle gestioni.

I compensi ai fattori produttivi esterni all'impresa sono alquanto limitati perché gli allevamenti sono improntati sulla conduzione familiare. In ogni caso tali spese (affitto, salari ed interessi) ammontano a 1.911 euro per azienda, pari all'11% della Plv.

Tab. 3 - Indici sui costi degli allevamenti (€)

Descrizione	Valori		
	Per azienda	Sulla Plv	Sui costi
	€	%	%
Mangimi	5.776	33,3	36,7
Foraggi	1.225	7,1	7,8
Sanitarie	378	2,2	2,4
Altre spese	3.971	22,9	25,2
Quote di ammortamento	2.325	13,4	14,8
Quote di manutenzione	44	0,3	0,3
Quote di assicurazione	121	0,7	0,8
Prodotto netto	3.514	20,3	22,3
Salari	1.077	6,2	6,8
Affitti	817	4,7	5,2
Interessi	17	0,1	0,1
Reddito netto	1.604	9,2	10,2

Graf. 5 - Distribuzione dei costi alimentari



4.3 Il reddito netto

Sottraendo alla produzione tutti i costi espliciti otteniamo il reddito netto, che nella media delle aziende è stato di 1.604 euro, pari al 9,2% della Plv e al 10,2% dei costi. La media del risultato nasconde una notevole variabilità nel campione.

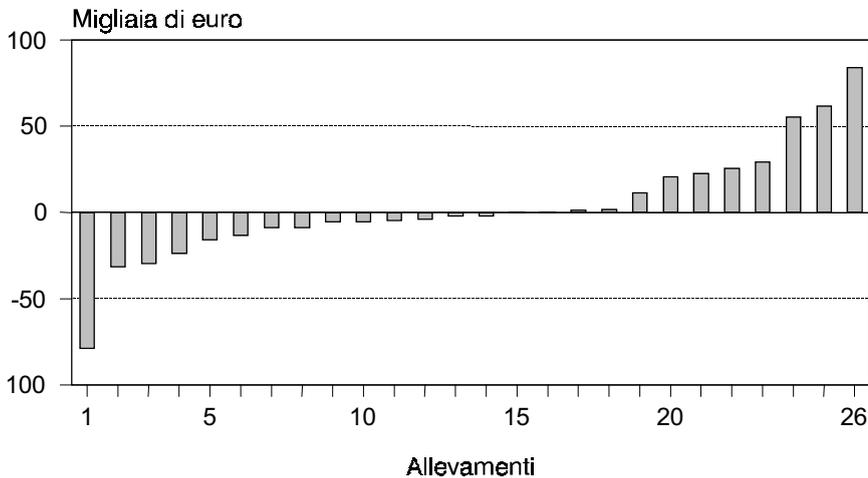
Infatti, la diffusa presenza di aziende con risultati negativi, la metà del campione, sottolinea le difficoltà del comparto in questa fase congiunturale, che rappresenta un momento di ripensamento, con la messa in evidenza di un dualismo tra aziende con prospettive future ed altre che stanno accumulando un ritardo difficilmente colmabile. Il peso economico delle precedenti gestioni è conseguente alle spese di gestione sostenute a fronte di ricavi inadeguati, ma anche alla svalutazione dei riproduttori, i cui prezzi di mercato sono molto inferiori a quelli pagati all'acquisto.

Allo stesso modo i costi per la costituzione e l'avviamento dell'azienda, con la crescita dei riproduttori, rappresenta un onere che deve trovare risposta nel valore degli stessi riproduttori e nella loro capacità produttiva, che viene riscontrata a posteriori. La formazione della mandria è infatti un'operazione costosa e di lungo periodo, perché richiede una selezione continua, che possiamo dire non abbia mai fine. Il valore della mandria va ben al di là dei prezzi di mercato dei soggetti riproduttori, perché il raggiungimento degli equilibri interni è frutto di impegno e sacrificio nel tempo.

Anche la presenza di un reddito netto positivo non è ancora una condizione sufficiente per assicurare adeguati compensi ai fattori produttivi dell'azienda. Abbiamo allora quantificato le remunerazioni ai fattori aziendali, secondo il costo opportunità. I risultati ci portano ad individuare solo un quarto di imprese con profitto positivo. Infatti la media di gruppo registra un profitto negativo di 7.679 euro.

La volontà di chiusura di un terzo degli allevamenti è il segnale di questo malessere delle aziende, non più sostenute dalla "catena degli animali da vita" o spesso vitime della stessa catena nella fase conclusiva del ciclo.

Graf. 6 - Distribuzione degli allevamenti per livello di reddito netto



Le analisi economiche che in più occasioni nel recente passato sono state presentate dagli esperti facevano riferimento ad ipotetiche aziende con indici di produttività tecnica ed economica teorici e con riferimento a prezzi di mercato dei prodotti decisamente superiori a quelli attuali.

Ciò non si esclude che tali obiettivi siano raggiungibili in un prossimo futuro. In tale direzione si stanno muovendo le aziende più efficienti che abbiamo tenuto sotto controllo contabile nel corso del 2000.

Rimane comunque maggioritaria la presenza di aziende in difficoltà, oberate dalle passività degli anni precedenti, la cui resistenza rimane incerta. A fronte di un terzo di aziende che sono in fase di chiusura, si contrappongono altre aziende che si stanno potenziando e sono in grado di assorbire le capacità produttive delle aziende rinunciarie e di andare oltre.

Si impongono anche per gli struzzi le economie di scala in modo da abbattere i costi di produzione, in particolare per quanto riguarda il lavoro. Infatti si può considerare pressoché analogo il fabbisogno di lavoro per curare ad esempio 10 oppure 50 animali.

Nulla va lasciato al caso, i processi produttivi vanno standardizzati e vanno demandate all'esterno le operazioni per le quali non si hanno i mezzi, l'ambiente idoneo e le competenze minime necessarie.

Le rilevazioni hanno interessato anche 5 allevamenti collocati in Toscana e che rientrano nella media del campione, assieme a 21 allevamenti dell'Emilia-Romagna. Volendo differenziare i risultati ottenuti dagli allevamenti delle due regioni possiamo sottolineare che quelli della Toscana si trovano in condizioni strutturali nettamente migliori e più omogenee ed esprimono la loro superiorità anche nei risultati economici. In Emilia-Romagna si riscontrano differenziazioni aziendali più accentuate ed una maggiore precarietà tecnica ed economica; ciò comporterà una selezione più drastica degli allevamenti nei prossimi anni.

I risultati della gestione economica dell'anno 2000 hanno accertato che gli alle-

vamenti di struzzi sono di fronte ad un bivio nel quale si prospettano due soluzioni:

- per gli allevamenti con reddito positivo la necessità di migliorare la gestione tecnica, ancora insoddisfacente, per non compromettere i futuri risultati economici;
- per gli allevamenti con risultati negativi la soluzione non potrà che essere quella di chiudere l'allevamento nel più breve tempo possibile, per limitare i danni.

5. L'organizzazione delle imprese

Caratteristica peculiare degli allevamenti di struzzi è la dispersione sul territorio. Ciò comporta maggiori difficoltà di incontro e di conoscenza, senza considerare gli oneri per i trasferimenti. Se a questo aggiungiamo la dimensione ridotta delle mandrie, ci rendiamo conto delle difficoltà incontrate nella organizzazione del comparto.

La rappresentanza dei produttori è dal 1997 sostenuta dall'AVAS, già Associazione Veneta Allevatori di Struzzi nata nel 1995, che ha svolto una intensa attività promozionale e di coordinamento di molte iniziative. L'Associazione ha messo a punto inoltre un "Disciplinare per l'allevamento dello struzzo" allo scopo di regolamentare l'allevamento in Italia e di garantire agli animali il massimo benessere, come riportato all'art. 1 del disciplinare stesso. La prospettiva è quella di fornire dei punti di riferimento certi ai propri associati per ottenere un prodotto con le massime garanzie per il consumatore per quanto concerne la qualità e la salubrità della carne, con ricadute positive sul reddito degli allevatori.

Più recentemente sono nate alcune Associazioni Produttori allo scopo di organizzare l'offerta sul mercato, in altri casi si sono costituite delle Cooperative di allevatori per la commercializzazione, per soddisfare le esigenze di alcuni gruppi di allevatori a dimensione locale.

A livello nazionale è nato recentemente un Consorzio, che opererà secondo le modalità tradizionali delle associazioni produttori, per organizzare la produzione e la commercializzazione della carne italiana di struzzo. Si tratta del CIAS (Consorzio Italiano Allevatori di Struzzo) che intende perseguire due obiettivi prioritari:

- recuperare il deficit organizzativo per mettere gli allevatori italiani alla pari dei concorrenti esteri;
- qualificare e valorizzare la quantità per ottenere valore aggiunto e quindi andare oltre i produttori stranieri.

La funzione del nuovo organismo è essenzialmente commerciale e di contrapposizione alla concorrenza estera per la collocazione della carne nella grande distribuzione, assicurando la continuità delle forniture, lo standard qualitativo del prodotto e un quantitativo rispondente alle richieste del mercato per rendere economica la catena distributiva (massa critica).

La costituzione del CIAS, quale consorzio nazionale che opererà secondo le modalità tradizionali delle associazioni produttori, è stata preceduta dalla costituzione di associazioni produttori regionali in Veneto, Lombardia, Emilia-Romagna, Toscana, Marche e Umbria, altre sono in fase di costituzione od aggregazione. Pertanto la sua funzione sarà anche quella di coordinare le associazioni regionali degli allevatori di struzzi, con una politica di concentrazione dell'offerta e di promozione commerciale.

Sono in fase di approntamento altre forme organizzative ad integrazione di alcune fasi della produzione e della trasformazione del prodotto. Si tratta di iniziative per la creazione di centri di incubazione e di svezzamento, per l'ingrasso e di altre ancora per la macellazione dei capi e la commercializzazione della carne, con contratti di vendita, sino ad estendersi al trattamento e alla commercializzazione delle pelli.

E' già in corso la stipulazione di contratti di fornitura e a causa della vicenda Bse si è arrivati nel 2000 ad esaurire in breve tempo le scorte di animali per la macellazione, mettendo a rischio gli stessi contratti di fornitura per l'eccesso di domanda rispetto alle capacità di fornitura dell'offerta.

La gestione associata di ingrasso degli animali viene realizzata in forma cooperativa o di soccida che porta ad integrazioni territoriali e di specializzazione delle funzioni. Anche per gli struzzi si stanno approntando i cosiddetti "centri di produttività" funzionali alla riproduzione, all'incubazione, allo svezzamento e all'ingrasso.

Naturale conseguenza della nuova struttura produttiva è l'aggregazione dei produttori e l'integrazione della filiera anche per quanto riguarda la macellazione, il sezionamento e confezionamento del prodotto finito, che viene porzionato e messo sotto vuoto per allungare la conservazione, facilitare il trasporto e garantire l'igiene e la qualità della carne.

I problemi della macellazione degli struzzi sono stati risolti a livello di normativa dal 1998, dando la possibilità di adeguamento ai macelli esistenti. Purtroppo il loro numero è ancora limitato (sono arrivati a 30 unità nel 2002), gli allevatori sono così costretti a lunghe percorrenze con aumento dei costi e inconvenienti per gli animali e la qualità della carne.

In effetti l'interesse ad adeguare gli impianti è legato al numero potenziale di capi da macellare. In carenza di capi non si aprono i macelli e gli allevatori senza i macelli non sono incentivati ad allargarsi. Sono problemi legati alle fasi di crescita dell'attività, alla ricerca di nuovi equilibri con adattamenti strutturali ed organizzativi da attuarsi con gradualità.

La filiera continua con la commercializzazione della carne in forma associata (cooperativa, associazione produttori ecc.). L'obiettivo è quello di garantire ai produttori l'acquisizione di tutte le fasi della filiera dello struzzo, per trattenere in azienda i successivi valori aggiunti.

In questa prospettiva, la fase di specifica competenza dell'allevatore rimarrebbe quella della gestione dei riproduttori per la produzione delle uova. Le fasi successive verrebbero aggregate per avvalersi delle economie di scala ed avere più potere contrattuale sul mercato.

E' un progetto ambizioso che può essere realizzato proprio per la mancanza di vincoli aziendali consolidati nella gestione delle fasi successive della filiera. Nello stesso tempo è anche un'assunzione di rischi, perché il progetto richiede ulteriori investimenti di capitali, senza la certezza di avere sotto controllo le fasi extraaziendali e prevedere con sufficiente attendibilità la loro riuscita e un ritorno economico.

L'alternativa è quella di ricercare una propria nicchia di mercato locale cercando di integrare la produzione con la trasformazione e la vendita diretta. In ogni caso si presuppone una certa dimensione aziendale che giustifichi gli ulteriori investimenti sino ad arrivare al consumo.

Nel panorama recente l'organizzazione dei produttori è stata rivolta verso le nic-

chie di mercato con la gestione diretta della filiera; per alcune realtà i risultati sono stati positivi.

Le forme associate sono invece in corso di promozione e di attuazione con la prospettiva di collegarsi alla Gdo. La necessità è quella di poter disporre di una massa critica di prodotto, di garantire uno standard di qualità e la costanza delle forniture nel tempo.

In entrambe le prospettive gli allevatori di piccole e piccolissime dimensioni sono destinati a soccombere per lasciar spazio ad aziende di adeguate dimensioni gestite in maniera efficiente.

Dalle ricerche condotte abbiamo potuto quantificare i vari livelli di efficienza del processo produttivo. Rispetto ai parametri obiettivo forniti dagli esperti gli allevamenti esaminati hanno ancora molto da migliorare.

La selezione dei riproduttori è la strada che va intrapresa senza indugi, infatti la presenza di soggetti con bassa deposizione di uova comporta un costo di mantenimento e di produzione dell'animale senza un adeguato corrispettivo e pertanto il costo delle uova diventa proibitivo ed antieconomico.

La riproduzione interessa anche i maschi per la fertilità delle uova. La combinazione dei riproduttori, in coppia o tris, è una scelta da effettuare con cura per la compatibilità tra i soggetti, a causa della concorrenza e dell'aggressività che vanno valutate di volta in volta, non potendosi prevedere in anticipo i singoli comportamenti. Infine bisogna valutare il tasso di svezzamento dei pulcini, per ridurre la mortalità che si presenta molto elevata.

Le possibilità di miglioramento sono ancora molto ampie e le prospettive di sviluppo sono legate al superamento dell'efficienza tecnica, per migliorare l'efficienza economica e ridurre il costo di produzione della carne.

A sostegno degli allevamenti di struzzi sono state predisposte o sono in corso di approntamento delle normative regionali, con incentivi finanziari allo scopo di potenziare e sviluppare l'attività come diversificazione delle produzioni aziendali e per dare complementarietà all'occupazione della manodopera.

6. La commercializzazione dei prodotti

La risoluzione dei problemi mercantili è prioritaria a quella della fase produttiva, secondo il principio che prima di produrre è necessario sapere dove collocare la produzione e a quale prezzo. Nella realtà operativa la stessa fase produttiva presenta ancora dei problemi che vanno al più presto superati.

Il mercato legato all'allevamento dello struzzo è ancora giovane e alla ricerca di un suo equilibrio. La carne di struzzo è stata infatti introdotta sul mercato italiano solo nel 1995 e pertanto è un alimento ancora poco conosciuto dai consumatori.

D'altra parte in questi ultimi anni si sono verificati notevoli cambiamenti nella struttura dei consumi e delle abitudini alimentari degli italiani.

L'espansione del reddito spinge i consumatori alla ricerca di prodotti più ricchi di gusto, sapore e varietà, con una maggiore attenzione verso l'aspetto salutistico e la genuinità dei cibi.

In questa prospettiva si inserisce coerentemente la carne di struzzo che rappre-

senta per il mercato un prodotto nuovo e alternativo, con peculiari requisiti di salubrità e di qualità nutrizionali (Fasone e Adamo, 2001).

La Svizzera, che è uno dei paesi a più elevato reddito in Europa, è anche quello che vanta una più lunga tradizione nel consumo della carne di struzzo, con i quantitativi più elevati (Burlini, 1999), grazie alla sua introduzione nella dieta delle persone anziane e con problemi nutrizionali. Un forte contributo alla domanda di carne di struzzo viene proprio dalle case di riposo e di cura.¹

Dalle ricerche condotte sull'atteggiamento dei consumatori nei confronti della carne di struzzo (Pirani, 1999) si evince che ci troviamo ancora in una fase di consumo occasionale e di curiosità, anche se le qualità nutrizionali ed organolettiche della carne di struzzo richiamano soprattutto consumatori consapevoli per il buon livello culturale e quindi solitamente informati su ciò che acquistano.

Non va trascurato che la novità viene sfruttata nella ristorazione per differenziare e dare prestigio ai locali più rinomati. Questo si riflette anche nel consumo familiare per poter offrire nelle occasioni d'incontro un motivo di sorpresa, di interesse e di discussione con i convitati.

Da noi la carne di struzzo rimane comunque un consumo ridotto perché i prezzi della carne sono considerati ancora elevati e la disponibilità del prodotto è incerta e discontinua. Solitamente è presente in isolati punti vendita della grande distribuzione e in alcune macellerie sparse sul territorio in corrispondenza degli allevamenti, che si occupano anche della macellazione e distribuzione della carne.

Il mercato della carne di struzzo è pertanto tutto da costruire e un ruolo importante spetta agli allevatori nel contenere i costi di produzione e di organizzare l'offerta in modo da rendere accessibile l'acquisto ad una fascia sufficientemente ampia di consumatori.

Nel periodo della "catena degli animali da vita" il mercato è stato molto volatile, caratterizzato da una fase crescente, in corrispondenza della diffusione degli allevamenti, e da una fase decrescente, quando è cessata la richiesta di animali da vita. Si è così innescata la rincorsa alla vendita dei riproduttori da parte di coloro che volevano cessare l'attività.

È questa la situazione corrente, che disturba il raggiungimento di un equilibrio da parte degli allevatori che intendono proseguire l'attività attraverso l'ampliamento della mandria per raggiungere migliori condizioni di efficienza tecnica ed economica.

In assenza di una massa critica di produzione nazionale il mercato è ancora dominato dalla carne di importazione. A livello di consumi la situazione è ancora in evoluzione e non ci è dato ancora sapere tutta la potenzialità del mercato italiano. Si stima che la carne commercializzata sia di circa 1.300 tonnellate, per la maggior parte proveniente dal Sud Africa e da Israele. Negli ultimi tempi sono iniziate ad arrivare offerte anche dai Paesi dell'Est Europa, gli stessi che sono stati riforniti di capi da vita dagli allevatori italiani negli scorsi anni.

¹ Basti dire che la Svizzera è anche il maggiore importatore di carne di struzzo dal Sudafrica (Van Zyl, 1997). A titolo personale ricordo di avere annotato l'acquisto di carne di struzzo surgelata e porzionata sottovuoto in una macelleria di Zurigo, in occasione delle festività pasquali del 1991, ad un prezzo al chilogrammo di 35.000 lire, pari a circa 50.000 lire del 2000, corrispondenti a 26 euro.

Il maggior consumo si registra nel Nord Italia con preferenza nel periodo natalizio e pasquale, come avviene anche in Svizzera. E' dal 1998 comunque che la normativa consente la macellazione in Italia degli struzzi, colmando un vuoto che poteva pregiudicare la continuazione degli allevamenti.

In effetti ci troviamo di fronte ad un prodotto nuovo, sconosciuto ai consumatori sino a pochi anni fa, i cui spazi di mercato sono tutti da verificare e da conquistare, per cui si può parlare di situazione d'incertezza.

Attualmente il limitato prodotto nazionale viene esibito sul mercato attraverso tre canali:

- quello della vendita diretta, dove l'allevatore gestisce le fasi di macellazione e di confezionamento del prodotto e trattiene tutto il valore aggiunto;
- quello della distribuzione tradizionale, attraverso la macelleria;
- quello della grande distribuzione, attraverso contratti di integrazione.

L'organizzazione dei produttori è in fase di crescita ed attende una verifica di operatività. Anche per la carne di struzzo vanno portate avanti le nuove strategie di marketing per sfruttare le condizioni di mercato favorevoli riconducibili al caso Bse, l'ultimo di una serie di eventi, che hanno spinto i consumatori verso prodotti alternativi in sostituzione di quelle carni la cui immagine era stata compromessa.

In ogni caso andrebbero privilegiati in un primo tempo i mercati di nicchia nei quali uno o più produttori locali si industrializzano per la vendita diretta dei loro prodotti, per lucrare sui successivi valori aggiunti e ampliare il budget, anche con dimensioni aziendali ridotte. E' questa la strada privilegiata per la valorizzazione delle produzioni aziendali, laddove le condizioni lo permettono, nella prima fase di avvio dell'attività.

I collegamenti con la Gdo possono arrivare in un secondo momento, quando si saranno realizzate le economie di scala ed avviata la concentrazione dell'offerta che consenta di disporre di grossi quantitativi di prodotto, di qualità omogenea e con fornitura continua.

Partire subito con la Gdo, senza avere le dimensioni minime necessarie, potrebbe essere controproducente e compromettere i futuri rapporti di integrazione. Alcuni ricercatori propendono invece di puntare subito ad una strategia per i consumi di massa (Pirani e Casnaghi, 2001), nell'ipotesi di riuscire ad organizzare l'offerta a livello nazionale, attraverso l'associazione dei produttori. Rimane l'incognita sulla capacità dei produttori ad organizzarsi ed a garantire una massa critica di produzione con caratteristiche qualitative omogenee e continuità di fornitura. Se tali condizioni non fossero perseguibili il rapporto costi/benefici dell'operazione potrebbe rappresentare un boomerang per i produttori.

I produttori si stanno organizzando per gestire, accanto alla carne, anche il mercato delle pelli per trattenere i successivi valori aggiunti della filiera.

Le prospettive migliori per lo sviluppo degli allevamenti devono trovare risposta nelle soluzioni più adeguate ai singoli casi che potremmo suddividere in due tipologie:

- allevatori che si appropriano dell'intera filiera in modo da godere dei successivi valori aggiunti con ampliamento del budget che giustifichi l'occupazione a tempo pieno;
- allevatori che si associano per gestire l'intera filiera, pur mantenendo l'impegno

part-time nell'azienda, con semplificazione e riduzione delle competenze e con la specializzazione dei compiti in modo da garantire la continuità produttiva e l'approvvigionamento standard e costante della carne ai macellai e alla grande distribuzione organizzata che richiede la sottoscrizione di contratti di fornitura.

Va ricordato che alla fine del 2000 e inizio 2001 vi è stato un boom della domanda di carne di struzzo, a causa delle note vicende della mucca pazza, che hanno svuotato i recinti di animali, tanto da dovere ricorrere alla macellazione dei riproduttori delle aziende in fase di chiusura.

Gli speculatori in questi casi trovano il loro ambiente ideale, setacciando il territorio alla ricerca di capi a poco prezzo. Di qui il rischio per i produttori associati di stipulare accordi di fornitura senza essere certi di avere gli animali al momento opportuno, infatti è ancora carente l'offerta di animali da macello. Pertanto i piani di distribuzione dovevano procedere per gradi in base alla disponibilità e alla crescita degli animali per non rischiare di soccombere alle penalità previste dai contratti di fornitura e pregiudicare i futuri accordi.

La stessa Gdo si è attivata con la richiesta crescente di carne di struzzo, cogliendo gli allevatori impreparati a far fronte alle richieste, a fronte dei tempi biologici più lunghi per ottenere la produzione della carne.

L'unico sfogo per la Gdo rimane ancora l'importazione di carne dai paesi dove gli animali sono allevati per la pelle e dove la carne rappresenta un sottoprodotto. Trattandosi di animali adulti la carne è molto scura e dura rispetto a quella dei giovani animali, che si presenta più chiara e tenera. Ciò dovrebbe rappresentare un punto a favore della carne nazionale, rappresentata da soggetti macellati sotto l'anno di vita.

Le rilevazioni mercantili del comparto sono curate dalla Redazione della rivista "Struzzo e dintorni", che fa il punto sul mercato dello struzzo per quanto riguarda i prodotti finali e quelli intermedi.

Nell'ambito delle quotazioni viene fatta distinzione tra il mercato hobbistico e quello degli allevamenti produttivi, secondo le classi di dimensione del prodotto offerto.

Le quotazioni sono riferite a febbraio 2002, mentre per il mercato dell'uovo le quotazioni sono del giugno 2002. Tali quotazioni non sono state aggiornate e sono rimaste le stesse del 2000, per cui si può ritenere che all'oggi siano decisamente fuori mercato, perché antecedenti la conclusione della "catena degli animali da vita". Inoltre le stesse quotazioni vengono all'inizio riferite al mercato italiano e, successivamente, al mercato europeo.

Nella prima rilevazione mercantile del gennaio 2000 erano riportate anche le quotazioni della carne all'ingrosso e dei pellami, successivamente abbandonate. L'aggiornamento delle quotazioni di mercato è ancora più importante in un periodo di rapida evoluzione e di cambiamenti, per non lasciare nell'illusione i produttori di poter realizzare nel 2002 i prezzi del 2000.

Possiamo convenire che i prezzi di mercato riferito alle attività hobbistiche siano quelli più elevati e che all'aumentare della quantità offerta i prezzi siano decrescenti. Rimangono alcune riserve sulla disponibilità di dati relativi ad offerte di grosse dimensioni.

Dall'inizio del 2000 ad oggi le quotazioni mercantili dei prodotti dello struzzo

sono andate calando, complice la svendita di animali da parte di coloro che hanno cessato l'attività. Ma anche la concorrenza con i prodotti di importazione si è fatta più stringente e i nostri allevatori sono stati costretti a rivedere le proprie strategie produttive e mercantili.

A livello produttivo si tratta di perseguire i vantaggi delle economie di scala per contenere i costi, a livello mercantile si è resa necessaria la concentrazione dell'offerta e la gestione di una quota più elevata possibile della filiera distributiva per trattenere i successivi valori aggiunti.

Come è già stato osservato, la carne di struzzo è fortemente soggetta alla concorrenza dell'importazione, che è ancora oggi la principale fonte di approvvigionamento dei consumi. I produttori quindi hanno il difficile compito di competere con la carne di importazione, che spunta prezzi competitivi, anche perché rappresenta un sottoprodotto dell'allevamento, laddove la finalità principale è quella della produzione di pelle.

La concorrenza non si limita al solo contenimento del costo di produzione, ma deve interessare anche la valorizzazione della produzione nazionale, allo scopo di ottenere un riconoscimento di prezzo che premi la migliore qualità del prodotto.

In questa direzione si sta muovendo proprio l'AVAS, alla quale aderiscono la maggioranza delle aziende, con la formulazione del citato disciplinare di produzione, che garantisca le condizioni migliori di vita e di crescita degli animali, quale presupposto per una produzione di qualità.

7. Alcune conclusioni

A conclusione delle ricerche sugli allevamenti di struzzi, che hanno interessato un campione di 26 aziende nel biennio 1999-2000, possiamo trarre delle indicazioni utili sulla situazione del comparto per quanto riguarda le condizioni strutturali ed economiche in cui operano le aziende, prospettando un quadro sulle prospettive future.

L'indagine ha coinciso con la fase conclusiva della "catena degli animali da vita" e la ristrutturazione degli allevamenti in vista delle future sfide mercantili.

La caduta delle quotazioni ha messo in serie difficoltà gli allevatori, abituati a collocare sul mercato gli animali da vita, quando invece la destinazione odierna degli animali è quella della macellazione per la produzione di carne e la vendita della pelle.

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 stes-

so 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.

Rimane comunque prioritario il miglioramento genetico, che fino ad oggi non c'è stato, ed è la causa principale dei modesti risultati produttivi (in termini di produzione di uova e di fecondità, di tasso di svezzamento dei pulcini ecc.), ormai incompatibili per il proseguimento dell'attività, che oggi è finalizzata non più all'allevamento di animali da riproduzione per aprire nuove aziende quanto all'ingrasso e alla produzione di carne.

Gli allevatori sono ancora alla ricerca degli assetti definitivi della mandria, in ogni caso i riproduttori non sono ancora tutti in piena produttività e comunque non hanno ancora raggiunto i livelli di produttività attesi.

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 alcuni 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.

L'analisi economica è prioritaria nelle scelte imprenditoriali, anche per gli allevatori di struzzi vanno fissati degli obiettivi che consentano all'azienda di raggiungere nel più breve tempo possibile il punto di break-even, punto nel quale i costi devono eguagliare i prezzi come condizione minima.

Tali obiettivi si possono raggiungere migliorando la produttività in azienda, con un aumento del numero di nati per ogni riproduttrice, con la riduzione della mortalità neonatale e con la standardizzazione dei sistemi di gestione e di alimentazione, tali da massimizzare i profitti (Van Zyl, 1997).

Per definire più compiutamente 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.

Parole chiave: Struzzo, economia, prospettive.

Key words: Ostrich, economics, prospects.

Mots-clés: Autruche, économie, perspectives.

RIASSUNTO - La nostra indagine ha interessato 26 allevamenti di struzzi, con una

consistenza media di 60 capi, di cui 22 riproduttori (37%), dislocati in Emilia-Romagna (21) e Toscana (5). Le ricerche aziendali hanno riguardato gli investimenti e la gestione economica tramite le rilevazioni contabili.

I risultati hanno evidenziato una pausa di riflessione degli imprenditori negli investimenti e le difficoltà economiche legate alla conclusione della “catena degli animali da vita”. Infatti, solamente la metà delle aziende ha realizzato nel 2000 un reddito positivo e le prospettive future non sono migliori della situazione attuale.

Pertanto, gli allevatori di struzzi si trovano di fronte a due soluzioni:

- quelli con reddito positivo hanno bisogno di migliorare la gestione tecnica e quella economica;
- quelli con reddito negativo hanno necessità di limitare le perdite con la chiusura dell'allevamento nel più breve tempo possibile.

Le prospettive future degli allevamenti rimasti sono quelle di allargare la base produttiva, per avvantaggiarsi delle economie di scala, e di organizzare la fase mercantile per fare scoprire la carne di struzzo ai consumatori, differenziando la qualità del prodotto nazionale su quello di importazione.

SUMMARY - *Economic prospects for ostrich breeding.*

The investigation covered 26 ostrich breeding farms, with an average number of 60 birds per farm, 22 of which were breeding males (37 %), located in the regions of Emilia-Romagna (21) and Tuscany (5). Company research, which entailed an analysis of the accounting records, concentrated on investments made and economic management.

The results showed, firstly, that entrepreneurs were pausing for thought as regards investments and, secondly they revealed the economic difficulties connected with the conclusion of the “breeding chain” .

In actual fact, only half of the companies made a profit in 2000, and prospects for the future are not any better.

Hence, ostrich farmers breeders are faced with two possibilities:

- those with a positive income need to improve farm management from the technical and economic points of view;
- those with a negative income need to cut their losses by closing down the breeding farm as soon as possible.

Future prospects for the remaining breeding farms consist in extending the production base, in order to exploit economies of scale, and in launching marketing campaigns to bring the benefits of ostrich meat to the knowledge of the consumer, while differentiating the quality of the national product from that of the imported one.

RÉSUMÉ - *Perspectives économiques de l'élevage d'autruches.*

Cette enquête s'est penchée sur 26 élevages d'autruches, avec un cheptel moyen de 60 têtes, dont 22 reproducteurs (37 %), situés en Émilie-Romagne (21) et en Toscane (5). Les recherches effectuées portaient sur les investissements et sur la gestion économique à travers l'examen des pièces comptables.

Les résultats de l'enquête traduisent en premier lieu une pause de réflexion des entrepreneurs en matière d'investissements et, en second lieu, les difficultés économiques liées à la fin de la “chaîne des animaux de vie”. En effet, seules la moitié des

exploitations affichaient en l'an 2000 un rendement positif et les perspectives d'avenir ne sont pas meilleures que la situation actuelle.

Par conséquent, deux solutions se proposent aux éleveurs d'autruches:

- ceux qui bénéficient de revenus positifs doivent améliorer leur gestion technique et économique;
- ceux qui ont un revenu négatif doivent limiter les pertes en fermant leur exploitation aussi rapidement que possible.

Les perspectives d'avenir des élevages consistent à élargir la base de production pour profiter des économies d'échelle et à organiser la phase mercantile de manière à faire découvrir la viande d'autruche aux consommateurs en différenciant la qualité du produit national de celui d'importation.

Bibliografia

- 1) ANDERLONI G. (1992). Struzzi: attenti a costi e ricavi. Rivista Avicoltura, n. 12, pag. 15-19.
- 2) ANDERLONI G., MARTINELLI A. (1993). Lo struzzo ed il suo ambiente. Rivista di Avicoltura, n. 4, pp.15-19.
- 3) ANDERLONI G. (2000). Manuale sull'allevamento dello struzzo. Calderini Edagricole, Bologna.
- 4) AVAS. Notiziari mensili, varie annate.
- 5) BENSON F. (2000). Sistema de pago de los productos derivados del avestruz. La solución mejor para todos: productores, transformadores y consumidores. Revista Selecciones Avícolas, aprile, pp. 218-222.
- 6) BURLINI F. (1998). Manuale pratico per l'allevamento dello struzzo. Edizioni "L'Informatore Agrario", Verona.
- 7) BURLINI F. (1998). Analisi economica dell'allevamento dello struzzo. L'informatore Agrario, n. 9, pp. 73-77.
- 8) BURLINI F. (1999). L'alimentazione degli struzzi. L'Informatore Agrario, n. 42, pp. 111-119.
- 9) CASTELLO F. (1995). Analisis de costes para una explotación tipo de ciclo completo de 8 tríos. Revista Selecciones Avícolas, novembre, pp. 755-758.
- 10) CASTELLO F. (1998). Cinco años de avestruces en España. Revista Selecciones Avícolas, maggio, pp. 80-284 + 272.
- 11) CIVES I. (1998). Lo struzzo. Situazione in Italia. Aspetti produttivi, sanitari e legislativi. Il progresso Veterinario, n. 1.
- 12) DAMIANO L., LIJOI A. (1997). Investire in agricoltura. Guida pratica alle colture e agli allevamenti del domani. Il Sole 24 Ore, Milano.
- 13) DAMIANO L. (1999). La struzzomania fa i conti col mercato. Agrimese, dicembre.
- 14) DEEMING D.C., ANGEL C.R. (1996). Introduction to the ratites and farming operations around the world. International Conference held in Manchester, England.

- 15) DOWSLEY W.G., GARDNER C. (1993). Ostrich foods e feeding. The Publishers-Grahamstown, South Africa.
- 16) DRZKA B. (1995). Cattle Yesterday Ostrich Today. The Ostrich News, n. 76, Oklahoma, Usa.
- 17) ENDRIGHI E., BIANCHI A., ZUCCHI G. (1996). Filiera struzzo, condizioni per un futuro. Rivista di Avicoltura, n. 12.
- 18) ENDRIGHI E., BIANCHI A., ZUCCHI G. (1997). La ratiticultura nel Nord Italia. Rivista di Avicoltura, n. 1-2.
- 19) FASONE V., PRIVITERA D. (1999). Lo struzzo al Sud: costi aziendali. Rivista di Avicoltura, n. 12, pp. 16-19.
- 20) FASONE V. (2001). Lo struzzo in Calabria oggi. Riv. "Struzzo e dintorni", n. 28.
- 21) FASONE V., ADAMO E. (2001). Una carne adatta alla moderna alimentazione. Rivista di Avicoltura, n. 4, pp. 22-24.
- 22) GAMBERINI A. (1998). Zootecnia alternativa. Edagricole, Bologna.
- 23) HARRIS S.D., MAY S.G., JACKSON G.C., LUCIA L.M., HALE D.S., MILLER R.K., KEETON J.T. (1993). Ostrich meat industry development. Final Report. Texas Agricultural Extension Service, 1-40.
- 24) HASTING M. Y. (1991). Ostrich farming, University of New England, printery Armidale, N.S.W.
- 25) ISTAT (1999). La consistenza degli allevamenti di struzzi in Italia. Statistiche in breve.
- 26) ISTAT (2002). 5° Censimento generale dell'agricoltura, anno 2000.
- 27) PIRANI A. (1999). Carne di struzzo, dalle aspettative dei produttori alle esigenze dei consumatori. Atti del XXXVIII Convegno nazionale dell'Associazione Italiana Avicoltura scientifica "L'allevamento dello struzzo in Italia", Forlì, 4 novembre 1999.
- 28) PIRANI A., CASNAGHI A. (2001). Carne di struzzo: ipotesi per una strategia di marketing. Riv. "Struzzo e dintorni", n. 28.
- 29) PRIVITERA D., FASONE V. (2000). L'atteggiamento del consumatore verso "nuovi prodotti": la carne di struzzo. Convegno "Consumi e sicurezza agroalimentare tra interessi privati e azione pubblica", CISAPA, Udine, 16-17 novembre 2000.
- 30) QUARANTELLI A., SUPERCHI P., SABBIONI A. (1999). Caratteristiche delle carcasse e delle carni di struzzo. Atti XXXVIII Convegno Nazionale Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica, Forlì.
- 31) RALEICH A.J., HENDRICKSON G. (1994). Ostriches. Economic analysis of a commercial production system. Department of Agricultural Economics, Oklahoma State University, Usa.
- 32) SALES J., MARAIS D., KRUGER M. (1996). Fat content, caloric value, cholesterol content and fatty acid composition, "Journal of food composition and analysis", n. 9, pp. 85-89.

- 33) SALGHETTI A. (2000). Alcune caratteristiche strutturali ed economiche di allevamenti di struzzi, in *Annali Fac. Med. Vet., Università di Parma*, XX, pp. 63-82.
- 34) SPORTELLI G.F. (1996). Zemach Ostriches, l'esperienza israeliana. *Rivista Avicoltura* n. 7-8, pp. 34-36.
- 35) SPORTELLI G.F. (1999). Lo struzzo come carne alternativa. *L'Informatore Zootecnico* n. 18.
- 36) SPORTELLI G.F. (1999). Il nuovo corso della struzzicoltura. *Rivista di Avicoltura* n. 9.
- 37) VAN ZYL P. (1996). I costi di produzione in Sudafrica. *Rivista Avicoltura* n. 9, pp. 33-37.
- 38) VAN ZYL P. (1997). Lo struzzo interessa tutto il mondo. *Rivista di Avicoltura*, n. 6.
- 39) VERONESI G., POLLINI P. (2001). Evoluzione del mercato, prospettive generali, sviluppo e sostenibilità del comparto struzzi. *Rivista "Struzzo e dintorni"*, n. 28.
- 40) WALLANCE C. (1995). *Breeding Concepts e Practical System. The Ostrich News*, n. 78, Oklahoma, Usa.

ISOLATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND *LISTERIA* SPP. FROM PIGS AT SLAUGHTER IN ITALY.

Bonardi S.*, Brindani F., Maggi E.

Introduction

The hazard of pork carcass contamination by zoonotic bacteria during swine slaughter process cannot be completely eliminated. In fact, sources of contamination during swine slaughter are both pig-related, such as faecal and pharyngeal, and environmental. Potentially pathogenic micro-organisms such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* are spread to the carcass mainly from the carrier animal (de Boer and Nouws, 1991; Sorensen *et al.*, 1999; Autio *et al.*, 2000). In particular, *L. monocytogenes* from tongue or tonsils may contaminate the equipment at the abattoir and consequently spread to the carcass. Therefore, following good manufacturing practices and efficient cleaning and disinfection procedures at the abattoir is of the utmost importance to prevent slaughtering equipment being contaminated with the micro-organism (Autio *et al.*, 2000). In fact, *L. monocytogenes* and *Listeria* spp. can be endemic in the abattoir environment and therefore controlled only by proper cleaning and disinfection (Borch *et al.*, 1996).

Moreover, *L. monocytogenes* can be considered one of the most difficult bacteria to eliminate from food processing plants, due to its ubiquity in the environment (Lar-pent, 1995).

L. monocytogenes human infection frequently results in meningitis, with or without septicaemia, or in septicaemia alone. Immuno-compromised people, infants and elderly are particularly vulnerable. In pregnant women listeriosis may produce a flu-like illness, with the infection spreading to the foetus and resulting in miscarriage, stillbirth or prematurely birth of an ill child (SCVM, 2000). As *L. monocytogenes* is recognized as a significant foodborne pathogen and it is a major concern in food industries (Farber and Peterkin, 1991), major goal of this study was to investigate the carriage rate of this micro-organism by slaughtered pigs and the prevalence of pork carcass contamination during slaughter.

Materials and methods

Between December 1999 and December 2000, 150 finishing pigs (150-180 kg weight) at slaughter were randomly selected in two abattoirs of Emilia-Romagna

Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale – Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma, Via del Taglio, 8 – 43100 Parma, Italy.

* corresponding author. Fax number: 0039-0521-032742 - E-mail address:

silvia.bonardi@unipr.it

region, northern Italy. The two slaughterhouses had a capacity of 300 swine per hour, *i.e.* 12.000 per week. A total of 300 specimens were collected during 23 sampling visits. From each animal, caecal material was aseptically collected immediately after slaughter and placed in separate sterile containers. Carcass swabs were taken from the sternal region and the throat region. The sampling areas were 20 x 20 cm wide and each carcass was swabbed with only one sterile cotton swab, placed after swabbing in a sterile tube containing 2 ml Ringer ¼ strength solution (LAB M, Bury, United Kingdom). The specimens were transported at 4° C to the laboratory within 2 h after collection and stored at 4° C overnight before examination. The sample size was defined to give a 95% probability of detecting one positive animal/carcass if the carriage/contamination rate was $\geq 2\%$ (Cannon and Roe, 1982). The pigs came from 27 different farms located in three neighbouring regions (Emilia-Romagna, Lombardia, Veneto) of northern Italy.

For *L. monocytogenes* detection a double enrichment method was employed: 10 g of faeces and 1 ml of the Ringer ¼ strength solution used as surface swabs transport medium, together with the cotton swab itself, were suspended 1:10 in 90 ml and 9 ml of *Listeria* Enrichment Broth UVM I (LEB; Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), respectively. The primary enrichment broth was incubated at 30° C for 22 ± 2 h and 0.1 ml portion of the UVM I broth was transferred into 10 ml of LEB UVM II medium (Oxoid). After incubation at 30° C for 22 ± 2 h, a 10 µl loopful of the secondary enrichment broth was streaked onto Oxford Agar (Merck, Darmstadt, Germany) plates, incubated at 37° C for 48 h. Suspect *Listeria* colonies, which are small, brown, and surrounded by black halos, were selected for confirmation. They were streaked onto Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYEA; Biokar Diagnostics, Beauvais, France) plates and incubated 24 h at 37° C to obtain well-isolated pure colonies. All cultures were tested for Gram-staining, catalase reaction, and haemolysin production. The CAMP test was performed according to ISO 11290 (1996) procedure. Gram positive, catalase positive, motile, β-haemolytic cultures were tested for biochemical properties with the API *Listeria*® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) microsubstrate system. Gram-positive, catalase positive, non-haemolytic isolates were tested for *Listeria* spp. identification. *L. monocytogenes* isolates were subjected to slide agglutination with O antiserum type 1 and O antiserum type 4 (Difco Laboratories, Detroit, USA).

Results

Only two faecal samples were contaminated by *L. monocytogenes* (1.3%). The isolates belonged to serotype O1 and O4, respectively. *L. innocua* was detected in 22 out of 150 specimens (14.7%; C.I. 95% 9.0% - 20.3%), *L. gray* in two (1.3%) and *L. seeligeri* in one (0.7%).

L. monocytogenes serotype O1 was isolated from one of 150 pork carcasses (0.7%); no other *Listeria* spp. were detected from the carcass swabs.

Discussion

This survey indicated that a very low proportion of finishing pigs (two out of 150,

i.e. 1.3%) slaughtered in two abattoirs of northern Italy were intestinal carriers of *L. monocytogenes*.

The carriage rate of *L. monocytogenes* in healthy pigs was lower than the prevalence we detected in the faecal matter of 50 slaughtered pigs (6.0%) in a 1997 survey (Bonardi *et al.*, 1997). In the present investigation, *L. monocytogenes* positive faecal samples were collected during cold months, and exactly from January to March, and those examined in 1997 and found to be contaminated by *L. monocytogenes* were collected during the winter season too. We therefore detected a higher prevalence of *L. monocytogenes* healthy carriers among finishing pigs during cold months.

In this study, the contamination rate of swine carcasses with *L. monocytogenes* was very low (0.7%). Nevertheless, *L. monocytogenes* contamination rate of pork carcasses at slaughter can be higher in abattoirs where environment and equipment contamination occurs. As demonstrated by Autio *et al.* (2000), 12% of pork carcasses were positive for *L. monocytogenes* in slaughterhouses where the mechanical saws used for brisket and back splitting were contaminated with the micro-organisms.

According to Borch *et al.* (1996), *L. monocytogenes* transmission to the pork carcasses does not occur primarily *via* the animal, but is mainly linked to the slaughterhouse environment. In fact, the bacterium has been isolated from food contact surfaces, floors and hand-wash basins at the abattoir (Luchansky and Doyle, 1991; Sammarco *et al.*, 1997), as well as from chill rooms (Graham and Collins, 1991). As *L. monocytogenes* may persist in pork processing environments, such as slaughterhouses, chilling rooms and cutting rooms, the efficiency of cleaning and disinfection procedures are of the utmost importance (Giovannacci *et al.*, 1999).

Therefore, keeping in mind that both *L. monocytogenes* and *Listeria* spp. may be useful indicators of the hygienic status of pig slaughterhouses, with no doubt the plants we selected for our investigation were characterized by high levels of hygiene.

Identification and control of the critical operations at slaughter are essential to reduce the hazard of pork carcasses contamination. Circumcising of the rectum, removal of the pluck set (tongue, larynx, trachea, lungs, heart and liver) and removal of the intestinal tract are the procedures which may give pathogenic bacteria the opportunity to spread to the pork carcass from the gut and the oral cavity (Borch *et al.*, 1996). To avoid carcass contamination after loosening of the rectum, a plastic bag to seal off the rectum should be used (Nielsen and Wegener, 1997). Another critical operation at swine slaughter is the removal of tonsils. In fact, tonsils portions not completely removed from the pharyngeal cavity can be the cause of spreading pathogenic micro-organisms from the lymphatic niche to the adjacent muscular tissue. Healthy carriers, in particular pharyngeal carriers, are very difficult to identify before slaughter and, as demonstrated by several authors, *L. monocytogenes* is often detected in the tonsils of slaughtered pigs (Buncic S., 1991; Autio *et al.*, 2000; Cantoni *et al.*, 2002).

In order to reduce healthy risks for the consumer, some preventive measures at slaughter, such as implementation of codes of good manufacturing practices (GMP), increased care during evisceration, and proper cleaning and disinfection procedures should be encouraged. Anyway, other critical points concerning *L. monocytogenes* contamination of pork meat are to be found in the processing environment of the

chilling and cutting rooms. In fact, the incidence of *L. monocytogenes* in pork cuts often increases after chilling and cutting (van den Elzen and Snijders, 1993).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Dr. Gisella Pizzin, Mrs. Ida Poli and Mrs. Giuseppina Trentadue for technical assistance and Dr. Mario D'Incau for *L. monocytogenes* isolates serotyping.

Key words: *L. monocytogenes*, *Listeria* spp., pig, slaughterhouse

Mots clés: *L. monocytogenes*, *Listeria* spp., cochon, abattoir

Parole chiave: *L. monocytogenes*, *Listeria* spp., suino, macello

SUMMARY - From December 1999 to December 2000, a total of 150 slaughtered pigs were randomly selected in two abattoirs with a capacity of 12.000 swine per week. 150 caecal material samples and 150 carcass swabs were collected and examined for *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp.

L. monocytogenes was detected in the caecal content of two (1.3%) slaughtered pigs. The strains isolated from the faeces belonged to serotype O1 and O4. *L. innocua* was isolated from 22 (14.7%) out of 150 faecal samples, *L. gray* from two (1.3%) and *L. seeligeri* from one (0.7%). From one (0.7%) carcass *L. monocytogenes* serotype O1 was isolated. No other *Listeria* spp. micro-organisms were detected on the pork carcasses.

RÉSUMÉ - Que de décembre 1999 à décembre 2000, un total de 150 cochons ont été sélectionnés casuellement dans deux abattoirs avec une capacité de 12.000 cochons par semaine. 150 échantillons des fèces et 150 tampons de la carcasse ont été examinés pour *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp.

L. monocytogenes O1 et O4 a été détecté dans les fèces de deux (1,3%) cochons. *L. innocua* a été isolée de 22 (14,7%) échantillons des fèces, *L. gray* de deux (1,3%) et *L. seeligeri* d'un (0,7%). D'une carcasse *L. monocytogenes* O1 a été isolée. Aucuns autres *Listeria* spp. micro-organismes n'ont été détectés sur les carcasses des cochons.

RIASSUNTO - Nel periodo compreso tra Dicembre 1999 e Dicembre 2000, sono stati prelevati 300 campioni da 150 suini macellati in due stabilimenti di macellazione caratterizzati da una capacità operativa di 12.000 suini alla settimana. I campioni, rappresentati da 150 campioni di materiale cecale e 150 tamponi eseguiti sulla carcassa, sono stati sottoposti ad analisi microbiologica per la presenza di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp.

L. monocytogenes è stata isolata dal materiale cecale di due suini (1,3%). I ceppi isolati dalle feci appartenevano ai sierotipi O1 e O4. *L. innocua* è stata isolata da 22 (14,7%) campioni di feci, *L. gray* da due (1,3%) e *L. seeligeri* da uno solo (0,7%). Da una carcassa (0,7%) è stata isolata *L. monocytogenes* sierotipo O1. Nessun altro microrganismo appartenente al genere *Listeria* è stato isolato dalle restanti carcasse.

This study was supported by a grant ex MURST 40% - 1999.

References

- Autio, T., Sateri, T., Fredriksson-Ahomaa, M., Rahkio, M., Lunden, J., Korkeala, H., 2000. *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. *Journal of Food Protection* **63**, 1438-1442.
- Bonardi S., Bottarelli A., Bentley S., Gorreri M., Torriani M., Maggi E., 1997. Ricerca di *Listeria* spp. in uno stabilimento di macellazione di suini pesanti (Detection of *Listeria* spp. in finishing pigs at slaughter). *Atti Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti*, **7**, 163 – 167.
- Borch, E., Nesbakken, T., Christensen, H., 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **30**, 9-25.
- Buncic S., 1991. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. *International Journal of Food Microbiology*, **12**, 173.180.
- Cannon, R.M., Roe, R.T., 1982. Livestock disease surveys. A Field Manual for Veterinarians. Bureau of Rural Science, Department of Primary Industry, Australian Government Publishing Service. Canberra, 35 p.
- Cantoni C., Arcidiacono M., Stella S., 2002. Localizzazione di *Listeria monocytogenes* in macelli per suini (Location of *L. monocytogenes* in swine slaughterhouses). *Industrie Alimentari*, **42**, 17-24.
- de Boer, E., Nouws, J.F., 1991. Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology* **2**, 375-378.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology Reviews* **55**, 476-511.
- Giovannacci I., Ragimbeau C., Queguiner S., Salvat G., Venduvre J.L., Carlier V., Ermel G., 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology*, **53**, 127-140.
- Grahan, C.G.M., Collins, J.K., 1991. Listeriosis: biology and implications for the food industry. *Trends in Food Science Technology*, April, 89-93.
- ISO 11290: 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method.
- Larpen J.P. (1995). In: Larpen J.P. (Ed.), *Les Listeria*, Lavoisier, Paris, 140.
- Luchansky, J.B., Doyle, M.P., 1991. Behaviour and control of *Listeria monocytogenes* in meats. In: ASEPT (Ed.), *Proceedings Listeria et Sécurité Alimentaire*, Laval Cedex, France.

Nielsen, B., Wegener, H.C., 1997. Public health and pork and pork products: regional perspectives of Denmark. *Revue Scientifique et Technique* **16**, 513-524.

SCVM - Scientific Committee on Veterinary Measures (2000). Opinion on food-borne zoonoses. Brussels, 12th April 2000.

Sammarco, M.L., Ripabelli, G., Ruberto, A., Iannitto, G., Grasso, G.M., 1997. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeriae*, and *Yersinia* in the slaughterhouse environment and on work surfaces, equipment, and workers. *Journal of Food Protection* **60**, 367-371.

Sorensen, L.L., Thomsen, L.K., Pedersen, J.V., Nielsen, B., 1999. Different ways of handling the bung (rectum) during pig slaughter dressing related to *Salmonella* seropositivity in slaughter pigs and the number of *Salmonella* positive meat samples. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in pork. August 5-7 1999, Washington DC USA. University of Illinois, 287-288.

van den Elzen A.M., Snijders J.M., 1993. Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Quarterly*, **15**, 143-145.

ANAGRAFE EQUINA

Signorini G.¹, Biagi G.², Nannipieri S.³

Introduzione

Il settore equino è uno dei più problematici per il Servizio Veterinario Nazionale perché il cavallo ha, da sempre nell'animo di alcuni, e recentemente anche dal punto di vista legislativo, una duplice veste: quella di animale da lavoro e da reddito e quella di animale da affezione.

La mancanza di obbligo di identificazione individuale incontrovertibile (a parte per quegli animali facenti parte di organi come la FISE, l'UNIRE o altri), fino al 1994, l'assenza di controllo sanitario a partire dallo stesso anno, per l'abolizione del test di Coggins obbligatorio per l'anemia infettiva, l'assenza di controllo sulla movimentazione sia degli animali da vita che da macello con frequenti cambi di proprietà, associate ad un'estrema mobilità degli equidi sul territorio e ad una vita, anche commerciale, estremamente lunga, hanno originato problemi di difficile soluzione.

Considerata quindi la particolarità del mondo del cavallo sembra inevitabile, se si vuole riportarlo sotto controllo almeno dal punto di vista sanitario, e garantire il consumatore dalla presenza di residui di trattamenti farmacologici nelle carni, istituire un'anagrafe equina.

Con questo termine ci si vuol riferire non a qualcosa di analogo all'anagrafe zootecnica, istituita a suo tempo per il bovino, ma piuttosto ad una struttura simile a quella dell'anagrafe canina, già operante da molti anni nella quasi totalità delle regioni italiane. Parliamo pertanto di una norma a carattere regionale, base essenziale per la costituzione di una banca dati che potrà poi, in futuro, essere riversata in un contenitore nazionale, implementato con i dati di tutte le regioni italiane.

Riteniamo infatti che molte siano le analogie fra cavallo e cane: entrambi possono essere animali da lavoro e da affezione; entrambi hanno una durata di vita molto più lunga rispetto alla vita (produttiva) degli altri animali per i quali è obbligatoria una identificazione; entrambi si spostano frequentemente al seguito dei proprietari; entrambi possono cambiare spesso proprietario. La differenza fondamentale che complica, e non poco, la vita ai servizi veterinari, è che il cavallo è una specie edibile, al contrario del cane: acquistano quindi estrema rilevanza gli eventuali trattamenti farmacologici fatti all'animale in quanto possono lasciare nelle carni residui che potrebbero finire sulle tavole dei consumatori.

¹ Scuola di Specializzazione in "Diritto e Legislazione Veterinaria" – Università Studi Parma

² Dipartimento di Clinica Veterinaria – Università Studi Pisa

³ Veterinario Dirigente – ASL Livorno

Nel settore equino quindi, unico fra tutti quelli di interesse veterinario, si possono identificare tre tipologie di animali:

- **Cavalli come animali da compagnia:** si tratta di animali che, o per un loro valore intrinseco o per motivi affettivi dei proprietari, non andranno mai al macello. Ai fini della registrazione e dell'effettuazione dei trattamenti farmacologici sono, a tutti gli effetti, equiparabili alle altre specie di animali d'affezione;
- **Cavalli come animali da carne:** sono quegli equidi allevati specificamente per la produzione di carne; sono di razze particolari e, di solito, provengono da paesi esteri e vengono importati in Italia appositamente per essere macellati. Sono soggetti a tutti gli obblighi di registrazione dei trattamenti farmacologici previsti per le altre specie animali in produzione.
- **Cavalli ad uso sportivo:** sono la categoria più vasta; di razze diverse: possono essere collocati in una delle due precedenti categorie a seconda delle decisioni del proprietario, dello stato di salute, dell'età e in base ad altri, e svariati motivi. Dal punto di vista del veterinario ufficiale è questa la categoria più pericolosa, in quanto gli animali arrivano alla macellazione generalmente dopo svariati trattamenti farmacologici, dei quali si può perdere la traccia durante i frequenti passaggi di proprietà.

In base a tutte queste considerazioni, riteniamo che l'istituzione di un'anagrafe equina sia l'unico sistema per poter tracciare gli animali e garantire i consumatori. In questa sede ci proponiamo di individuare più nel dettaglio, anche se sempre a grandi linee, quali potrebbero essere gli elementi base costitutivi di un sistema di tracciabilità degli equidi.

“Linee guida di tracciabilità degli equidi”

Prima di procedere, riportiamo nella Tabella n. 1 alcune definizioni alle quali faremo riferimento nel corso della nostra esposizione.

Tabella n. 1 - Definizioni utilizzate

Termine	Definizione
1. azienda	qualsiasi luogo, anche all'aria aperta, dove siano tenuti o allevati, anche temporaneamente, equidi, indipendentemente dal loro impiego
2. equidi	animali domestici o selvatici della specie equina, ivi comprese le zebre, o asinina nonché gli animali derivati dall'incrocio di tali specie
3. equide registrato	Qualsiasi equide registrato conformemente alla legge n° 30, 15 gennaio 1991
4. equide da macello	gli equidi destinati ad essere condotti al macello direttamente o tramite un mercato o un centro di raccolta riconosciuti
5. equide da allevamento o da reddito	equidi facenti parte di categorie diverse da quelle menzionate ai punti 3 e 4

1. Tipologia e finalità del provvedimento

Riteniamo che la norma ideale dovrebbe avere una portata nazionale, applicabile sull'intero territorio italiano; pensiamo comunque che sia accettabile anche un provvedimento a carattere regionale, in quanto in grado di garantire un'omogeneità di trattamento per tutti gli equidi presenti nella regione che ha legiferato in proposito.

Nella nostra trattazione faremo riferimento alla Regione Toscana che dal 1995 con il censimento obbligatorio ha preso in considerazione il problema ed ha dettato delle norme da seguire da parte del Servizio Veterinario operante sul suo territorio.

Poiché la normativa nazionale e comunitaria lascia grandi spazi all'interpretazione, le singole ASL della Toscana si sono mosse in modo autonomo, con tempi e modi diversi e differenze di applicazione ancora maggiori si riscontrano uscendo dai confini regionali. Pertanto, un'unica normativa applicabile almeno in ambito della Regione Toscana può avere come primo risultato quello, tutt'altro che trascurabile, di uniformare le modalità di applicazione della normativa vigente in materia di equidi sull'intero territorio regionale, oltre a favorire l'adozione di provvedimenti a livello nazionale.

2. Censimento degli equidi

In base al Decreto n. 186/95 del Presidente della Giunta Regionale Toscana tutti gli equidi, quindi anche muli e asini oltre ai cavalli, esistenti sul territorio della Toscana devono essere censiti. Inoltre, con l'entrata in vigore del Decreto Legislativo (D. Lgs.) n. 336/99 tutte le aziende dove vengono detenuti o allevati equidi devono essere registrate presso la ASL competente per territorio. Entrambi questi obblighi, se violati, prevedono sanzioni amministrative, anche estremamente onerose specie nel caso della mancata registrazione ai sensi del D. Lgs. n. 366/99. Quindi esiste l'obbligo, per il proprietario e per il detentore, di provvedere al censimento degli equidi allevati o detenuti.

3. Registrazione delle aziende

Per evidenti ragioni epidemiologiche le aziende dove si allevano o detengono equidi, ancorché tutti i soggetti siano stati classificati da compagnia, devono essere registrate ai sensi del D. Lgs. n. 336/99 per consentire la realizzazione di un sistema informativo geografico.

Una nota regionale invita ad utilizzare per l'attribuzione del codice di registrazione delle aziende gli stessi criteri previsti dal Decreto del Presidente della Repubblica (DPR) n. 317/96, e precisamente:

- ultimi tre numeri del codice ISTAT che individua il comune ove è dislocata l'azienda di detenzione o allevamento del soggetto all'atto della prima identificazione da parte della ASL;
- sigla della provincia;
- numero progressivo.

Risulta evidente la possibilità di poter confondere, anche all'interno di un database informatico, le aziende di allevamento/detenzione di equidi (fra le quali ricordiamo devono essere compresi anche gli ippodromi) con le aziende di allevamento di bovini, suini ed ovicaprini, disciplinate dal DPR n. 317/96. Sarebbe quindi auspicabile provvedere a distinguere, anche visivamente, le aziende che allevano o detengono esclusivamente equidi dalle altre, per esempio aggiungendo una "E" al numero progressivo finale, o adottando altri sistemi analoghi.

4. Modalità di identificazione degli equidi

Premesso che tutti gli equidi presenti sul territorio regionale toscano, a qualun-

que categoria appartengano, devono essere chiaramente identificati, ricordiamo che al momento l'unico obbligo di legge è quanto riportato nell'allegato E del DPR n. 243/94, integrato da quanto stabilito dalla Decisione CE 2000/68: tali norme prevedono l'identificazione tramite redazione dello stato segnaletico del soggetto, il cosiddetto "pupazzo".

Molte associazioni, italiane ed estere, applicano anche un microchip: anche noi riteniamo che sarebbe auspicabile che tutti gli equidi fossero indistintamente identificati anche con l'apposizione di un microchip che dovrebbe essere applicato, almeno in tutta la Regione Toscana, nella stessa sede anatomica (per esempio il lato sinistro del collo) al fine di facilitarne il reperimento, e dovrebbe essere a norma ISO per consentirne la lettura per mezzo di tutti i lettori.

Nel caso di certe razze equine, quali ad esempio gli Appaloosa americani, la ste-sura dello stato segnaletico potrebbe essere sostituita, od integrata, da documentazione fotografica composta da un minimo di quattro foto, raffiguranti l'animale da ciascuno lato, ed una foto frontale che evidenzia chiaramente i particolari della testa, tutte timbrate e siglate dal veterinario ufficiale. Il documento d'identificazione dell'equide deve riportare, quando presente, il numero di serie del microchip impiantato.

Il codice del microchip costituisce il numero di identificazione del singolo soggetto e deve perciò essere univoco, irripetibile ed accompagnare l'animale durante tutta la sua vita. Per gli animali già muniti di microchip si potrebbe accettare il relativo codice previa lettura dello stesso mediante apparecchio in grado di evidenziare tutti i microchip prodotti a norma ISO. In assenza di traccia del microchip o in caso di difformità del codice dello stesso da quello indicato sul libretto, l'equide si dovrebbe intendere non identificato.

Gli oneri per l'identificazione degli animali, comunque essa venga compiuta, sono a carico del proprietario/detentore che richiede la prestazione all'ASL competente per territorio e dovranno essere chiaramente stabiliti, nei vari casi, dal tariffario regionale.

5. Libretto individuale d'identificazione (passaporto)

- A) Gli equidi registrati dovranno essere provvisti di documento d'identificazione individuale (passaporto) conforme a quanto previsto dalla Decisione 93/623/CE completo di Capitolo IX debitamente compilato, come previsto dalla Decisione 2000/68CE, art. 3.
- B) Gli equidi da macello devono essere censiti, identificati ma non è obbligatorio che siano scortati da documento d'identificazione conforme alle Decisioni 93/623/CE e 2000/68/CE: tuttavia sarebbe auspicabile che fossero accompagnati da un documento d'identificazione semplificato, provvisto comunque di pupazetto.
- C) Gli equidi da allevamento o da reddito dovranno essere provvisti di documento di identificazione individuale (passaporto) conforme a quanto previsto dalla Decisione 93/623/CE, completo di Capitolo IX debitamente compilato, come previsto dalla Decisione 2000/68/CE, art. 3. Il numero d'identificazione del documento d'identità costituisce il numero d'identificazione a vita dell'animale; viene attribuito dall'Unità Funzionale (UF) di Sanità Pubblica Veterinaria (SPV) della ASL competente per territorio all'atto della prima identificazione e coinciderebbe con il numero di registrazione regionale di anagrafe equina. Nel caso in cui l'animale

sia già scortato da documento di identificazione rilasciato da altri enti o amministrazioni riconosciute per questa funzione dallo Stato, viene aggiunto, sempre a cura della UF di SPV, alle codifiche preesistenti.

Il codice di riconoscimento è determinato dalle seguenti indicazioni:

- ❑ ultimi tre numeri (meglio due per non confonderlo con il codice previsto dal DPR n. 317/96) del codice ISTAT che individua il comune ove è dislocata l'azienda di detenzione o allevamento del soggetto all'atto della prima identificazione da parte della ASL;
- ❑ Sigla della provincia;
- ❑ Numero progressivo generale o, meglio, per comune, composto da quattro cifre (es. 14LI0223).

Poiché in questi casi il numero di identificazione a vita dell'animale (art. 2, Decisione 2000/68/CE) è costituito dal numero di identificazione dato all'equide dal registro di razza, l'UF di SPV competente per territorio potrà dare solo un numero di registrazione regionale accompagnato dal numero del trasponder/microchip (già presente o messo in tale occasione dal veterinario ufficiale) e dovrà riservarsi di prendere atto del numero di identificazione che l'equide riporta o riporterà; infatti, temporalmente, vi potrà essere discrepanza visti i lunghi tempi di attesa dell'allevatore per la fornitura della documentazione da parte degli Enti interessati.

Qualsiasi tipo di documento d'identificazione deve riportare il numero di trasponder applicato all'equide.

6. Compilazione Capitolo IX

Il proprietario degli equidi di cui al punto precedente, lettera A) (provvisi di pasaporto), al momento del rilascio del documento individuale d'identificazione, o se registrato della convalida del documento già fornito dall'autorità competente, deve indicare la classificazione del soggetto secondo quanto previsto dalla Decisione 2000/68/CE, compilando il Capitolo IX che deve essere aggiunto al documento individuale d'identificazione, qualora questo ne fosse sprovvisto.

La classificazione scelta dal proprietario deve essere effettuata alla presenza del veterinario ufficiale della ASL competente, che ha il compito di convalidare la scelta del proprietario.

Il proprietario che decide di destinare l'equide come animale da compagnia dovrà compilare la parte II del Capitolo IX e dovrà essere informato che questa classificazione comporta la definitiva esclusione delle carni dell'animale dal circuito alimentare e, alla morte del soggetto, le spoglie dovranno essere smaltite conformemente alla normativa vigente; non solo, per questo soggetto non sarà possibile, se sarà oggetto di compravendita, procedere a riclassificazione, potendo, e dovendo, gli eventuali futuri proprietari soltanto confermare lo stato di animale da compagnia. Questo perché le modalità di prescrizione e registrazione dei trattamenti con medicinali veterinari per gli equidi ufficialmente identificati e marcati elettronicamente, dichiarati animali da compagnia, sono analoghe a quelle previste per le altre specie di animali non produttori di alimenti per l'uomo: pertanto, dal momento in cui la scelta viene ufficializzata, potranno essere trattati anche con sostanze comprese nell'allegato IV del Regolamento n. 2377/90/CE senza neanche avere l'obbligo di registrare il trattamento.

Nel caso in cui il proprietario decida di destinare l'equide come animale da reddito dovrà compilare la parte III-A del Capitolo IX. Il proprietario dell'animale deve essere informato che questa classificazione comporta la possibilità di destinare le carni dell'equide al circuito alimentare e può essere modificata e trasformata in equide da compagnia sempre e soltanto previa convalida del veterinario ufficiale, che dovrà comunicare tale modifica anche all'azienda che ha rilasciato il Capitolo IX. Le modalità di prescrizione e registrazione dei trattamenti con medicinali veterinari per gli equidi ufficialmente identificati e marcati elettronicamente, dichiarati animali da reddito, sono analoghe a quelle previste per le altre specie di animali produttori di alimenti per l'uomo, ad eccezione del fatto che questi equidi possono essere trattati anche con sostanze diverse da quelle elencate negli Allegati I, II, e III del Regolamento n. 2377/90/CE, escluso quelle elencate nell'Allegato IV, annotando obbligatoriamente il trattamento eseguito sulla parte III-B del Capitolo IX; a seguito di tali trattamenti l'animale dovrà obbligatoriamente attendere un periodo di almeno sei mesi prima di poter essere macellato.

Gli equidi provvisti di documento d'identificazione antecedente la Decisione n. 2000/68/CE e pertanto privi di Capitolo IX, gli equidi con Capitolo IX non compilato in tutte le sue parti, e gli equidi non ancora provvisti di documento d'identificazione devono essere considerati animali produttori di alimenti per l'uomo per i quali non è prevista nessuna deroga per i trattamenti. Sono inoltre soggetti all'obbligo di registrazione dei trattamenti sul registro dei trattamenti previsto dal D.Lgs. n. 336/99.

7. Introduzione di equidi nel territorio regionale

Gli equidi introdotti in Regione Toscana devono essere già identificati con documento individuale e saranno sottoposti a verifica della rispondenza dello stato segnalatico e marcati elettronicamente nei trenta giorni successivi all'avvenuta introduzione.

Trascorso un periodo transitorio dalla entrata in vigore della norma, di durata da stabilire, non saranno ammessi a macellazione con destinazione delle carni a libero consumo equidi identificati da meno di 180 giorni o privi di transponder.

8. Identificazione dei puledri

I proprietari di fattrici sono obbligati a provvedere alla identificazione dei puledri, anche se ancora non sono stati stabiliti dei termini entro cui deve essere effettuata l'identificazione, forse per il fatto che molte associazioni di razza hanno tempi piuttosto lunghi per il rilascio dei passaporti, tanto che addirittura si può arrivare fino a due anni. Il problema della mancanza del passaporto, e quindi la mancata compilazione del Capitolo IX, non è da sottovalutare: senza una destinazione d'uso dell'animale, questo non può essere trattato con alcuni farmaci e, comunque, possono restare oscure le modalità dell'eventuale registrazione dei trattamenti eseguiti. Un metodo per dirimere la questione potrebbe essere quello di applicare il transponder al puledro e provvedere al rilascio di un passaporto semplificato (il "pupazzo" accompagnato dal Capitolo XI compilato); tale documento dovrà poi essere sostituito dal passaporto definitivo rilasciato dall'associazione di appartenenza sul quale sarà riportata la destinazione d'uso scelta e controfirmata dal proprietario. Il passaporto provvisorio dovrebbe essere ritirato dalla ASL ed annullato.

9. Variazioni anagrafiche

Nessuna forma di anagrafe può esistere senza la registrazione delle variazioni.

Il Decreto del Presidente della Giunta Regionale toscana n. 186 de 28 aprile 1995 stabilisce l'obbligo per proprietari o detentori di equidi, oltre che del censimento, anche della comunicazione, entro 48 ore, dell'arrivo degli animali in azienda. Fanno eccezione gli ippodromi per i quali, vista l'elevata movimentazione, viene stabilito un termine di quindici giorni per la comunicazione della presenza di equidi nella struttura.

Con l'istituzione dell'anagrafe equina tali termini potrebbero essere unificati: colui che ha in carico l'animale dovrebbe dare comunicazione di qualsiasi variazione in entrata o in uscita, per esempio entro trenta giorni dall'avvenuta variazione, fornendo tutti i riferimenti necessari.

Costituzione dell'Anagrafe Equina

Le ASL dovrebbero provvedere a costituire l'anagrafe degli equidi identificati, usufruendo di un insieme di informazioni come quello riportato nella Tabella n. 2.

Tabella n. 2 – Informazioni necessarie per costituire l'anagrafe equina

CODICE ATTRIBUITO ALL'EQUIDE	Codice di registrazione regionale dell'anagrafe equina: è quello riportato sul passaporto
CODICE TRANSPONDER	Segue l'animale per tutta la vita
CODICE DI ALTRA ASSOCIAZIONE RICONOSCIUTA	Facoltativo; lo si riporta solo se presente
CODICE DI AZIENDA DETENZIONE/ALLEVAMENTO	Stabilito in base a quanto stabilito dal DPR n. 317/96
DATA DI CONVALIDA DELL'IDENTIFICAZIONE	Data della prima identificazione ufficiale o della convalida dopo l'introduzione in regione
CLASSIFICAZIONE	DA VITA DA REDDITO
VARIAZIONI	Tutte le variazioni, di azienda o di proprietario, dell'animale
ASL TRASFERIMENTO	In caso di trasferimento ad altra ASL dovrà esserne data comunicazione ufficiale, riportando la destinazione d'uso del soggetto

I data base di ogni ASL dovrebbero essere collegati in rete ad un nodo regionale in modo da favorire lo scambio di informazioni.

Norme transitorie

Vista la situazione del settore equino, si ritiene necessario stabilire un congruo periodo di regime transitorio (che potrebbe essere quantificato in un anno dall'entrata in vigore del provvedimento) per dare modo ai proprietari e/o detentori di equidi, alle ASL ed anche alle associazioni di razza di organizzarsi per provvedere alla identificazione degli animali. In questo periodo dovrebbe essere possibile avviare a macellazione gli equidi, anche se privi del trasponder, purché scortati da Modello 4 e da libretto di identificazione completo di Capitolo IX.

Nel caso di soggetti introdotti nel territorio della Regione Toscana da meno di 180 giorni dal momento della identificazione e della compilazione del Capitolo IX riportante la classificazione "animale da reddito" o per gli equidi introdotti nel terri-

torio della Regione Toscana da più di 180 giorni per i quali l'identificazione e/o la redazione del Capitolo IX con classificazione quale animale da reddito è avvenuta da meno di 180 giorni dal momento del loro invio a macellazione, sarà necessario produrre una ulteriore documentazione di scorta, costituita da copia del registro dei trattamenti delle aziende in cui i soggetti sono stati allevati/detenuti/transitati, tale da consentire la ricostruzione della storia farmacologica dei soggetti per un periodo pari ad almeno 180 giorni. Per soggetti privi di tale documentazione, comunque macellati, dovranno essere eseguite le necessarie indagini, sia macroscopiche che di laboratorio, che dovranno essere a carico del proprietario degli animali, per valutare l'opportunità di licenziare al libero consumo le loro carni.

Conclusioni

Come si può desumere dalla sia pure non completa disamina dell'argomento, la necessità di un'anagrafe equina si fa sempre più pressante. Rimane infatti difficile comprendere come in una società come la nostra, attenta a tutelare e garantire i consumatori da una parte, ed a tutelare la protezione ed il benessere degli animali dall'altra, resti senza soluzione il problema del settore equino, che riassume in sé le diverse problematiche degli animali da affezione e di quelli da reddito.

La duplice veste del cavallo, profondamente legato all'uomo da tempo immemorabile sia come animale da lavoro che come animale da affezione, secondo in questo soltanto al cane, pone al legislatore, ed ai servizi veterinari intesi come organi tecnici consultivi, una grossa sfida, che dovrà essere raccolta e vinta al più presto nell'interesse di tutti; si eviteranno così pericolosi adeguamenti ad altre realtà, lontani dalle esigenze del nostro territorio e della nostra economia.

RIASSUNTO - Considerata la particolarità del mondo del cavallo che ha una duplice veste, quella di animale da lavoro e da reddito e quella di animale da affezione, sembra inevitabile, se si vuole riportarlo sotto controllo dal punto di vista sanitario, e garantire il consumatore dalla presenza di residui di trattamenti farmacologici nelle carni, istituire un'anagrafe equina. Gli Autori pertanto prendono in considerazione quelle che potrebbero diventare le "Linee guida di tracciabilità degli equidi" soffermandosi innanzi tutto sulla tipologia e le finalità del provvedimento che deve essere emanato e ritengono che la norma ideale sarebbe a carattere nazionale, da applicare sull'intero territorio italiano anche se comunque e accettabile anche un provvedimento a carattere regionale, in quanto in grado di garantire un'omogeneità di trattamento per tutti gli equidi presenti nella regione che ha legiferato in proposito. Tra le linee guida esaminano i problemi riguardanti il censimento degli equidi, la registrazione delle aziende, le modalità di identificazione degli equidi, il libretto individuale d'identificazione o passaporto, la compilazione del Capitolo IX, l'introduzione di equidi nel territorio regionale, l'identificazione dei puledri e le variazioni anagrafiche.

SUMMARY - The Italian Rule consider the horse either a pet and an animal for meat production. Of course pet and productive animals must be differently considered in respective to pharmacological treatments, since pharmacological treatments must be

monitored to avoid residues in the meat of productive animals. For this reason in Italy the chronicle of each horse must be known and, consequently, the institution of a census horse-book must be performed. The “ directives on horse traceability ” should be ruled at the national level to reach a control homogeneity all over the Italian land, even if regional parliaments can rule on the matter. In particular the Authors examine the technical aspects regarding the census, the passport which must follow each animal, the introduction of new horses within the regional lands, the identifications of the colts, and the variation of addresses.

Legislazione di riferimento

Chiarimento del Ministero della Sanità alla Decisione 2000/68/CE del 04/10/2000

Circolare della Regione Toscana n. 1 del 07/06/99

Decisione della Commissione 2000/68 CE

Decisione della Commissione 93/633 CEE

Decreto del Ministero della Sanità n. 306 del 16/05/2001

Decreto del Presidente della Giunta Regionale n. 186 del 28/04/95

Decreto Legislativo n. 336 del 04/08/1999

Decreto Legislativo n. 119 del 27/01/92

Decreto Presidente della Repubblica n. 243 del 11/02/1994

Legge n. 30 del 15/01/91

Regolamento 2377/90 CEE e successive modifiche e integrazioni

Il lavoro spetta in parti uguali agli autori

RUOLO DI *CLOSTRIDIUM* SPP. IN ALTERAZIONI DEL PARMIGIANO REGGIANO RICONDUCEBILI A GONFIORE TARDIVO

Bacci C.*, Paris A.*, Brindani F.*

Introduzione

Il Parmigiano Reggiano è un prodotto a base di latte crudo, sottoposto a lunga stagionatura, ciò lo espone maggiormente a difetti non facilmente eliminabili. L'alterazione che, più frequentemente, colpisce le produzioni casearie è conosciuta come gonfiore tardivo e consiste in una disorganizzazione della pasta che presenta occhiate, fessurazioni, sfogliature e aperture a carattere cavernoso nella parte centrale della forma e, talora, una consistenza spugnosa. Tali difetti se marcati possono compromettere la struttura del prodotto ed essere accompagnati da sapori ed odori sgradevoli, dovuti alla produzione di acido butirrico ed aldeide acetica. La fermentazione butirrica, che si verifica in differenti tipi di formaggi a pasta dura o semi-dura come Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Provolone, Emmentaler, Asiago, Montasio e Fontina dequalifica notevolmente la qualità ed il valore commerciale del prodotto (2, 15, 18, 19, 20, 21). Il gonfiore tardivo inizia, qualche settimana o mese dopo la produzione del formaggio, durante la stagionatura, cioè quando le condizioni fisico-chimiche della pasta diventano ottimali per lo sviluppo dei clostridi, i principali agenti eziologici responsabili di questa alterazione. I clostridi che interessano le produzioni casearie sono ascrivibili al gruppo dei butirrici, ulteriormente suddivisibile in due sottogruppi fisiologici: i saccarolitici (*Clostridium tyrobutyricum* e *Cl. butyricum*) con spiccata capacità fermentativa degli zuccheri e degli acidi organici e i proteolitici (*Cl. sporogenes* e *Cl. bifermens*) che provocano la liberazione di aminoacidi, sui quali esercitano azioni di deaminazione, decarbossilazione, ossidazione e riduzione (4, 7, 10, 13, 14).

La comparsa del gonfiore tardivo è legata al numero di spore, in particolare di *Cl. tyrobutyricum*, inizialmente presenti nel latte. La soglia critica di questo valore si attesta ad un livello superiore a 200 spore/l. La presenza di questa microflora è una conseguenza dell'inquinamento ambientale, della qualità degli insilati e delle cattive pratiche di mungitura. La germinazione delle spore e, conseguentemente, l'insorgenza del difetto è favorita da acidificazioni lente accompagnate da un innalzamento graduale del potenziale redox, anche se il loro numero iniziale risulta inferiore alla soglia critica (1, 5, 16, 22, 24).

Altre forme di gonfiore tardivo sono dovute a *Cl. sporogenes*. Tale microrganismo proteolitico provoca nella pasta la formazione di zone biancastre centrali ed

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

estese, associate ad odore nauseabondo, compromettendo l'impiego del prodotto. I clostridi butirrici possono generare anche gonfiore precoce prima della salatura; tale difetto si può riscontrare nei formaggi Grana, soprattutto nel periodo estivo. Le condizioni chimico-fisiche che presenta il formaggio fresco, favoriscono il rapido sviluppo di *Cl. butyricum*, che genera cavità spugnose marcate e localizzate irregolarmente nella pasta del formaggio. In letteratura, sporadicamente, anche *Cl. perfringens* viene segnalato come responsabile del gonfiore precoce (3, 23).

La gravità del difetto dipende, oltre che dal grado della fermentazione butirrica, anche dalle modalità di lavorazione dei formaggi. Se non presentano gravi alterazioni organolettiche i formaggi possono essere utilizzati per la produzione di grattugiato o porzionato, in caso contrario devono essere esclusi dall'alimentazione umana (1).

In questa ricerca ci si è proposti di stimare il contenuto di clostridi butirrici in campioni di Parmigiano Reggiano, che presenta difetti riconducibili a gonfiore tardivo, al fine di identificare, mediante saggi fisiologici e fermentativi, le specie microbiche coinvolte nel processo alterativo. Si è reso inoltre indispensabile determinare la quantità di acido butirrico e propionico presenti nella pasta, per risalire alla specie microbica maggiormente responsabile del difetto mediante il rapporto calcolato tra i due acidi (7, 12).

Materiali e metodi

Campionamento

Sono stati analizzati complessivamente 15 campioni di formaggio con alterazioni, riconducibili a gonfiore tardivo, forniti dal laboratorio di tecnologia applicata del Consorzio di Tutela del formaggio Parmigiano Reggiano e provenienti da caseifici situati nel comprensorio dello stesso.

Sono stati omogeneizzati 10 g di formaggio con 90 g di sodio citrato al 2% e allestite le opportune diluizioni (10^{-2} , 10^{-3}).

Tecnica Most Probable Number (MPN)

La stima del contenuto di clostridi butirrici è stata effettuata, attenendosi alla procedura proposta da Weinzirl, mediante la tecnica Most Probable Number (MPN). In questa indagine è stato adottato lo schema a 5 x 3 e il numero più probabile di spore è stato valutato impiegando le tabelle di Mc Crady. Come substrato è stato utilizzato Reinforced Clostridial Media (RCM, Oxoid) addizionato di sodio lattato (RCM-lattato). Le provette, inoculate e sigillate con miscela paraffina-vaselina, per garantire l'anaerobiosi, sono state incubate a 37°C per 7 giorni (19).

Tecnica membrane filtranti

La conta delle spore di *Clostridium* spp. è stata, inoltre, eseguita impiegando la tecnica delle membrane filtranti. A tal fine per facilitare la filtrazione è stata effettuata una incubazione a 55°C per 15 minuti di una miscela composta da omogenato, Triton x - 100 1% e tripsina (1% in tampone Tris idrossimetileaminometano - HCl 0,1

M a pH 7,8). La miscela, dopo filtrazione con membrana (0,8 μm), è stata deposta su Reinforced Clostridial Agar (RCA, Oxoid) addizionato di cicloserina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e di fucsina acida (1 g/l). Le piastre sono state incubate, in anaerobiosi, a 37°C per 48 ore (19).

Identificazione di *Clostridium* spp.

Per l'identificazione delle specie isolate da RCM – lattato sono stati impiegati test di conferma basati sulle diverse caratteristiche fisiologiche e fermentative.

Il test per la conferma di *Cl. tyrobutyricum* è stato eseguito inoculando la brodocoltura su terreno colturale L.A.T.A. (Lattato Acetato Tioglicolato Ammonio), proposto da Fryer e Halligan e incubando a 37° per 7 giorni (4, 19).

Relativamente a *Cl. butyricum* si sono impiegati un terreno a base di latte e cisteina e un brodo contenente amido; questi substrati permettono l'identificazione della specie che, nell'ambito del genere, è l'unica in grado di fermentare lattosio e amido.

La conferma di *Cl. bifermentans* è stata eseguita utilizzando un terreno colturale che evidenzia la capacità metabolica di produrre indolo (5, 6, 8, 9, 17). Il substrato è stato inoculato con la brodocoltura RCM lattato positiva e incubato a 37°C per 24 - 48 ore.

Il test per la conferma di *Cl. sporogenes* è stato condotto su Shahidi Ferguson Perfringens (SFP) addizionato di giallo d'uovo, utile per differenziare le specie lipasiche (lecitinasiche) che formano colonie nere con aloni opachi. Di queste colonie, successivamente, è stato saggiato il potere proteolitico su un terreno a base di latte e cisteina. La specie in questione determina proteolisi con formazione di un coagulo ma senza produzione di gas (5, 6, 8, 17, 19).

La ricerca di *Cl. perfringens* è stata eseguita su terreno SFP al quale si aggiungono il giallo d'uovo e gli agenti selettivi kanamicina C (0,012 g/l) e polimixina B (30.000 U.I./l) (19). Le colonie nere cresciute, con (lecitinasi +) o senza (lecitinasi-) alone opaco, sono state confermate mediante trapianto in brodo fortemente riducente (Cooked Meat Medium) e incubate a 37 °C per 24 ore, in aerobiosi, a causa del bassissimo potenziale redox del mezzo (19). Le brodoculture risultate positive sono state sottoposte alle ulteriori prove di conferma: fermentazione del latte, Camp Test Reverse, motilità e catalasi. Il primo test è stato condotto su Iron Milk Medium, il Camp Test Reverse è stato eseguito su piastre di agar sangue incubate a 37 °C per 24 ore mentre il Terreno Motilità Nitrati è stato utilizzato per valutare la motilità della specie. In assenza di motilità, è stata verificata la capacità di ridurre i nitrati a nitriti (reattivi di Griess).

Risultati

I quantitativi di spore di clostridi butirrici riscontrati, con la tecnica MPN, nei campioni di Parmigiano Reggiano alterato, oscillano da un minimo di $4,5 \times 10^3$ a un massimo di $7,9 \times 10^4$ spore/Kg. I valori ottenuti mediante l'applicazione della tecnica delle membrane filtranti variano da 1×10^4 a $1,8 \times 10^5$ spore/Kg (figure nn. 1, 2, 3).

L'identificazione delle specie presenti, effettuata mediante saggi fisiologici e fermentativi, ha evidenziato che in 7 campioni (46,70%) su 15 è stata isolata solamen-

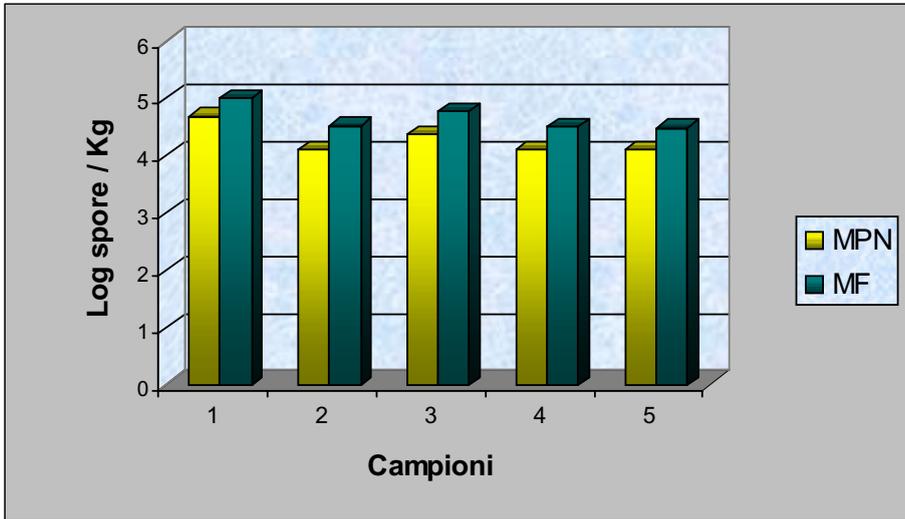


Figura n. 1: Spore di clostridi butirrici presenti nei campioni (1- 5) di Parmigiano Reggiano alterato.

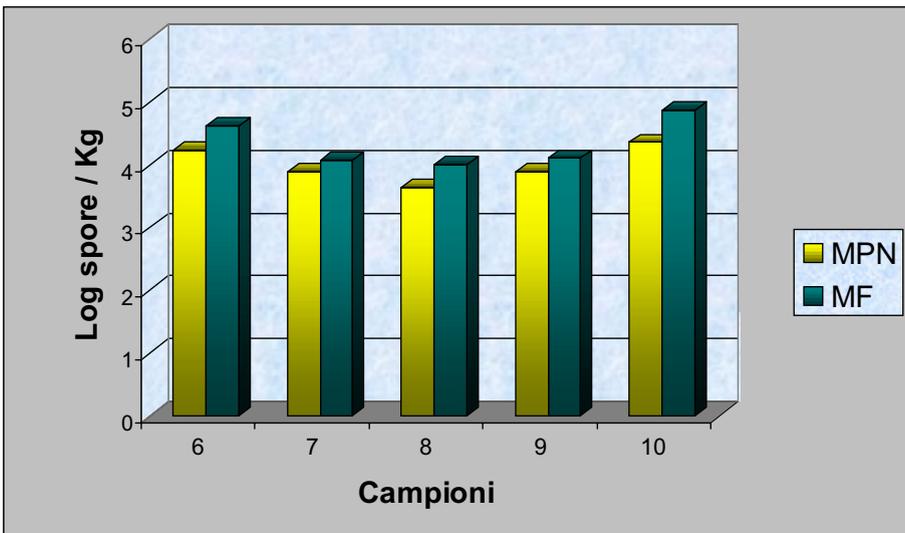


Figura n. 2: Spore di clostridi butirrici presenti nei campioni (6-10) di Parmigiano Reggiano alterato.

te una specie (*Cl. tyrobutyricum*), in 5 campioni (33,30%) due specie e in soli 3 campioni (20%) sono state identificate, contemporaneamente, 3 specie differenti di clostridi butirrici (figura n. 4). Nella figura n. 5 viene riportata, in percentuale, la presenza delle varie specie di clostridi (*Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. bifermentas*, *Cl. perfringens*) ricercati nei campioni di formaggio alterato.

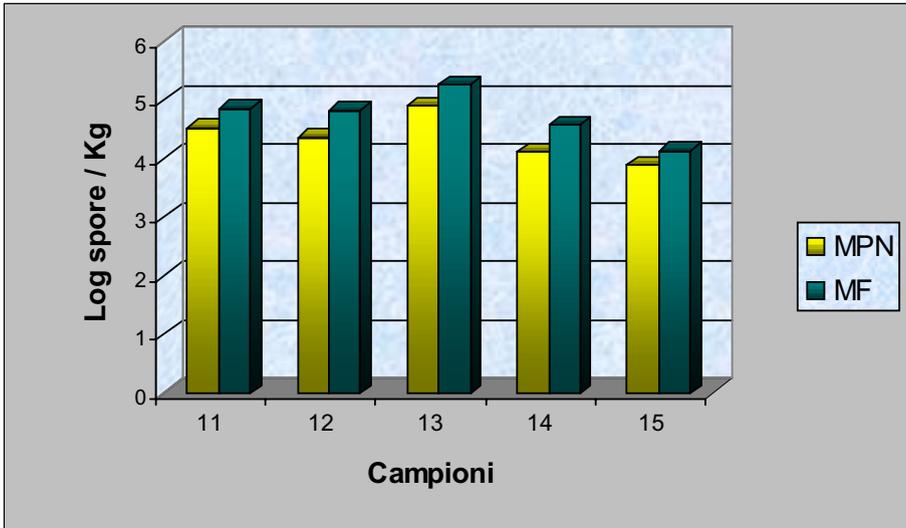


Figura n. 3: Spore di clostridi butirrici presenti nei campioni (11-15) di Parmigiano Reggiano alterato.

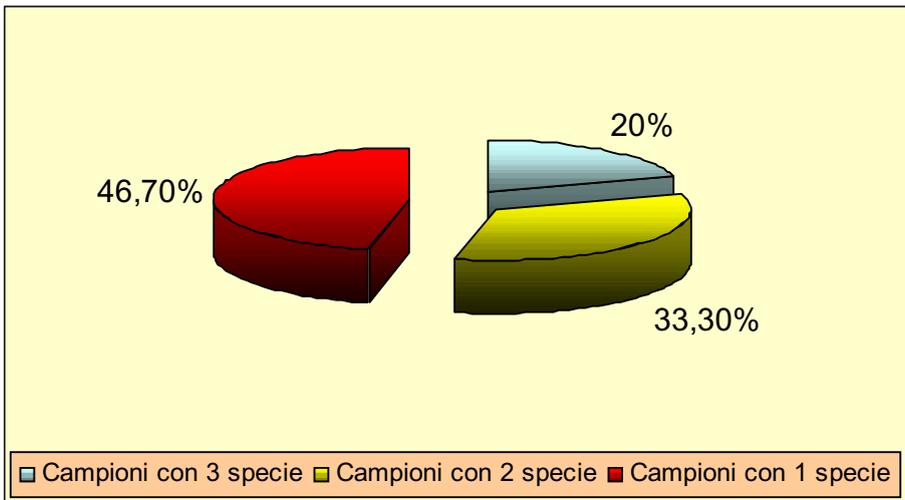


Figura n. 4: Percentuale di campioni risultati contaminati rispettivamente da una, due o tre differenti specie di clostridi.

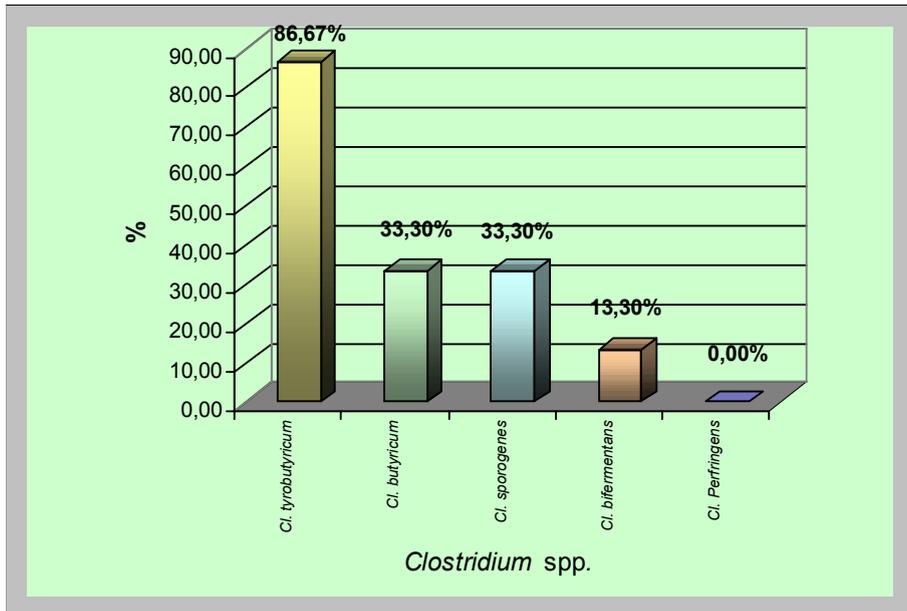


Figura n. 5 : Percentuale delle varie specie di clostridi rinvenute nei campioni di formaggio alterato.

I risultati relativi alla determinazione degli acidi propionico e butirrico (mg/100 g) sono riportati nella tabella n. 1. Tali valori sono stati ottenuti eseguendo i prelievi in due diversi punti della forma: nella parte centrale, maggiormente alterata dal gonfiore, e in quella sottocrosta. Per entrambe le porzioni esaminate l'acido propionico, mediamente, è presente in concentrazioni inferiori rispetto all'acido butirrico. Relativamente a quest'ultimo acido si sono confrontate le concentrazioni ottenute con i valori riportati nella retta di normalità di formaggi privi di difetto. Dieci campioni hanno presentato quantità di acido butirrico decisamente superiori rispetto alla curva standard, sia nel sottocrosta sia all'interno. Quattro formaggi hanno evidenziato, invece, valori inferiori nel sottocrosta e superiori all'interno se paragonati alla retta di riferimento. Solo il campione n. 6 presenta concentrazioni dell'acido sovrapponibili a quelle dei formaggi privi di alterazioni.

Considerazioni e conclusioni

Le conte microbiche rivelano una differenza fra le due metodiche prese in considerazione. Il conteggio in piastra ha evidenziato, complessivamente, quantitativi superiori di spore/kg rispetto a quelli determinati con la tecnica MPN. In particolare, sei campioni su quindici hanno presentato, con il metodo del numero più probabile, valori inferiori di una unità logaritmica rispetto a quelli riscontrati mediante l'uso delle membrane filtranti. Pertanto, quest'ultimo metodo si dimostra, in linea di prin-

Tabella n. 1: Concentrazioni di acidi organici determinate nei campioni di formaggio.

campione	Acidi organici mg/100 g			
	<i>Acido propionico</i>		<i>Acido butirrico</i>	
	Sottocrosta	Interno	Sottocrosta	Interno
1	0,00	0,00	1,98	135,46
2	2,79	34,53	48,66	173,63
3	1,00	1,06	48,51	122,36
4	0,33	2,28	8,18	115,00
5	2,61	2,20	41,76	37,46
6	23,48	29,37	43,76	23,78
7	0,95	4,27	16,97	69,44
8	1,40	2,53	88,67	123,24
9	0,97	1,84	21,86	27,67
10	1,31	1,73	64,84	33,90
11	30,68	73,88	132,67	184,11
12	3,58	5,32	35,05	42,99
13	0,83	1,05	88,71	166,72
14	0,42	1,32	60,38	138,20
15	1,05	2,04	90,21	121,67

cipio, più attendibile della tecnica MPN, anche se presenta tempi più lunghi nell'esecuzione. Infatti, a differenza di quanto riportato da Ottaviani, il conteggio delle spore di *Clostridium* spp., mediante semina in piastra, è stato possibile solamente dopo 96 ore (19).

L'identificazione dei microrganismi presenti nella pasta del formaggio delinea come specie maggiormente rappresentativa *Cl. tyrobutyricum*, ritrovata in 13 campioni su 15 (86,67%). Seguono poi *Cl. butyricum* e *Cl. sporogenes*, reperiti, rispettivamente, nel 33% e nel 40% dei campioni ed infine *Cl. bif fermentans* presente solo in 2 (13,30%). In nessun campione di Parmigiano Reggiano è stata identificata la specie *Cl. perfringens*.

I dati relativi alla nostra esperienza dimostrano, dunque, come già rilevato da altri Autori (5, 7, 17, 18, 19), che nel formaggio con gonfiore tardivo la specie *Cl. tyrobutyricum* è l'agente più frequentemente responsabile del difetto. Tale microrganismi-

smo, presente nel latte in numero decisamente inferiore rispetto al formaggio, fermenta, infatti, unicamente il lattato ed è in grado di svilupparsi pure in substrati acidi e con elevata concentrazione salina.

Anche *Cl. butyricum* e *Cl. sporogenes* rinvenuti, rispettivamente in sei e cinque campioni, possono provocare il difetto, ma più di rado. La prima specie saccarolitica può provocare il gonfiore precoce prima della salatura, inoltre, fermenta il lattato solo a pH superiore a 5,3. Tale motivo giustifica il minor coinvolgimento del microrganismo nel fenomeno del gonfiore tardivo. L'alterazione dovuta a *Cl. butyricum* si manifesta, soprattutto, entro il primo mese (17) e quindi possiamo affermare che i campioni nn. 2 e 13, con breve periodo di stagionatura, sono quasi certamente esempi di gonfiore precoce dovuto a questo microrganismo. In questi due campioni è stato isolato anche *Cl. sporogenes*, incapace tuttavia di fermentare il lattato. Di conseguenza, il ruolo di questa specie nel determinare il gonfiore tardivo appare di modesta entità.

L'analisi quali-quantitativa degli acidi organici nei formaggi che presentano un'alterazione microbica, rappresenta uno strumento estremamente importante per comprendere la genesi del fenomeno. Infatti, se il processo fermentativo è già concluso, la possibilità di spiegarne l'origine con la sola analisi microbiologica risulta molto improbabile. Come noto, non esiste una correlazione certa fra la manifestazione butirrica e la presenza di clostridi. Tuttavia, la valutazione del rapporto fra gli acidi propionico e butirrico permette di risalire alla specie microbica maggiormente responsabile del difetto (11).

Il livello di normalità dell'acido propionico è di 2 mg/100g; valori inferiori caratterizzano il metabolismo dei batteri lattici e dei clostridi mentre valori superiori indicano la presenza di batteri propionici (19).

L'esame dei risultati relativi agli acidi organici, presenti nella pasta del formaggio alterato, evidenzia che più della metà dei campioni (nn. 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12), associano alla fermentazione butirrica, anche quella propionica indotta dai batteri appartenenti al genere *Propionobacterium* spp. L'incidenza di questi ultimi, tuttavia, è meno importante di quella dovuta al genere *Clostridium* spp., perché i batteri propionici risultano più sensibili al cloruro di sodio, pertanto, una corretta salatura del formaggio generalmente non ne permette lo sviluppo (1, 16, 21).

Si ringrazia il Consorzio per la Tutela del Parmigiano Reggiano per la collaborazione e per il materiale messi a disposizione.

Parole chiave: clostridi, gonfiore tardivo, Parmigiano Reggiano.

Key words: clostridia, late swelling, Parmesan cheese.

Mots clés: clostridia, grosseur tardif, Parmesan fromage.

RIASSUNTO - Sono stati esaminati 15 campioni di formaggio Parmigiano Reggiano, che presentano difetti riconducibili a gonfiore tardivo, provenienti da caseifici situati nel comprensorio dello stesso, al fine di valutare la presenza di clostridi butirrici e identificarli. I quantitativi di spore oscillano da un minimo di $4,5 \times 10^3$ a un massimo di $7,9 \times 10^4$ /Kg (tecnica MPN) mentre i valori ottenuti con la tecnica delle membrane filtranti risultano superiori di una unità logaritmica. In sette campioni

(46,70%) su 15 è stata isolata una specie di clostridi butirrici (*Cl. tyrobutyricum*), in cinque (33,30%) due specie e in tre campioni (20,00%) tre specie differenti. Le specie di clostridi responsabili del processo alterativo sono: *Cl. tyrobutyricum* (86,67%), *Cl. butyricum* (33,30%), *Cl. sporogenes* (33,30%), *Cl. bifermentans* (13,30%).

SUMMARY - Fifteen Parmesan cheese samples, characterized by alterations called “gonfiore tardivo” (“late swelling”), were examined for butyric clostridia count and biochemical identification. All samples were made in cheese factories located in Parma and Reggio Emilia provinces. The MPN technique detected a range of 4.5×10^3 - 7.9×10^4 spores/kg. One logarithmic unit higher were the values detected by the use of the membrane filter (MF) procedure. Seven samples out of 15 (46,70%) were contaminated by *Cl. tyrobutyricum* only, five samples (33,3%) by two clostridia species and three samples (20,00%) by three clostridia species. The following *Clostridium* spp. were responsible for the majority of Parmesan cheese alterations: *C. tyrobutyricum* (86,67%), *C. butyricum* (33,30%), *Cl. sporogenes* (33,30%), and *Cl. bifermentans* (13,30%).

RÉSUMÉ - Quinze échantillons de fromage avec défauts reconduisables au «grosseur tardif», provenant de fromageries situées dans les provinces de Parme et Reggio d'Emile (Italie du Nord), ont été analysées pour l'identification et la détermination des différentes souches de *Clostridium* spp. La quantité de spores oscille de $4,5 \times 10^3$ à $7,9 \times 10^4$ /kg (technique MPN), ainsi que les valeurs obtenues par la technique des membranes filtrantes résultent supérieures d'une unité logarithmique. On a isolé une souche de *Clostridium* spp. dans sept échantillons (46,70%), deux souches dans cinq échantillons (33,30%), trois souches dans trois échantillons (20,00%). Les espèces de *Clostridium* spp. les plus représentatives du processus alteratif sont: *Cl. tyrobutyricum* (86,67%), *Cl. butyricum* (33,30%), *Cl. sporogenes* (33,30%), *Cl. bifermentans* (13,30%).

Bibliografia

- 1) ALBERTINI A., MENGUZZATO G. (1999). I difetti dei formaggi Grana: la gestione del prodotto non conforme. Igiene alimenti-disinfestazione e igiene ambientale, 16, (1), 15-24.
- 2) ANNIBALDI S. (1969). Modificazione della prova di Weinzirl per la ricerca dei clostridi nel latte. Scienza e tecnica lattiero-casearia, 20, (3) 75-79.
- 3) BATTISTOTTI B., BOTTAZZI V., SCOLARI G.L., CHIUSA P. (1984). Effetto dell'aldeide formica e del lisozima sulla fermentazione butirrica e propionica del formaggio Grana. Scienza e tecnica lattiero-casearia, 35, (6), 193-200.
- 4) BOURGEOIS C.M., MESLE J.F., ZUCCA J. (1990). “Microbiologia alimentare”. Ed. Tecniche nuove, Milano.
- 5) BOTTAZZI V. (1983). Clostridi e fermentazione butirrica dei formaggi. L'industria del latte, 19, (3), 3-26.
- 6) BOTTAZZI V. (1984). Il controllo del gonfiore tardivo nei formaggi: possibilità e

- limiti dei mezzi oggi disponibili. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 1, (5), 399-417.
- 7) BOTTAZZI V. (1993). "Microbiologia lattiero-casearia". Ed. Edagricole, Bologna.
- 8) BOTTAZZI V., BATTISTOTTI B. (1978). Indicazioni per il controllo del gonfiore tardivo del formaggio Grana. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 29, 313-325.
- 9) BOTTAZZI V., BATTISTOTTI B., BIANCHI F. (1989). Direct sem observation of clostridia (*Clostridium butyricum*) in grana cheese. *Annali microbiologia*, 39, 119-125.
- 10) BOTTAZZI V., CORRADINI C. (1987). Possibilità e prospettive nel controllo delle fermentazioni gasogene dei formaggi Grana Padano e Provolone. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 38, (2), 117-145.
- 11) BOTTAZZI V., SCOLARI G.L., BRAMBILLA E., BATTISTOTTI B., BOSI E. (1992). Batteri lattici per la produzione di formaggio Grana. 3° parte: velocità di acidificazione e comparsa di gonfiore. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 43, (3), 71-93.
- 12) CAPELLI P., VANNUCCHI V. (1998). "Chimica degli alimenti-conservazione e trasformazione". Ed. Zanichelli, Bologna.
- 13) CARINI S. (1985). I clostridi butirrici causa del gonfiore tardivo nei formaggi. *L'industria del latte*, 19, (3), 27-33.
- 14) EMALDI G. C., TOPPINO P.M., BOSSI M. G., CARINI S., LODI R., VEZZONI A. M., NIZZOLA I., ALBERTINI B. (1977). La presenza di sporigeni anaerobi nei formaggi e nelle feci di bovine da latte. *L'industria del latte*, 13, (2), 47-81.
- 15) LODI R. (1985). L'azione litica del lisozima sui clostridi. *L'industria del latte*, 21, (3-4), 23-31.
- 16) LOSI G., CASTAGNETTI G. B. (1993). Origine dei principali difetti del formaggio Parmigiano Reggiano e possibili rimedi. *Atti del convegno Progeo*, Reggio Emilia, 28/01/1993.
- 17) MATTEUZZI D., ANNIBALDI S., SABATINI P. (1972). Importanza di *Clostridium sporogenes* come agente di gonfiore del formaggio Grana. *Annali microbiologia*, 22, 145-153.
- 18) NEVIANI E. (1992). Il lisozima in caseificazione: dai primi stadi alle più recenti applicazioni. *L'industria del latte*, 28, (1), 23-44.
- 19) OTTAVIANI F. (1991). "L'analisi microbiologica dei prodotti lattiero-caseari". *Manuale di tecniche di laboratorio ed ecologia microbica*. Ed. Tecniche nuove, Milano.
- 20) OTTOGALLI G. (1991). "Microbiologia lattiero-casearia". Ed. Clesav, Milano.
- 21) PANARI G., GUIDETTI R., MENOZZI P. (1991). Valutazione dei parametri chimici e biochimici in formaggio Parmigiano Reggiano con difetti. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 40, (2), 22-29.
- 22) PANZANI N. (1993). "Formaggio Grana". Ed. tipografia artigiana, Vignola (MO).

23) PECORARI M. (1981). Ricerca sul numero e sulle variazioni stagionali di spore di clostridi butirrici nel latte per Parmigiano Reggiano. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 32, (5), 287-296.

24) SALVADORI DEL PRATO O. (1998). "Trattato di tecnologia casearia". Ed. Edagricole, Bologna.

VALUTAZIONE DELLA COMPONENTE MICROBICA IN CARNI EQUINE MACINATE

Bacci C. *, Paris A. *, Poeta A.***, Diquattro G.***, Merialdi G**, Bonardi S. *

Introduzione

Nell'ambito dei prodotti a base di carne macinata si colloca il "pesto" di cavallo, un piatto tipico, consumato in alcune zone, tra cui la provincia di Parma. Costituito da carne di equino adulto o puledro, tritata nel laboratorio di vendita, può essere consumato cotto anche se, per tradizione, la maggior parte delle persone lo preferisce crudo con o senza aggiunta di altri ingredienti.

Nell'antichità la carne di cavallo veniva consumata, abitualmente, alla pari di quella di altre specie animali; Autori classici riportano la macellazione degli equini già presso i Persiani, i Celti e i Latini. In Europa l'abitudine ippofagica andò progressivamente diminuendo fino a cessare completamente con la diffusione del Cristianesimo, periodo in cui gli equini venivano impiegati come mezzo di locomozione e per i lavori agricoli. Successivamente, l'avvento della meccanizzazione ridusse l'impiego degli animali in agricoltura, consentendo la macellazione, non solamente a fine carriera, di soggetti in condizioni fisiche buone. Il consumo della carne di cavallo risulta, tuttavia, ancora limitato: Emilia Romagna, Lombardia, Puglia, Veneto e Lazio sono le regioni con tradizione ippofagica più diffusa (13).

L'elevato contenuto di proteine e di aminoacidi essenziali in questo tipo di carne si rivela importante per la crescita e lo sviluppo delle masse muscolari, nonché per sopperire alla diminuita efficienza del ricambio azotato nelle persone anziane. La limitata percentuale di grasso contribuisce a rendere, inoltre, l'alimento apprezzabile anche dal punto di vista dietetico. Altra pregevole caratteristica è la totale assenza di colesterolo che ne consente il consumo anche da parte di soggetti con ipercolesterolemia (5, 16, 22).

Nel corso degli ultimi anni, il quadro normativo che disciplina il settore delle carni si è notevolmente arricchito: sono state, infatti, emanate diverse norme a carattere sia verticale sia trasversale, come conseguenza del recepimento di direttive comunitarie.

Particolare importanza assume il DPR n. 309 del 3 agosto 1998, che disciplina l'immissione sul mercato di carni macinate e di preparazioni di carne. Tale

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

***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Reggio Emilia.*

****A.S.L. Reggio Emilia.*

decreto riporta, tra l'altro, in allegato, i limiti microbiologici relativi ad alcune specie. Si tratta di un provvedimento di notevole rilevanza per il settore delle carni, che introduce alcune novità rispetto alla legislazione precedente (6, 10, 12, 18).

La fase di commercializzazione delle carni macinate presenta aspetti igienici da non trascurare, tenendo presente che tali prodotti, distribuiti sfusi o confezionati nelle gastronomie, nelle macellerie e nei supermercati possono essere consumati crudi (26). Pertanto, un alimento come il "pesto" può risultare potenzialmente pericoloso in quanto, spesso, non è sottoposto a cottura. Di conseguenza la valutazione della sua componente microbica, con particolare riferimento ad agenti tossinfettivi, appare di estrema importanza.

Alla luce di queste considerazioni ci è sembrato interessante intraprendere un'indagine su alcuni campioni di macinato equino, al fine di ottenere indicazioni sul grado di contaminazione microbica del prodotto. Ci si è riproposti, inoltre, di caratterizzare la componente batterica e di verificare, conseguentemente, la potenziale pericolosità, per la salute del consumatore, di un alimento che vanta una notevole tradizione nella provincia di Parma.

Materiali e metodi

Reperimento dei campioni

Sono stati esaminati 50 campioni di macinato equino, nel periodo ottobre 2001 - febbraio 2002, provenienti da macellerie situate nelle province di Parma, Modena e Reggio Emilia. Dal campione costituito da 150 g, sono state prelevate tre aliquote da 25 g, impiegate per l'isolamento di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* O157:H7 ed omogeneizzate ciascuna con 225 ml di brodo. I brodi utilizzati per l'arricchimento sono stati, rispettivamente: Listeria Enrichment Broth (UVM I modified, Biokar Diagnostic), Buffered Peptone Water (Oxoid) e Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) con aggiunta di vancomicina (0,8 mg/l). Una quantità pari a 20 g, omogeneizzata in 80 ml della soluzione salina di Ringer, è stata impiegata per la ricerca di *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, enterococchi e conta mesofila aerobia.

Agenti di tossinfezioni alimentari

Per la ricerca di *L. monocytogenes*, dopo incubazione a 37°C per 24 ore, sono stati trasferiti 0,1 ml di brodocoltura di primo arricchimento in 10 ml di Listeria Enrichment Broth (UVM II modified, Biokar Diagnostic), incubato a 30°C per 24 ore. Dalle brodoculture di secondo arricchimento è stata effettuata una piastratura su Oxford Listeria Selective Agar Base (Merk) (37°C per 48 ore). Cinque colonie sospette sono state trapiantate su Columbia Agar sangue di montone (Oxoid), incubato a 37°C per 24 ore. Le colonie, che hanno prodotto emolisi, sono state sottoposte ai consueti test biochimico enzimatici (25).

Relativamente a *Salmonella* spp. il pre-arricchimento e l'arricchimento sono stati eseguiti secondo quanto riportato dalla norma ISO 6579/93. Sono state effettuate pia-

strature su terreno Hektoen Enteric Agar (Oxoid), incubato a 37°C per 24 ore. Cinque colonie sospette sono state trapiantate su Kligler Iron Agar (KIA, Oxoid) e contemporaneamente, testate sul terreno all'urea (LAB-M). Sulle crescite sospette si è eseguito il test di agglutinazione rapida mediante siero poliagglutinante (Salmonella O Omnivalent Test Serum, Biogenetics) e, successivamente, quelli biochimico-enzimatici (API 20 E ® bioMérieux) (25).

Nel caso di *E. coli* O157:H7, dopo incubazione a 37°C per 16-24 ore del brodo di arricchimento, si è proceduto con la tecnica della separazione immunomagnetica impiegando Dynabeads ® anti *E. coli* O157:H7 (DynaL). Sul terreno Cefixime-Tellurite Sorbitol MacConkey Agar (CT-SMAC; Oxoid) vengono piastrate, in doppio, aliquote di 50 ml della sospensione contenente le microsfele. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore le colonie sospette, sorbitolo negative, vengono trapiantate in TSB, utilizzando una piastra a 96 pozzetti, da ognuno dei quali si sono recuperate, dopo incubazione a 37°C per 24 ore, 50 ml di brodocoltura per effettuare la prova dell'indolo. A seguito di esito positivo di quest'ultima si è eseguita l'agglutinazione rapida, per gli antigeni O157 e H7 ("*E. coli* O157 Test Kit", Oxoid; "*E. coli* H7 serum", Biogenetics). La conferma biochimica dei ceppi risultati positivi, è stata effettuata utilizzando il kit API 20 E ® (bioMérieux) (1, 4, 7).

Microrganismi indicatori di qualità igienica

Le determinazioni sono state effettuate, in doppio, distribuendo l'omogenato e una sua diluizione decimale su Violet Red Bile Agar (VRBA, Oxoid) + Mug Supplement (Metil Umbelliferil Glucuronide, Oxoid) per *E. coli* (44°C per 24 ore), su Baird Parker Agar Base (Oxoid) per *S. aureus* (37°C per 48 ore) e su Agar Kanamicina-Esculina-Azide (Merk) per gli enterococchi (37°C per 24 ore).

Per l'isolamento di *E. coli* è stato utilizzato il terreno VRBA + MUG in grado di differenziare questa specie da altri coliformi. Le colonie tipiche per colore, dimensione e fluorescenza, sono state trapiantate su KIA (Oxoid), incubate a 37°C per 24 ore e confermate mediante la serie di test biochimici miniaturizzati del sistema API 20 E ® (bioMérieux).

Per le prove di conferma di *S. aureus*, sono state trapiantate due colonie in Brain Heart Infusion Agar (BHI, Oxoid) e incubate a 37°C per 24 ore; successivamente è stata effettuata la colorazione di Gram e il test identificativo della coagulasi.

Le colonie tipicamente riconducibili a enterococchi sono state trapiantate in BHI e incubate a 37°C per 18-24 ore. Si è proceduto, quindi, con l'identificazione mediante colorazione di Gram, test della catalasi e prove di crescita a 44 - 46°C per 48 ore in BHI e sullo stesso terreno addizionato con il 6,5% di NaCl a 37°C per 48 ore. La specie di appartenenza degli enterococchi isolati è stata determinata mediante test biochimico-enzimatici (API 20 STREP ®, bioMérieux) (3, 25, 27, 30, 31).

Per la determinazione della conta mesofila aerobia si sono depositi 100 µl del campione sul terreno Plate Count Agar Standard (Oxoid), incubato poi a 30° C per 72 ore.

Antibiotico resistenza e minima concentrazione inibente (MIC)

E' stata valutata l'antibiotico resistenza dei ceppi isolati (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli*) utilizzando la tecnica di Kirby-Bauer. Gli antibiotici testati, appartenenti a diverse categorie, sono rappresentati da: Amoxicillina, Cefalexina, Ceftiofur, Acido clavulanico/Amoxicillina, Colistina, Neomicina, Kanamicina, Gentamicina, Spectinomicina, Eritromicina, Tiamfenicolo, Oxitetraciclina, Trimetoprim/Sulfamidico, Enrofloxacin. Come brodo di crescita batterica è stato usato BHI con aggiunta di siero equino, incubato per 6 ore a 37°C e come terreno solido Muller Hinton Agar (Oxoid) e Agar sangue nel caso di *L. monocytogenes*.

Sui ceppi di enterococchi isolati, fatti crescere nel brodo Isosensitest, si è testata la resistenza alla vancomicina, utilizzando diluizioni seriali pari a: 12 - 6 - 3 - 1,5 - 0,75 - 0,375 - 0,1875 mg/ml. Sono stati ritenuti sensibili alla vancomicina tutti i microrganismi nei quali si sia evidenziata una MIC < 6 mg/ml (2).

Risultati

Agenti di tossinfezioni alimentari

Sui 50 campioni esaminati, solamente il campione n. 2 (2%) è risultato positivo per *Salmonella* spp., identificata sierologicamente come *Salmonella* Anatum, mentre nei campioni nn. 2, 30, 31, 39 (8%) sono stati isolati ceppi di *L. monocytogenes*. In nessun campione è stata riscontrata la presenza di *E. coli* O157:H7.

Microrganismi indicatori di qualità igienica

Il numero delle ufc/g di *E. coli* e di *S. aureus*, di tutti i campioni esaminati, è risultato essere conforme ai limiti stabiliti dal DPR n. 309/98. Da diciannove macinati di carne equina su cinquanta (38%) sono stati isolati enterococchi in numero ≥ 5 ufc/g, con valori oscillanti da un minimo di $1,0 \times 10^1$ ad un massimo di $9,0 \times 10^3$ ufc/g come riportato nella **tabella n. 1**.

I valori relativi alla conta mesofila aerobia oscillano da un minimo di $7,50 \times 10^3$ ufc/g (campione n. 50) a un massimo di $1,0 \times 10^7$ ufc/g (campione n. 29). Tre campioni (nn. 20, 29, 43) presentano valori eccedenti la soglia limite superiore prevista dal DPR 309/98, corrispondente a $5,00 \times 10^6$ ufc/g.

n. campioni	1-25-45	2	3-7-12-43	4-18-13-23	3-5-8-9-10-11-14-15-19-21-26-27 28-29-31-32-33-34-35-36-37-38-39 40-41-42-44-46-47-48-49-50	6	16-17-22	20	24	30
Enterococchi ufc/g	$4,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^3$	$< 5,0 \times 10^0$	$5,0 \times 10^0$	$8,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	$5,5 \times 10^1$

Tabella n.1: Presenza di enterococchi (ufc/g) nei 50 campioni esaminati.

Antibiotico resistenza

I risultati relativi alle prove di antibiotico resistenza, eseguite su *Salmonella* Anatum, *L. monocytogenes* ed *E. coli*, sono riportati nella **tabella n. 2**. Le diverse classi di antibiotici testate sono rappresentate da beta-lattamici (penicilline, cefalosporine), polimixine, aminoglicosidi, macrolidi, tetracicline, sulfamidici, fluorochinoloni.

antibiotico	n. campione						
	2	2	30	31	39	1	3
	<i>S. Anatum</i>	<i>L. monocytogenes</i>			<i>E. coli</i>		
Amoxicillina	S	S	S	S	S	S	I
Cefalexina	S	I	I	I	I	S	I
Ceftiofur	S	I	I	I	I	S	S
Ac. Clavulanico/Amoxicillina	S	S	S	S	S	S	S
Colistina	S	R	R	R	R	S	S
Neomicina	S	S	S	S	S	S	S
Kanamicina	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S
Spectinomicina	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	R	S	S	S	S	R	R
Tiamfenicolo	S	S	S	S	S	I	I
Oxitetraciclina	S	S	S	S	S	S	S
Trimetroprim/Sulfamidico	S	S	S	S	S	S	S
Enrofloxacina	S	S	S	S	S	S	S

Tabella n. 2: test di sensibilità, dei microrganismi isolati, nei confronti di alcune categorie di antibiotici. Legenda: S = sensibile; I = intermedio; R = resistente.

Identificazione e antibiotico resistenza di enterococchi

Come riportato nella **tabella n. 3**, i 19 ceppi di enterococchi isolati dai campioni evidenziati più di 5 ufc/g (sensibilità del metodo) e sottoposti alla determinazione di specie, risultano così classificati: 12 *E. faecalis* (63%), 5 *E. gallinarum* (26%), 2 *E. faecium* (11%).

Per gli stipti di enterococchi è stata valutata la minima concentrazione inibente (MIC) di vancomicina ($\mu\text{g/ml}$). La maggior parte dei ceppi (89,5%) presenta un'elevata sensibilità (0,75-1,5-3 $\mu\text{g/ml}$) nei confronti dell'antibiotico testato; solo gli stipti isolati da due campioni (nn. 2 e 13), appartenenti alla specie *E. faecalis*, presentano una modesta resistenza (6 $\mu\text{g/ml}$). I risultati sono riportati nella **figura n. 1**.

n. campione	enterococchi
1	<i>Enterococcus gallinarum</i>
2	<i>Enterococcus faecalis</i>
3	<i>Enterococcus faecalis</i>
4	<i>Enterococcus gallinarum</i>
6	<i>Enterococcus faecium</i>
7	<i>Enterococcus gallinarum</i>
12	<i>Enterococcus faecalis</i>
13	<i>Enterococcus faecalis</i>
16	<i>Enterococcus faecalis</i>
17	<i>Enterococcus gallinarum</i>
18	<i>Enterococcus faecalis</i>
20	<i>Enterococcus gallinarum</i>
22	<i>Enterococcus faecalis</i>
23	<i>Enterococcus faecalis</i>
24	<i>Enterococcus faecalis</i>
25	<i>Enterococcus faecalis</i>
30	<i>Enterococcus faecalis</i>
43	<i>Enterococcus faecium</i>
45	<i>Enterococcus faecalis</i>

Tabella n. 3: specie isolate di enterococchi nei campioni esaminati.

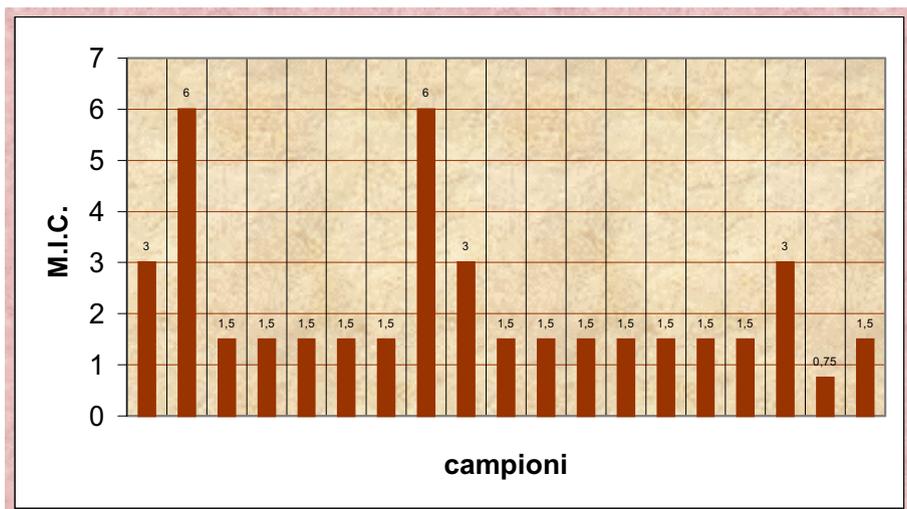


Figura n. 1: Concentrazioni di vancomicina (mg/ml) corrispondenti alla minima concentrazione inibente (MIC), nei confronti degli enterococchi isolati.

Considerazioni e Conclusioni

I dati ottenuti da conteggio delle ufc/g, relativi ai diversi microrganismi considerati, fanno emergere un quadro generale abbastanza rassicurante. Tutti i campioni evidenziano, infatti, relativamente a *S. aureus*, valori notevolmente inferiori alla soglia limite superiore di accettabilità, prevista dal DPR n. 309, corrispondente a 5×10^3 ufc/g.

Altrettanto confortanti sono i valori ottenuti per *E. coli*: i macinati equini esaminati sono apparsi decisamente lontani dai valori massimi consentiti dalla legge ad eccezione del campione n. 1 ($2,5 \times 10^2$ ufc/g) che, comunque non supera il limite soglia inferiore (5×10^2 ufc/g) previsto dal decreto sopra citato. Analoghi risultati si sono pure riscontrati, in indagini microbiologiche condotte su campioni di carne equina trita, in vendita nella provincia di Parma (26). Relativamente ai test di antibiotico resistenza, i dati dimostrano che i ceppi di *E. coli* isolati dai campioni nn. 1, 3, sono risultati sensibili alla quasi totalità degli antibiotici testati, mentre si presentano resistenti all'eritromicina.

Gli elevati valori di ufc/g di enterococchi isolati, ci hanno indotto a verificare, determinando la minima concentrazione inibente (MIC) di vancomicina, l'eventuale presenza di ceppi antibiotico resistenti. Come noto la vancomicina dovrebbe essere impiegata limitatamente per il trattamento di gravi infezioni sostenute da microrganismi Gram-positivi resistenti ad altri antibiotici, rappresentando essa, a tutt'oggi, uno dei principali farmaci di scelta nei casi di sepsi, endocarditi, osteomieliti, polmoniti, meningiti. Tuttavia, il suo uso sempre più frequente negli ospedali e in medicina veterinaria, negli ultimi anni, ha determinato l'insorgere di ceppi resistenti alla terapia farmacologia (9, 11, 19, 20, 21, 28). I ceppi testati con vancomicina hanno presentato valori di MIC, oscillanti da un minimo di 0,75 µg/ml ad un massimo di 6 µg/ml, dimostrando un'elevata efficacia dell'antibiotico nei confronti degli enterococchi.

Relativamente alla carica mesofila aerobia, nei campioni nn. 29, 43 ($1,0 \times 10^7$ ufc/g) e 20 ($8,8 \times 10^6$ ufc/g), si sono riscontrati valori più elevati rispetto al limite soglia previsto dal D.P.R. n. 309/98. E' importante, tuttavia, sottolineare che questi campioni, conservati presso il laboratorio di analisi allo stato refrigerato, sono stati sottoposti ad esame dopo 72 ore dal prelievo e ciò potrebbe essere stata la causa dell'elevato sviluppo batterico di microrganismi psicofili presenti nei macinati esaminati. D'altronde il consumatore difficilmente utilizza il macinato dopo averlo conservato per 3 giorni in frigorifero.

La separazione immunomagnetica effettuata per l'isolamento di *E. coli* O157:H7, in grado di provocare infezione anche con poche decine di cellule vitali, ha evidenziato l'assenza di tale microrganismo nei macinati. Questo dato ci permette di escludere la pericolosità dei campioni nn. 1 e 3, risultati, invece, contaminati da *E. coli* non verocitotossici. Medesime valutazioni emergono dall'indagine condotta da Magri et al. (1994) su diverse tipologie di macinati. Tale studio ha messo pure in evidenza che la carne equina, confrontata con quella di pollo, bovina e suina, risulta la meno contaminata (26).

Solamente il campione n. 2 è risultato positivo all'isolamento di *Salmonella* spp. e perciò non conforme a quanto stabilito dalla normativa vigente. Questo aspetto

appare preoccupante, poiché nello stesso campione è stata isolata anche *L. monocytogenes*. Confortante, invece, è il risultato relativo alla successiva tipizzazione di *Salmonella* spp che ha permesso di classificarla come *S. Anatum*, sierotipo che non risulta essere tra i più patogeni. Tale ceppo, inoltre, come verificato mediante le prove di antibiotico resistenza, è risultato insensibile solamente all'eritromicina.

Piuttosto allarmante risulta la percentuale di positività (8%) relativamente a *L. monocytogenes*, che è stata isolata da quattro campioni, tre dei quali conservati per 72 ore a 2-5 C°. Tutti i ceppi, inoltre, si sono rivelati resistenti alla colistina. Questo risultato, unitamente ai dati relativi all'antibiotico resistenza degli altri microrganismi, ci permette di affermare che tutti gli stipti isolati presentano un'elevata sensibilità alla maggior parte degli antibiotici testati.

La presenza in alcuni campioni di *L. monocytogenes* può risultare inquietante, soprattutto in considerazione del fatto che, accanto alla tipica evoluzione dell'infezione in soggetti immunodepressi, sono stati recentemente descritti alcuni focolai, caratterizzati da gastroenterite febbrile in soggetti immunocompetenti. Si ritiene comunque che, in questi casi, la dose infettante debba essere considerevolmente superiore (10^5 - 10^6 cellule) a quella necessaria per indurre infezione nei soggetti debilitati, (8, 14, 23, 29). I vari sierotipi di *L. monocytogenes* debbono essere, infatti, considerati tutti potenzialmente patogeni, non potendosi prevedere quale sia lo stato immunitario del consumatore (24).

In definitiva il pesto di cavallo, rispetto alle altre tipologie di prodotti carnei macinati, risulta essere senza dubbio tra le meno contaminate. Ciò nonostante il suo consumo, allo stato crudo, alla luce dei risultati ottenuti, non può considerarsi totalmente privo di rischi, specialmente per i soggetti immunocompromessi.

Parole chiave: Carne equina, microbiologia, sicurezza.

Key words: Horsemeat, microbiology, safety.

Mots clés: Viande de cheval, microbiologie, sûreté.

RIASSUNTO - Nel periodo ottobre 2001 - febbraio 2002, sono stati esaminati 50 campioni di carne di cavallo macinata provenienti da macellerie situate nelle province di Parma, Modena e Reggio Emilia. Le indagini sono state orientate all'individuazione di microrganismi indicatori di qualità igienica (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, enterococchi), microrganismi mesofili aerobii e di batteri patogeni (*Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7). Per alcuni di essi si è, anche, valutata la resistenza nei confronti di diverse categorie di antibiotici e, nel caso degli enterococchi la minima concentrazione inibente di vancomicina. Il numero delle ufc/g di *E. coli* e di *S. aureus*, di tutti i campioni esaminati, è risultato essere conforme ai limiti stabiliti dal DPR n. 309/98. Dei campioni esaminati, solamente uno è risultato positivo per *Salmonella* spp. (*Salmonella* Anatum) e in quattro sono stati isolati ceppi di *L. monocytogenes*. In nessun campione è stata riscontrata la presenza di *E. coli* O157:H7. Tutti i microrganismi testati presentano un'elevata sensibilità alla maggior parte degli antibiotici.

SUMMARY - From October 2001 to February 2002, a total of 50 horsemeat samples collected from butcherries of Parma, Modena and Reggio Emilia provinces

(northern Italy) were examined for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, enterococci, total bacterial count, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O 157:H7. Some isolates were tested for antimicrobial sensitivity; enterococci were tested for vancomycin resistance. In all samples *E. coli* and *S. aureus* CFU/g were in accordance with the microbiological criteria of the Italian Law n. 309/98. Only one sample (2.0%) was contaminated by *Salmonella* spp. (*Salmonella* Anatum) and four samples (8.0%) were positive for *L. monocytogenes*. *E. coli* O157:H7 was never detected in the examined samples. All isolates were highly sensitive to the majority of the tested antimicrobial agents.

RÉSUMÉ - Dans la période octobre 2001 – février 2002 50 échantillons de viande moulue de cheval, provenant de boucheries situées dans les provinces de Parme, Modène et Reggio d'Emile (Italie du Nord) ont été analysés pour la détermination des micro-organismes indicateurs de qualité hygiénique (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp.), des micro-organismes mesophiles aérobies et des bactéries dangereux pour l'homme. Pour certains micro-organismes la résistance a été aussi évaluée vis-à-vis des différentes catégories d'antibiotiques et, dans le cas d'*Enterococcus* spp., la plus faible concentration inhibente de vancomycine. Le nombre des unités formants colonies par gramme (ufc) d'*E. coli* et de *S. aureus* de tous les échantillons examinés est résulté conforme aux limites établies par la loi italienne DPR 309/98. Parmi les échantillons examinés, un est résulté positif pour *Salmonella* spp. (*Salmonella* Anatum) et quatre pour *L. monocytogenes*. On a jamais relevé la présence d'*E. coli* dans les différents échantillons. Tous les micro-organismes testés présentent une sensibilité élevée à la plus part des antibiotiques.

Bibliografia

- 1) BONARDI S. (1998). Aspetti della tossinfezione alimentare da *Escherichia coli* O157:H7 con riferimento alla produzione e al consumo di carni macinate. *Ingegneria Alimentare*, XIV, (3), 9-15.
- 2) BORGES K., SORUM M., KRUSE H., WASTESON Y. (2000). Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) on Norwegian broiler farms. *FEMS Microbiology Letters* 191, 255-258.
- 3) CANTONI C., BERSANI C., D'AUBERT S., VALLONE L., THOENY M. G. (1996). Valutazione di chromocult coliform agar per la determinazione di *E. coli* e di altri enterobatteri negli alimenti. *Industrie Alimentari*, XXXV, 262-269.
- 4) CANTONI C. (1998). Chromocult coliform agar ed enterohemolysin agar per la ricerca di *E. coli* O157:H7 negli alimenti. *Industrie Alimentari*, XXXV, 354-356.
- 5) CANTONI C., CATTANEO P., BIANCHI A., BERETTA G. (1977). Conservabilità della carne equina refrigerata in imballaggi plastici, in atmosfera ipobarica e con protossido d'azoto. *Archivio veterinario italiano*, 28, (3-4), 73-78.
- 6) CAPPELLI M. (2000). L'abrogazione delle limitazioni sanitarie per le carni equine, *Eurocarni*, 3, 31-33.
- 7) CASERIO G., CASERIO S. (2001). Presenza di *Escherichia coli* O157:H7 in prodotti alimentari. *Industrie Alimentari*, XL, 27-28.

- 8) DALTON C. B., AUSTIN C. C., SOGEL J. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. N. Engl. J. Med., 153, 9-29.
- 9) DEVRIESE L., IEVEN M., GOOSSENS H., VANDAMME P., POT B., HOMMEZ J., HAESBROUCK F. (1996). Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 40, (10), 2285-2287.
- 10) FERDANI P. (2000). Produzione e commercializzazione delle carni equine. Obiettivi e Documenti Veterinari, 3, 53-55.
- 11) GAMBAROTTO K., PLOY M., DUPRON F., GIANGIOBBE M., DENIS F. (2001). Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. J. Of Clinical Microbiology, 39, (6), 2354-2355.
- 12) GAZZETTA UFFICIALE n. 251 del 25 agosto 2002.
- 13) GIACCONE V., CASTELLANI P., TURI R. M., PITTUI S., FAVARO G. (1997). Gli sfilacci di cavallo. Un prodotto a base di carne tipico del Veneto. Ingegneria Alimentare, 5, 14-19.
- 14) HITCHINS A.D. (1996). Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 30, (1-2), 71-85.
- 15) MARINO M., DURATTI G., D'AULBERT S., COMI G. (1995). Qualità microbiologica di prodotti a base di carni macinate di diverse specie animali. Ingegneria Alimentare, XI, (3), 21-26.
- 16) [http://www.alessandriaonline.net/il cavallo/prodotti.htm](http://www.alessandriaonline.net/il_cavallo/prodotti.htm)
- 17) <http://www.arpa.emr.it/Parma/alimenti/Coli/doc.htm>
- 18) http://www.giustizia.it/cassazione/leggi99/1526_99.html#articolo12
- 19) <http://www.informed.it/pedriata/aggiornamenti/sp...resistenze.htm>
- 20) <http://www.medfor.net/special/infettiv/antibiot/argoment.htm>
- 21) <http://www.medrof.net/special/infettiv/antibiot/epidem.htm>
- 22) <http://www.ristorando.com/html/carne.htm>
- 23) MCLAUCHIN J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. Food Control, 7, (4-5), 187-193.
- 24) MCLAUCHIN J. (1997). The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. Rev. Med. Microbiol., 8, 1-14.
- 25) OTTAVIANI F. (1991). L'analisi microbiologica dei prodotti lattiero-caseari, 204-324. Ed. tecniche nuove, Milano.
- 26) POLLASTRI D., MAGRI M., COLANTONI A., FAGAN S. (1994). Indagine microbiologica su campioni di carne equina trita in vendita nella provincia di Parma. L'igiene moderna, 102, 787-798.
- 27) PROVANA L., RACOZZI S., D'AULBERT S. (1996). Verifica e applicabilità di un nuovo sistema rapido per la determinazione delle cariche microbiche totali, dei coliformi e di *Escherichia coli* in un programma di autocontrollo nelle aziende dei prodotti carnei. Ingegneria Alimentare, XII, (5), 9-12.

- 28) ROBREDO B., SINGH K., BAQUERO F., MURRAY B., TORRES C., (2000). vancomycin-resistant enterococchi isolated from animals and food. *International J. of Food Microbiology*, 54, 197-204.
- 29) SALAMINA G., DALLE DONNE E., NICCOLINI E., PODA G., CESARONI D., BUCCI M., FINI R., MALDINI M., SCHUCHAT A., SWMINATHAN G., BIBB W., ROCOURT J., BINKIN N., SALMASO S. (1996). A foodborne outbreak gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.*, 117, 429-436.
- 30) TOWNSEND D.E., IRVING R. L., NAQUI A. (1998). Comparison of the simplate coliform and *Escherichia coli* test with petrifilm, Three-Tube MPN, and VRBA+MUG Methods for enumerating coliforms and *E.coli* in food. *J. Food Protection*, 61, (4), 444-449.
- 31) TREPETA R. W., EDBERG S. C. (1984). Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronide-based for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *J. Clinical Microbiology*, 19, (4), 172-174.

PREVALENCE OF MOLECULES OF β -LACTAM ANTIBIOTICS IN BOVINE MILK IN LOMBARDIA AND EMILIA ROMAGNA (ITALY)

Ghidini S.*, Zanardi E.*, Varisco G.^o, Chizzolini R.*

Introduction

The β -lactams are the oldest group but still one of the most employed among the groups of antibiotics. This group bothers human health; as a matter of fact, cases of allergic reactions due to residues in milk are described in literature (Freeman T. R., 1953; Kindred T. P. and Hubbert W. T., 1993). Because of this, the molecules belonging to the group of β -lactams have the lowest tolerances in the EU between all the antimicrobials. The EU Regulation 2377/90 set these Maximum Residue Limit (MRL) for some β -lactam antibiotics in milk: penicillin G 4 $\mu\text{g/l}$, ampicillin 4 $\mu\text{g/l}$, oxacillin 30 $\mu\text{g/l}$, amoxicillin 4 $\mu\text{g/l}$, dicloxacillin 30 $\mu\text{g/l}$, cephalixin 100 $\mu\text{g/l}$, cephalirin 60 $\mu\text{g/l}$.

The analysis to detect antimicrobial residues in milk are usually performed in two steps: first a microbial or enzymatic or receptor-based method is used as a screening tool. Second, the samples found positive are confirmed by a chemical method. A confirmatory method has to be able to detect which molecule is present in the sample and to quantitate it. High pressure liquid chromatography coupled with UV detector (HPLC-UV) is the technique usually adopted as a confirmatory method for antibiotic residues. This technique has some limitations: mainly it has a low sensitivity and selectivity, therefore many purification steps are needed (Faria Reyes J. F. *et al.*, 2000; Taguchi S. *et al.* 1999; Sorensen L. K. *et al.*, 1997). Sometimes, in order to detect the analytes through a fluorescence detector, also a derivatisation step can be used to achieve higher sensitivity (Edder P. *et al.*, 1999; Marchetti M. *et al.*, 2002; Berger K. and Petz M., 1991). In any case the methods are quite time consuming and unsuitable to process a great number of samples. This could be one of the reasons of the lack of data in national and international literature in terms of molecules more frequently present as residues in milk.

Moreover, the HPLC-UV confirmation, even using a diode array detector, is not completely reliable (Mitchell J. L. *et al.*, 1998). The EU Commission Decision 93/256 already stated "Methods based only on chromatographic analysis without the use of molecular spectrometric detection are not suitable for use as confirmatory methods". Recently the commission decision 2002/657 confirmed and strengthened this concept.

*Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti. Università degli Studi di Parma (Italy).

^oIstituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Centro Produzioni Zootecniche. Brescia (Italy).

Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) could represent a highly sensitive and selective tool to detect antibiotic residues in milk without the need of many purification steps. There are already some methods to detect residues of β -lactam antibiotics in milk using HPLC-MS, but in many cases they are unsatisfactory because they are unable to reach the sensitivity required by the tolerances set by the EU Regulation 2377/90. Only recently some technical improvement of the HPLC-MS technique, in particular of the interface, allowed some sensitive methods to be set up (Riediker S. and Stadler R. H., 2001; Daeseleire E. *et al.*, 2000). In order to analyse a great number of samples found positive by a screening method we developed a fast method based on HPLC-MS/MS. The method has been validated and used to analyse 53 bovine milk samples found positive by a microbial test at the milk section of the IZSLER of Brescia (Italy) during routine quality controls. During 2001 this official organisation tested 159.543 samples, 549 of which (0.34%) were found positive by the microbial screening test.

Materials and Methods

Sampling

53 bovine milk samples were randomly chosen between the samples that during 2001 tested positive by a microbial test (Delvotest SP[®]) at the milk section of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER, Brescia, Italy) during routine quality controls. The samples were collected at 4 different times during 2001. The samples were stored at -20°C and analysed within one month from their collection.

Extraction

5 ml of raw milk were put into 10 ml Pyrex screw cap centrifuge tubes and vortex mixed with 400 μl of 10% acetic acid aqueous solution. The acidified milk was then centrifuged at 3500 r.p.m. for 10 minutes at 4°C . The clear supernatant phase was taken by a syringe, avoiding taking the upper fat layer, and filtered through a 0.50 μm nylon filter 13 mm diameter (Advantec MFS, Pleasanton, USA). The filtered extract was put into 2 ml autosampler vials (Chromacol Ltd., Herts, UK) and 50 μl were injected into the HPLC-MS/MS system. Each sample was prepared in duplicate.

Liquid chromatography-mass spectrometry

High pressure liquid chromatography was carried out using a P2000 series binary pump (Spectra Physics, Milan, Italy) equipped with an AS3000 autosampler (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) provided with a 50 μL loop. The analytes were separated on a Merck-LiChrospher 100 RP18 (250 mm x 4 mm i.d., 5 μm , Merck, Darmstadt, Germany) column. Water and acetonitrile both acidified with 0.1% formic acid were used as mobile phase at 1 ml/min. constant flow, according to the following elution program: from 100% water to 100% acetonitrile in 6 min. and from 100% acetonitrile to 100% water from 6 to 12 min. A 2 minutes equilibration delay was used between each chromatographic run.

The column effluent was connected to the Peek transfer line (1m x 0,25 mm) of

the mass spectrometer interface and subjected to a 70:30 split ratio. MS/MS analyses were carried out on an API 365 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo Ion Spray interface for pneumatically assisted electrospray.

The molecular and fragment ions of the investigated analytes are reported in Table 1.

Molecule	Molecular ion [M+H] ⁺	Fragment ion	Fragment ion	Fragment ion	Fragment ion
Penicillin G	335	160	289	176	
Ampicillin	350	106	160	174	192
Oxacillin	402	160	243		
Amoxicillin	366	114	160	208	349
Nafcillin	415	199	300	171	256
Dicloxacillin	470	160	311		
Cephalexin	348	158	106	174	192
Cephapirin	424	292	181	141	

Table 1: The molecular ion and the fragments found for each molecule. The ions in bold are those of the most sensitive transition.

MS/MS acquisitions were performed in the mass reaction monitoring mode (MRM) by monitoring the signal of the most abundant fragment ion.

Quantitation

Quantitation was made through external standards. Calibration curves were built injecting mixtures of stock solutions at the following concentrations: 5, 10, 50, 100, 200, 400, 1000 µg/l. Nafcillin was used as internal standard, not for quantitation, but only to check the effective recovery of the analytes. The results of the samples were corrected for the recovery value. This value was calculated for each molecule as the mean of 12 recovery experiments at two concentration levels (20 and 400 µg/l).

The limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of each antibiotic, defined as the injected amount giving a signal-to-noise ratio of 3 and 10 respectively, were determined by the analysis of spiked milk samples.

The percent of recovery of the antibiotics were calculated at two concentration levels (20 and 400 µg/l) from six spiked milk samples.

Results and discussion

Mass spectrometry

Ito Y. *et al.* (2001) described the use of electrospray ionization tandem mass spectrometry run in negative ion mode to detect residues of β-lactam antibiotics in tissues. Negative ion mode was tried but, in our laboratory, gave sensitivities from six to ten times lower than positive ion mode.

Several authors have already described the fragmentation pattern of penicillins (Siegel M. M. *et al.*, 1987; Tyczkowska K. *et al.*, 1989; Suwanrunpha S. *et al.*, 1988; Suwanrunpha S. and Freas R. B., 1989). In any case the most important mechanism of fragmentation of these molecules is the cleavage of the β-lactam ring that gives

origin to the fragment ion at m/z 160, which is class specific of penicillins, and its complementary m/z $[M+H-159]^+$ fragment which is compound-specific. Other ions are due to the loss of small lateral groups from the entire molecule or from the two described fragment ions.

The cleavage of the β -lactam ring can be described also for the cephalosporins. In the case of cephalexin the fragment ion at m/z 158 has the same origin of the m/z 160 ion found for penicillins. In this case the complementary ion is present too at m/z 192. The fragment ion at m/z 106 is due to the loss of the aromatic ring plus a carbon atom and the bound $-NH_2$. Concerning cephalixin the cleavage of β -lactam ring should produce two ions at m/z 208 and 215 that were not present in the product ion mass spectra. As a matter of fact, the fragmentation of the molecular ion of cephalixin gave origin to three ions respectively at m/z 141, 181 and 292. The first one could be produced from m/z 208 losing a carbonyl group and the second one from 215 losing the lateral group $-CH_2OCOCH_3$. The origin of m/z 292, the most abundant fragment ion, is unknown. In any case the m/z 424 ion is the father of m/z 292 as it has been confirmed by the precursor ion scan. Daeseleire E. *et al.* (2000) found the same ion and, being the most abundant fragment ion, used it for quantitation.

Analysis of the samples

Penicillin was found in 26 over the 53 analysed samples (24 at concentrations higher than the MRL and 2 lower). Amoxicillin was found only in 3 samples at concentrations higher than the MRL. Cephalixin was found in 2 samples at concentrations lower than the MRL. The results of the analytical determinations are presented in Table 2.

Only penicillin G, amoxicillin and cephalixin were detected in 29 over the 53 samples analysed. No other molecules were found and the reasons of this could be different:

The samples were false positive at the microbial test. Having false positive results is tolerable for a screening test that has to be very sensitive, but not very selective. The most important feature of screening tests is that they don't give false negative results.

Molecules different than those included in our method were present in the samples. This is possible because the number of molecules that can be used in the therapy of bovine mastitis is high. For the most recent molecules it is impossible to get the standards from commercial retailers.

The finding of penicillin G, amoxicillin and cephalixin is consistent with the broad use of these three molecules in the therapy of bovine mastitis and with the results of other studies.

Moats W. A. (1999) analysed by a confirmatory HPLC based method 54 samples found positive by β -lactam antibiotics screening tests. Penicillin G was detected in 20 samples, ampicillin in 3, amoxicillin in 1, cephalixin in 9, desacetylcephalixin in 2. In 12 samples no β -lactam antibiotics were detected. The prevalence of the molecules is a little different from that registered in this research. However, it has to be mentioned that the samples analysed by Moats had different origins. 50 samples were from different sources in the USA and 4 from Barbados.

Sample	Analyte	Concentration ($\mu\text{g/l}$)
12	penicillin G	6.4 \pm 0.6
15	penicillin G	39.6 \pm 4.1
16	amoxicillin	38.8 \pm 0.1
18	penicillin G	6240 \pm 450
19	penicillin G	140 \pm 28
20	penicillin G	90.3 \pm 4.1
21	penicillin G	155 \pm 3
22	penicillin G	829 \pm 9
23	penicillin G	102 \pm 1
25	amoxicillin	53.7 \pm 2.3
26	penicillin G	11.6 \pm 1.1
27	penicillin G	101 \pm 1
28	penicillin G	18.8 \pm 1
31	penicillin G	750 \pm 133
33	penicillin G	6.2 \pm 0.6
34	penicillin G	1380 \pm 100
35	penicillin G	1580 \pm 148
37	penicillin G	3.7 \pm 0.4
38	penicillin G	13.7 \pm 0.2
39	penicillin G	13.1 \pm 0.2
40	penicillin G	36.5 \pm 7.7
41	penicillin G	3.8 \pm 0.4
42	penicillin G	77.3 \pm 1.5
43	cephapirin	6.4 \pm 0.3
44	cephapirin	15.7 \pm 0.1
45	penicillin G	319 \pm 37
46	penicillin G	19.8 \pm 2.2
48	penicillin G	212 \pm 12
51	penicillin G	91.7 \pm 12.7
52	penicillin G	11.9 \pm 0.5
53	amoxicillin	8.5 \pm 0.1

Table 2: Concentrations of the analytes detected in each sample (mean \pm standard deviation). The samples were prepared in double. Sample 18 was diluted 1 to 5 in order to be determined within the linear range of the calibration curve.

Riediker S. *et al.* (2001) analysed by HPLC-MS/MS 18 samples found positive by screening tests. They detected amoxicillin in 4 samples, ampicillin in 3, cloxacillin in 7 and penicillin G in 8. In some cases more than one molecule was detected in one sample. In 2 samples no β -lactam antibiotics were detected (false positives). Also in this research penicillin G was the most detected β -lactam antibiotic.

The prevalence of false positives in that research is lower than that of the present research. This is due to the fact that they used a cross control between two different screening tests (Delvotest SP[®] and BetaStar[®]). It has been shown that Delvotest SP[®], used in this research, is not specific for β -lactam antibiotics, and it can give false positive results, especially if the somatic cells count is high (Kang J. H. and Kondo F., 2001) or after some feed supplementation (Romnee J. M. *et al.*, 1999). Delvotest SP[®] can become more specific for β -lactam antibiotics only if preceded or followed by β lactamase treatment. The fact that Riediker S. *et al.* had lower detection limits than those achieved by the method proposed here can explain only partially the difference.

53 is a representative sample of the population of the 549 samples found positive during 2001. We can, therefore, assume that penicillin G was present in 269 over 549 (49.1%) positive samples, amoxicillin in 31 (5.7%) and cephalirin in 21 (3.8%).

Conclusions

A fast confirmatory method able to detect residues of seven β -lactam antibiotics at sub M,R,L. levels was developed using HPLC-MS/MS. The mass spectrometric behaviour of these molecules was studied. The results obtained from the analytical determination performed over the samples we had from the Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna showed that, in Northern Italy, penicillin G is the β -lactam antibiotic which is present more frequently in milk as a residue. Amoxicillin and cephalirin too can be found as residues in milk, but less frequently and at levels lower than penicillin. In any case the prevalence of milk samples found positive at the microbial test is very low and it doesn't pose risks for the consumers' health. Some other new β -lactam molecules could be included in the method, but a certain difficulty to obtain the standards from the producers has to be mentioned.

Keywords: β -lactams, antibiotics, milk, HPLC-MS

ABSTRACT - There is a lack of information about which molecules of antibiotics are more often present as residues in milk. An HPLC-MS/MS method was then developed and used to confirm 53 bovine raw milk samples that were found positive by a microbial method (Delvotest SP®) at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale per la Lombardia e l'Emilia Romagna of Brescia (Italy) during 2001. Penicillin G was found in 26 samples at concentrations ranging from $3.7 \pm 0.4 \mu\text{g/l}$ to $6240 \pm 550 \mu\text{g/l}$. Amoxicillin was found in 3 samples at concentrations ranging from $8.5 \pm 0.1 \mu\text{g/l}$ to $53.7 \pm 2.3 \mu\text{g/l}$. Cephalirin was found in two samples at the concentration of $5.7 \pm 0.1 \mu\text{g/l}$ and $6.4 \pm 0.3 \mu\text{g/l}$.

from the Ph.D. thesis of Sergio Ghidini

References

- Berger, K., Petz, M., 1991, Fluorescence HPLC determination of penicillins using 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin as pre-column labelling agent. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **87**, 137-141.
- Commission Decision 93/256 of April 14, 1993. *Official Journal of the European Communities* 1993. L 118 (May 14).
- Commission Decision 93/257 of April 14, 1993. *Official Journal of the European Communities* 1993. L 118 (May 14).
- Commission Decision 657/2002 of August 12, 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*. L 221/8, (August 17).
- Daeseleire, E., De Ruyck, H., Van Renterghem, R., 2000, Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using LC/MS-

MS. *Proceedings of EuroResidue IV, Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*. Veldhoven (NL), data 333-338.

- Dewdney, J.M., Maes, L., Raynaud, J.P., Blanc, F., Scheid, J.P., Jackson, T., Lens, S., Verschuere, C., 1991, Risk assessment of antibiotic residues of β -lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chemistry and Toxicology*, **29**, 477-483.

- Edder, P., Cominoli, A., Corvi, C., 1999, Simultaneous analysis of seven penicillin residues in raw milk by liquid chromatography. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **90**, 291-304.

- EU regulation 2377/90. *Official Journal of the European Communities* L 224: 1-8.

- Faria Reyes, J. F., Allara Cagnasso, M. G., Arenas de Moreno, L., Marques Salas, E., Reyes, J. F. F., Salas, E. M., 2000, Extraction and quantification of penicillin G in raw milk by high performance liquid chromatography (HPLC). *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*. **10**, 212-221.

- Freeman T. R., 1953, Milk quality. *Journal of Milk Food Technology*, **15**, 162-166.

- Ito, Y., Ikai, Y., Oka, H., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Takeba, K., Nagase, H., 2001, Application of ion-exchange clean-up in food analysis IV. Confirmatory assay of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in bovine tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **911**, 217-223.

- Kang, J. H., Kondo, F., 2001, Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. *Journal of Food Protection*, **64**, 1211-1215.

- Kindred T. P. and Hubbert W. T., 1993, Residue prevention strategies in the U.S.A. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **202**, 46-49.

- Marchetti, M., Schwaiger, I., Schmid, E. R., 2002, Determination of benzylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin in cows' milk by ion-pair high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **371**, 64-67.

- Mitchell, J. L., Giffits, M. W., McEwen, S. A., McNab, W. B., Yee, A. J., 1998, Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *Journal of Food Protection*, **61**, 742-756.

- Moats, W. A., 1999, Confirmatory test results on milk from commercial sources that tested positive by β -lactam antibiotics screening tests. *Journal of AOAC International*, **82**, 1071-1076.

- Riediker, S. and Stadler, R. H., 2001, Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **73**, 1614-1621.

- Riediker, S., Diserens, J. M., Stadler, R. H., 2001, Analysis of β -lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4171-4176.

- Romnee, J. M., Raskin, P., Istasse, L., Laloux, J., Guyot, A., 1999, Incidence of complemented feed on false positive results with Delvotest SP (R) for detection of antibiotics in milk. *Lait*, **79**, 341-346.
- Siegel, M. M., Isensee, R. K., Beck, D. J., 1987, Thermospray mass spectrometer interface used as a flow reactor for in situ thermal degradation studies: applications to β -lactam antibiotics. *Analytical Chemistry*, **59**, 989-995.
- Sorensen, L. K., Rasmussen, B. M., Boison, J. O., Keng, L., 1997, Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography B*, **694**, 383-391.
- Suwanrumpha, S., Flory, D. A., Freas, R. B., 1988, Tandem mass spectrometric studies of the fragmentation of penicillins and their metabolites. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, **16**, 381-386.
- Suwanrumpha, S., Freas, R. B., 1989, Identification of metabolites of ampicillin using liquid chromatography/thermospray mass spectrometry and fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, **18**, 983-994.
- Taguchi, S., Yoshida, S., Tanaka, Y., Hori, S., 1999, Simple and rapid analysis of penicillins in milk by HPLC using multidimensional on-line clean-up and post-column photolysis with UV detection. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi)*, **40**, 375-381.
- Tyczkowska, K., Voyksner, R., Aronson, A. L., 1989, Development of an analytical method for penicillin G in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet-visible detection and confirmation by mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, **490**, 101-113.

PARAMETRI MORFOMETRICI E DENSITOMETRICI DI POLLI MASCHI DELLA LINEA GENETICA DEL BROILER COBB DURANTE I PRIMI DUE MESI DI VITA.

Gabbi C.¹, Cacchioli A.¹, Alpigiani I.¹, Borghetti P.², Martini F. M.³

Introduzione

La grande efficienza produttiva raggiunta nell'allevamento del pollo da carne trova le sue basi negli enormi progressi compiuti in tema di miglioramento genetico, di alimentazione e di tecnologie di allevamento.

L'avicoltura moderna si avvale infatti dei c.d. poliibridi commerciali ottenuti dall'incrocio di razze e "linee pure" opportunamente scelte in funzione della loro elevata produzione di carne, della rapidità di accrescimento, dell'efficienza manifestata nella utilizzazione dell'alimento e di altri parametri che concorrono ad ottimizzare la produttività dei medesimi (1, 11, 19, 20, 21 e 23).

In tale processo di selezione il c.d. "meat-type birds" può presentare anomalie a carico dell'apparato scheletrico di origine multifattoriale che trovano espressione in turbe che colpiscono in particolare le ossa lunghe degli arti (16 e 22).

Fattori genetici, fattori nutrizionali e d'allevamento sono quelli maggiormente chiamati in causa per giustificare le notevoli perdite economiche che, ancora oggi, si verificano negli allevamenti intensivi a causa delle difficoltà che molti animali devono affrontare in fase di deambulazione.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo rivolto la nostra attenzione alla linea genetica del broiler Cobb 500, nota ormai da molto tempo, per la sua elevata velocità di crescita e per la sua alta resa in carne.

Negli ultimi 20 anni vi è stata una rapida evoluzione delle tecniche non invasive di determinazione quantitativa della massa ossea, per cui attualmente si dispone di diversi strumenti, capaci di effettuare con sufficiente precisione ed accuratezza la misurazione della densità minerale dell'osso (BMD, bone mineral density). Mentre alcune tecniche sono ancora in fase di sperimentazione, come nel caso di quelle ultrasonore, altre, come la densitometria a singolo raggio fotonico (SPA), a doppio raggio fotonico (DPA), a singolo raggio X (SXA) ed a doppio raggio X (DEXA), sono divenute di impiego routinario ed è ad esse che in genere si ricorre nelle diagnosi.

Il principio sul quale è fondato l'uso di queste metodiche è che l'assorbimento da parte dell'osso di un quantitativo di radiazioni sia dipendente dalla densità minerale.

(1) Dipartimento di Salute Animale – Sezione di Anatomia degli Animali di Interesse Medico Veterinario.

(2) Dipartimento di Salute Animale – Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica.

(3) Dipartimento di Salute Animale – Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza.

La densitometria è in grado di calcolare la densità minerale ossea, come differenza tra l'energia incidente il segmento osseo o la parte corporea ove è posto il segmento scheletrico da esaminare, e l'energia residua o emergente.

Tali metodiche sono ormai entrate nell'uso routinario in ambito umano affiancando o sostituendo altri tipi di esami diagnostici, e anche nell'ambito medico veterinario stanno riscuotendo un notevole interesse (18 e 25).

Il fine di questo lavoro è quello di determinare le caratteristiche morfometriche e densitometriche del femore e del tibiotarso di polli maschi della linea genetica del broiler Cobb 500 nei primi due mesi di vita. Al fine di raccogliere dati, riconducibili all'ambito fisiologico, sono stati presi in considerazione solo quei soggetti che non presentavano sintomatologie cliniche.

Materiali e metodi

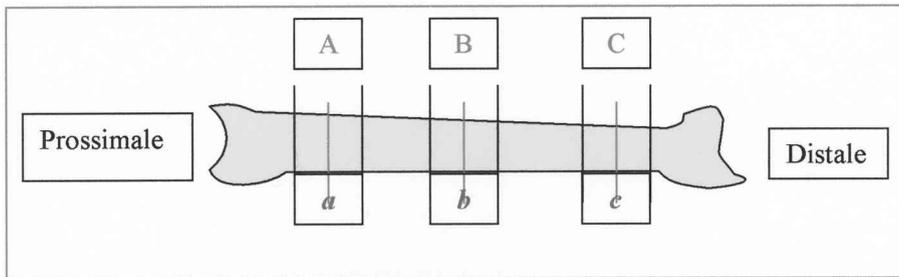
Per la sperimentazione sono stati presi in considerazione 30 polli suddivisi in 3 gruppi: il primo gruppo a 28 giorni dalla nascita, il secondo gruppo a 38 giorni e l'ultimo gruppo a 55 giorni (macellazione). Gli animali sono stati allevati con uso esclusivo di proteine di origine vegetale, ed erano inseriti nella normale rete di distribuzione. Il capannone, nel quale gli animali erano liberi di muoversi a terra, è dotato di ventilazione forzata ed impianto di illuminazione, programmato, a partire dalla 2^a settimana di vita, per assicurare 12 ore di luce e 12 ore di buio.

Nel corso della prova si è proceduto al controllo giornaliero dello stato di salute degli animali e nei tre momenti indicati (28, 38 e 55 giorni dalla nascita) si è provveduto al controllo del peso di 100 animali presi a caso tra gli animali accasati nel capannone (Animali totali accasati nel capannone 22.500), quindi al prelievo di 10 animali, scelti a caso tra i cento, che sono stati sacrificati per le indagini successive. Da ciascun animale sono stati prelevati ed isolati femore, tibio-tarso e fibula. Dopo una attenta analisi morfologica si è proceduto alla valutazione della lunghezza, del volume e alla determinazione densitometrica mediante sistema di emissione a raggi X di tipo Dexa con filtro di Samario, denominato Unigamma Plus/P Compact fornito dalla ditta L'ACN di Cerro Maggiore (MI).

La lunghezza dei segmenti è stata effettuata mediante un calibro al quale sono stati maggiorati i becchi per aumentare la superficie di contatto con le epifisi. I segmenti ossei sono stati posizionati con la faccia caudale appoggiata al piano di lavoro e con l'asse parallelo all'asta del calibro. Il volume è stato misurato valutando l'aumento del livello del liquido, prodotto dalla completa immersione del segmento osseo in esame, all'interno di un cilindro graduato opportunamente riempito con acqua distillata. La determinazione densitometrica è stata eseguita solo sul femore e sul tibiotarso degli arti sinistri perché dai dati in nostro possesso e non ancora pubblicati, si è evidenziato che non esistono differenze statisticamente apprezzabili tra i segmenti ossei controlaterali; pertanto i segmenti ossei controlaterali, utilizzati in questa sperimentazione, sono da considerarsi appartenenti ad un identico gruppo statistico. Si è proceduto posizionando i segmenti ossei sul piano dello strumento mediante la faccia caudale. Lo strumento ha effettuato la determinazione suddividendo i segmenti ossei in quattro aree (ogni area presenta l'altezza pari a $\frac{1}{4}$ della lunghezza del segmento) denominate, in senso prossimo-distale, con le sigle: L4, L3, L2

e L1; pertanto sono stati raccolti i valori di densità media dell'intero segmento osseo e delle quattro aree indicate (Schemi n° 2 e 3).

Successivamente si è proceduto alla misura del diametro (latero-laterale e cranio-caudale) a livello delle linee: *a*, *b* e *c*, poste rispettivamente, procedendo in senso prossimo distale, a: $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e a $\frac{3}{4}$ della lunghezza totale del segmento osseo, come evidenziato nella figura che segue (Schema n° 1). Si è poi proceduto al prelievo di 3 porzioni per ciascun segmento osseo per procedere, previa inclusione in resina (5), all'analisi microscopica delle sezioni trasversali in corrispondenza del punto medio del segmento. Le tre porzioni, dalla lunghezza di 1 cm, indicate con le lettere A, B e C, presentano, rispettivamente, come punto medio le linee: *a*, *b* e *c* (Schema n° 1).



Schema n° 1

L'analisi microscopica è stata effettuata mediante l'utilizzo di un microscopio ottico (Zeiss) e di uno stereomicroscopio (Nikon) dotati di luce polarizzata e di un sistema di analisi di immagine computerizzato (MicroImage, Casti Imaging s.r.l.).

Gli animali sono stati forniti dall'Azienda agricola CASAR di Morandini Denis e Michele con sede in Località Casar a Valeggio sul Mincio (VR), che si ringrazia per la disponibilità dimostrata.

Risultati e discussione

Analisi morfologica

Dall'analisi morfologica, per la quale ci si è avvalsi anche di osservazioni radiologiche (6), è parsa evidente la persistenza delle cartilagini di accrescimento ai tre tempi sperimentali anche se, al terzo tempo, tali zone erano relegate a livello delle epifisi prossimali e distale dei segmenti ossei presi in considerazione.

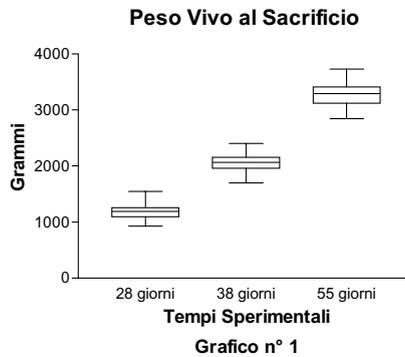
I centri di ossificazione primari, a 55 giorni dalla nascita, hanno quasi del tutto esaurito il compito relativo all'allungamento del segmento osseo, rimangono attivi per il modellamento dell'epifisi distale e prossimale del femore. Relativamente al tibiotarso sono ancora attivi i centri di ossificazione secondari: a livello dell'epifisi prossimale e a livello della porzione distale della tibia e delle ossa tarsali (3, 6, 7, 12, 13 e 14).

La fibula è particolarmente lunga, raggiunge i $\frac{3}{4}$ della lunghezza del tibiotarso, caratteristica distintiva di alcune razze definite "Pesanti" (Cobb, Ross, Creeper, etc.) (10).

Peso vivo al Sacrificio

Il peso vivo dei polli al sacrificio, ai 3 tempi sperimentali, come appare nella tabella e dal grafico n° 1, presenta un andamento rettilineo. La dispersione dei pesi attorno al valore medio aumenta progressivamente nei vari tempi sperimentali, vedi Grafico n° 1, mostrando un aumento della variabilità all'interno dei gruppi (Bartlett's test – Valore di $P < 0,0001$).

Tabella n° 1	28 giorni	38 giorni	55 giorni
N° valori	100	100	100
Media	1185	2067	3283
DS	110,8	137,0	190,3

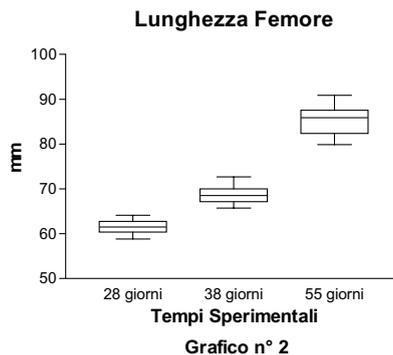


Lunghezza dei segmenti ossei presi in considerazione.

FEMORE

Relativamente al femore si nota che il massimo aumento in lunghezza avviene nell'ultimo periodo sperimentale, come si evince dal Grafico n° 2. Parallelamente all'incremento della lunghezza si ha anche un aumento della variabilità all'interno dei gruppi presi in considerazione, come indicato dai valori di deviazione standard e dal Bartlett's test – Valore di $P < 0,0155$).

Tabella n°2	28 giorni	38 giorni	55 giorni
Number of values	20	20	20
Mean	61,49	68,85	85,43
Std. Deviation	1,665	2,301	3,283



TIBIOTARSO

Il Tibiotarso presenta un accrescimento in lunghezza che si accentua nell'ultimo periodo sperimentale, mantenendo una discreta omogeneità dimensionale, come si evince dalla tabella e dal grafico n° 3

Tabella n° 3	28 giorni	38 giorni	55 giorni
Number of values	20	20	20
Mean	84,22	95,47	127,3
Std. Deviation	3,369	3,226	2,630

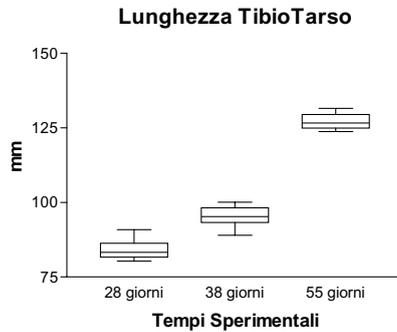


Grafico n° 3

Volume dei segmenti ossei presi in considerazione.

FEMORE

Il periodo di massimo incremento volumetrico si esaurisce nei primi 38 giorni così come la variabilità all'interno dei gruppi.

Tabella n° 4	28 giorni	38 giorni	55 giorni
Number of values	20	20	20
Mean	10,43	13,60	14,40
Std. Deviation	0,9262	1,789	1,957

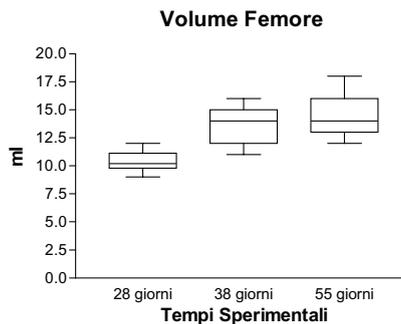
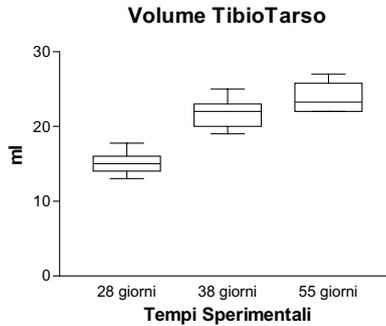


Grafico n° 4

TIBIOTARSO

Anche per questo segmento osseo il massimo incremento volumetrico avviene nei primi 38 giorni di vita; la variabilità all'interno dei gruppi è relativamente costante.

Tabella n° 5	28 giorni	38 giorni	55 giorni
Number of values	20	20	20
Mean	15,12	21,85	23,78
Std. Deviation	1,529	2,014	1,926

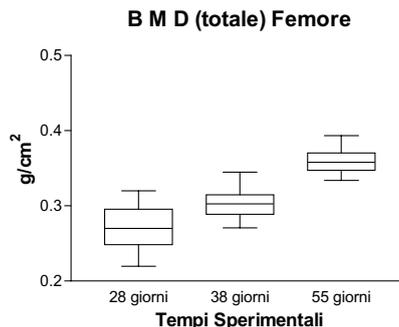


Bone Mineral Density Totale dei segmenti ossei presi in considerazione.

FEMORE

L'analisi indica un aumento costante della densità media indicando una bassa variabilità all'interno dei tre gruppi.

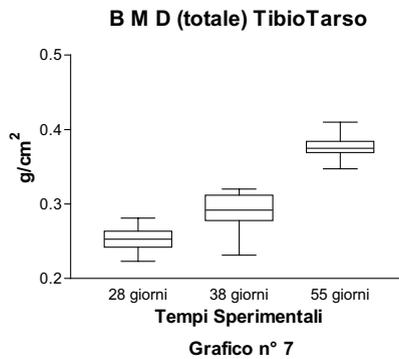
Tabella n° 6	28 giorni	38 giorni	55 giorni
Number of values	20	20	20
Mean	0,2704	0,3048	0,3595
Std. Deviation	0,02823	0,02115	0,01574



TIBIOTARSO

La densità media aumenta nei tre tempi sperimentali; l'incremento maggiore avviene nell'ultimo periodo preso in considerazione. Buona l'omogeneità all'interno dei gruppi.

Tabella n° 7	28 giorni	38 giorni	55 giorni
Number of values	20	20	20
Mean	0,2531	0,2886	0,3768
Std. Deviation	0,01628	0,02621	0,01456

**Bone Mineral Density Parziale dei segmenti ossei presi in considerazione.****FEMORE**

Con questo tipo di analisi, che suddivide il segmento osseo in quattro aree, è possibile evidenziare in modo più dettagliato l'andamento della densità ossea media (Schema n° 2).

La zona che ha raggiunto la massima densità ossea è quella indicata con L2. Quella che ha avuto il massimo incremento è la L1 che comprende l'epifisi distale del segmento osseo.

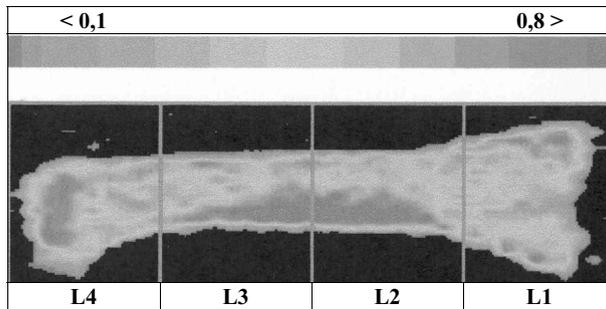
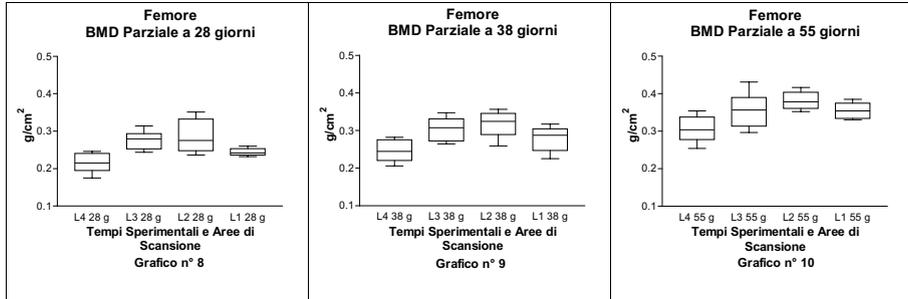
Anche la zona L4, che comprende l'epifisi prossimale, presenta un buon incremento.

Questi dati sono avvalorati dall'analisi morfologica sopra riportata, infatti è ancora presente l'attività dei centri di ossificazione.

Tabella n°8	L4 28 g	L3 28 g	L2 28 g	L1 28 g
Number of values	10	10	10	10
Mean	0,2171	0,2756	0,2871	0,2438
Std. Deviation	0,02382	0,02269	0,04223	0,009402

Tabella n°9	L4 38 g	L3 38 g	L2 38 g	L1 38 g
Number of values	10	10	10	10
Mean	0,2472	0,3033	0,3160	0,2775
Std. Deviation	0,02724	0,02888	0,03137	0,03081

Tabella n°10	L4 55 g	L3 55 g	L2 55 g	L1 55 g
Number of values	10	10	10	10
Mean	0,3069	0,3559	0,3810	0,3543
Std. Deviation	0,03205	0,04268	0,02222	0,01938



Schema n° 2

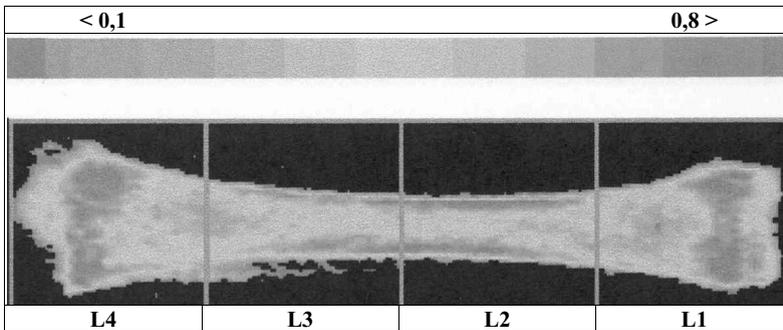
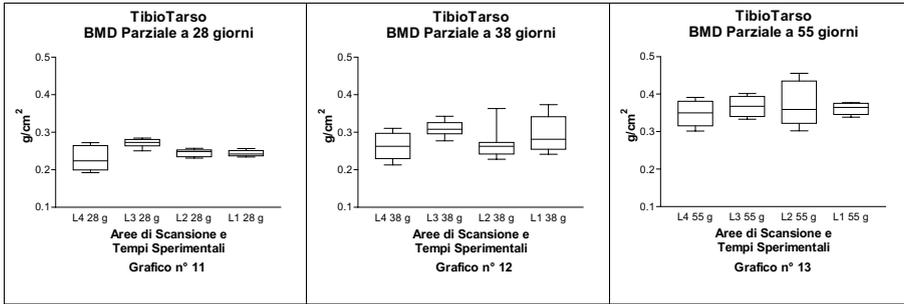
TIBIOTARSO

La zona che ha raggiunto la massima densità ossea risulta la L2. Le aree L4 e L1 sono quelle che hanno avuto la maggior crescita di densità; tali aree rappresentano, rispettivamente, l'epifisi prossimale e distale del segmento osseo, dove, come già evidenziato, sono ancora attivi i centri di ossificazione secondari.

Tabella n° 11	L4 28 g	L3 28 g	L2 28 g	L1 28 g
Number of values	10	10	10	10
Mean	0,2297	0,2715	0,2448	0,2438
Std. Deviation	0,03040	0,01052	0,009496	0,007480

Tabella n° 12	L4 38 g	L3 38 g	L2 38 g	L1 38 g
Number of values	10	10	10	10
Mean	0,2634	0,3097	0,2667	0,2943
Std. Deviation	0,03445	0,01894	0,03711	0,04567

Tabella n° 13	L4 55 g	L3 55 g	L2 55 g	L1 55 g
Number of values	10	10	10	10
Mean	0,3473	0,3664	0,3718	0,3612
Std. Deviation	0,03227	0,02630	0,05590	0,01479



Schema n° 3

Diametro: Latero-Laterale (ll) – Cranio-Caudale (cc) – Diametro Medio (m) ai vari livelli.

FEMORE

Si può affermare che il valore del diametro, preso ai tre livelli indicati, presenta un aumento costante. L'incremento maggiore, sia al computo (L-L) sia a quello (C-C), si ha a livello della linea c.

Tab. 14	A-ll-28	A-ll-38	A-ll-55	A-cc-28	A-cc-38	A-cc-55	A-m-28	A-m-38	A-m-55
N°	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean	8,390	8,250	11,48	9,830	10,51	12,66	9,110	9,380	12,07
S. D.	1,342	1,753	2,208	1,862	1,738	3,021	0,5685	0,8417	1,045

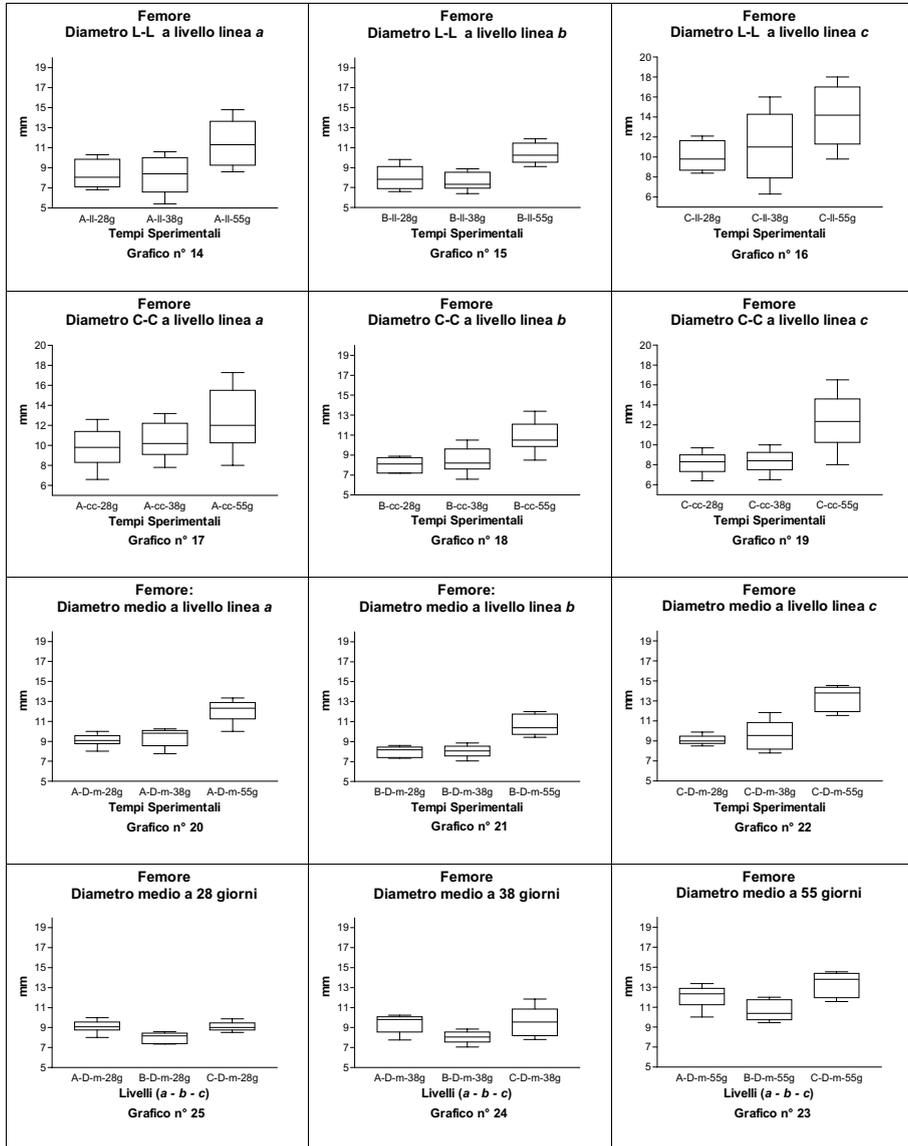
Tab. 15	B-ll-28	B-ll-38	B-ll-55	B-cc-28	B-cc-38	B-cc-55	B-m-28	B-m-38	B-m-55
N°	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean	7,980	7,600	10,43	8,020	8,500	10,91	8,000	8,050	10,67
S. D.	1,112	0,8327	0,9967	0,6680	1,205	1,456	0,5083	0,5622	0,9939

Tab. 16	C-ll-28	C-ll-38	C-ll-55	C-cc-28	C-cc-38	C-cc-55	C-m-28	C-m-38	C-m-55
N°	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean	10,06	10,95	14,16	8,180	8,350	12,38	9,120	9,650	13,27
S. D.	1,373	3,238	2,912	0,9886	1,075	2,586	0,4257	1,332	1,198

Note per le tabelle

A = Linea a; B = Linea b; C = Linea c. ll = L-L; cc = C-C

FEMORE



Diametro: Latero-Laterale (ll) – Cranio-Caudale (cc) – Diametro Medio (m) ai vari livelli.

TIBIOTARSO

Il valore del diametro presenta un aumento costante a livello delle tre linee di rilevamento. Nel computo (L-L), si raggiunge un aumento di 5 mm sia a livello della linea a sia a livello della linea c.

Nel computo (C-C) il massimo incremento si ha a livello della linea a.

Tab. 17	A-ll-28	A-ll-38	A-ll-55	A-cc-28	A-cc-38	A-cc-55	A-m-28	A-m-38	A-m-55
N°	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean	10,09	11,31	15,17	10,36	10,67	13,90	10,23	10,99	14,54
S. D.	0,6367	1,919	0,7917	1,267	1,172	1,785	0,4455	0,7152	0,6908

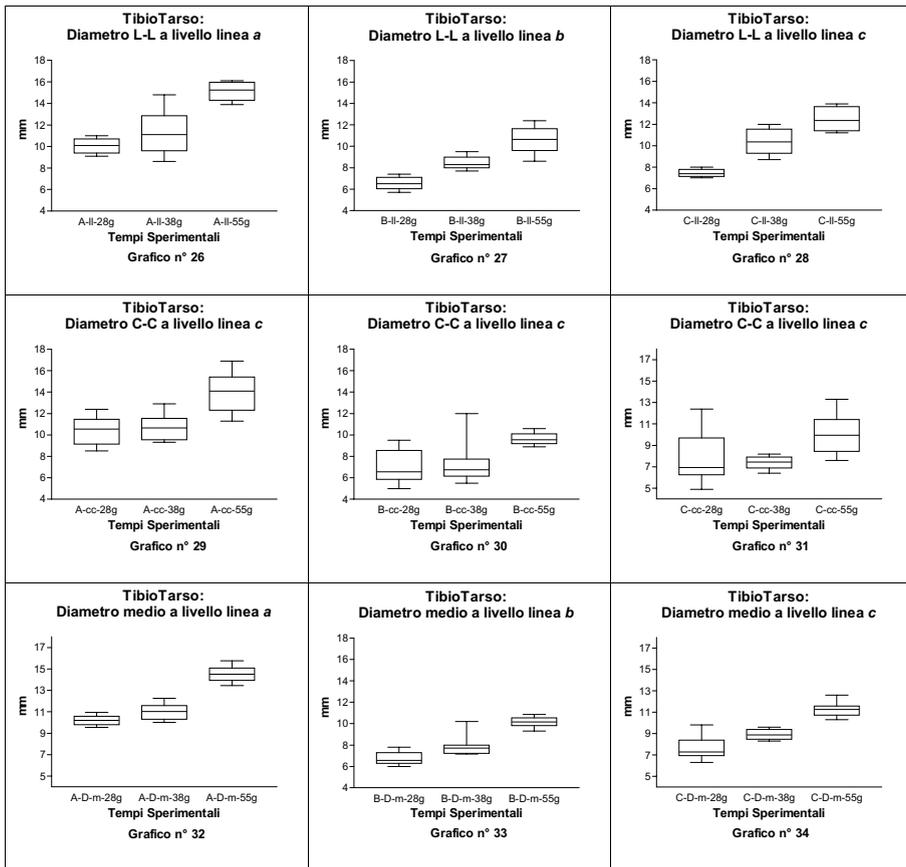
Tab. 18	B-ll-28	B-ll-38	B-ll-55	B-cc-28	B-cc-38	B-cc-55	B-m-28	B-m-38	B-m-55
N°	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean	6,520	8,480	10,64	7,010	7,250	9,660	6,765	7,865	10,15
S. D.	0,5594	0,5789	1,174	1,496	1,834	0,5275	0,5826	0,8785	0,4435

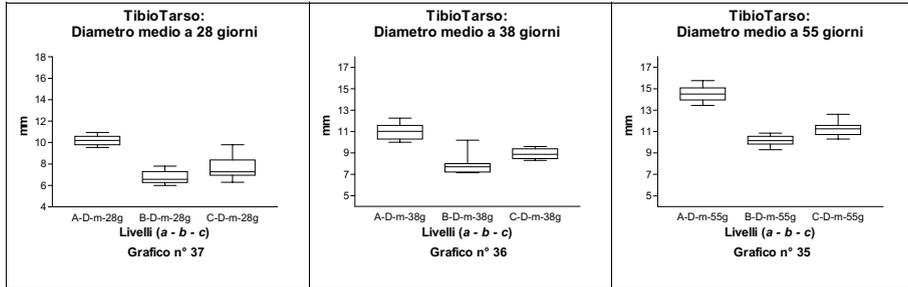
Tab. 19	C-ll-28	C-ll-38	C-ll-55	C-cc-28	C-cc-38	C-cc-55	C-m-28	C-m-38	C-m-55
N°	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean	7,450	10,43	12,48	7,890	7,400	10,02	7,670	8,915	11,25
S. D.	0,3440	1,151	1,024	2,305	0,5617	1,770	1,027	0,4503	0,6595

Note per le tabelle

A = Linea a; B = Linea b; C = Linea c. ll = L-L; cc = C-C

TIBIOTARSO





Analisi microscopica.

Per la descrizione si è provveduto a dividere le sezioni trasversali in 4 parti, così denominate in base agli assi di riferimento: Craniale, Caudale, Laterale e Mediale.

FEMORE – 28 giorni.

Osservazioni a livello della linea a.

Osservando i preparati al microscopio ottico a luce polarizzata si evidenzia, complessivamente, una organizzazione plessiforme del tessuto osseo (17), con ampi spazi tra le esili travate ossee, paragonabile all'organizzazione del tessuto osseo spugnoso.

Nelle porzioni laterali e mediali si osservano varie strutture osteoniche con canali centrali molto ampi, superiori a 45 - 50 μm di diametro. Il periostio è ben evidente e spesso. La porzione ossea a contatto con il periostio ha un aspetto fortemente irregolare, dovuto alla deposizione ossea in forma di trabecole variamente intrecciate ad andamento longitudinale (4), che permette, nelle fasi di accrescimento osseo, un notevole interscambio tra le varie componenti del distretto osseo.

Osservazioni a livello della linea b.

Nelle osservazioni a basso ingrandimento si evidenzia una organizzazione radiale (17). La maggior parte delle fibre appaiono orientate parallelamente. Nell'area cranio-mediale si evidenzia una organizzazione laminare che presenta ampie discontinuità, sia a livello periostale sia a livello endostale. Tra le due lamine si osservano strutture osteoniche, orientate longitudinalmente, con ampi spazi vascolari superiori a 45 μm di diametro.

Osservazioni a livello della linea c.

Il tessuto osseo, in via di organizzazione, nelle porzioni, laterali, mediali e caudali, appare organizzato in modo plessiforme (17). In particolare nelle porzioni caudali si individua la presenza di un'ampia zona di tessuto osseo, a ridosso del periostio, a fibre intrecciate. La porzione craniale presenta una organizzazione laminare (17) a livello periostale. Tali lamine presentano ampi spazi vascolari. Procedendo verso la cavità midollare continua l'organizzazione laminare che risulta più compatta e con la presenza di numerose organizzazioni osteoniche.

Si può affermare che relativamente alle osservazioni a 28 giorni, la porzione craniale sopra descritta presenti la parte più compatta di tessuto osseo.

TIBIOTARSO – 28 giorni.

Osservazioni a livello della linea a.

Si apprezza una organizzazione plessiforme con ampi spazi tra le varie trabecole; si evidenziano numerosi vasi (Fig. 1-E). Le fibre appaiono, per lo più, orientate in modo parallelo. La componente periostale è abbondante e si interdigita con le trava-

te del tessuto osseo orientate ortogonalmente alla superficie periostale. Tale organizzazione permette continui scambi tra il periostio ed i tessuti sottostanti.

Osservazioni a livello della linea b.

Si apprezza una organizzazione uniforme nella quale prevalgono travate ossee disposte radialmente. A maggior ingrandimento (Visione con Stereomicroscopio a luce polarizzata, ingrandimento 8X), si evince che l'aspetto radiale è dovuto alla presenza di travate ossee disposte a formare un intreccio plessiforme fortemente orientato in senso radiale. Gli spazi tra le travate ossee sono decisamente meno ampi di quelli osservati nelle analoghe strutture a livello della linea *a* appena sopra descritta.

È possibile individuare una zona, che chiameremo "centrale" in accordo con Leblanc et al. (15), posta a ridosso del canale midollare, nella quale le travate ossee sono fiancheggiate ed in parte sostituite da strutture osteoniche, orientate longitudinalmente, con canale centrale più piccolo di quelli fin qui osservati (inferiori ai 35 μm di diametro).

Anche nella zona periferica, ad eccezione della parte mediale, sono evidenziabili alcune strutture osteoniche che presentano un canale centrale con diametro quasi doppio rispetto a quelli della zona centrale (Fig. 1-F).

Osservazioni a livello della linea c.

Alla visione panoramica è possibile individuare varie tipologie di organizzazione del tessuto osseo. La porzione caudale (che a questo livello corrisponde alla faccia omonima), appare costituita da strutture osteoniche con canale centrale di ridotte dimensioni e nettamente omogenei (Diametro medio 24 μm , D.S. 2,5 μm). Gli osteoni sono uniti da travate ossee, a fibre parallele, ad andamento circonferenziale.

La superficie del tessuto osseo a contatto con il periostio appare più omogenea e continua rispetto alla situazione che si osserva nelle altre porzioni, dove le travate ossee risultano perpendicolari alla superficie periostale. Sono, comunque, presenti numerosi spazi dove è evidente il contatto diretto tra la componente periostale e gli spazi vascolari presenti tra le travate ossee.

Le porzioni mediali e laterali presentano una organizzazione plessiforme con la presenza di strutture osteoniche che presentano un canale centrale con diametro molto ampio (Diametro medio 39 μm , D.S. 3 μm).

La porzione craniale è suddivisibile in due sotto-porzioni. La sotto-porzione centrale presenta una organizzazione radiale, con la presenza di qualche struttura osteonica. La sotto-porzione periferica o periostale si presenta plessiforme con ampi spazi tra le travate ossee.

FEMORE – 38 giorni.

Osservazioni a livello della linea a.

Le porzioni craniale e caudale presentano una organizzazione plessiforme caratterizzata da ampi spazi vascolari.

La porzione mediale presenta una organizzazione radiale con rare strutture osteoniche che presentano ampi canali centrali (Diametro di circa 40 – 50 μm).

La porzione laterale si presenta più compatta a struttura plessiforme con ridotti spazi vascolari e organizzazioni osteoniche caratterizzate da canali centrali più piccoli rispetto a quelle appena descritti (Diametro di circa 20 – 25 μm).

La componente periostale è abbondante e a contatto con le travate ossee disposte, per lo più, perpendicolarmente ed obliquamente al periostio.

Osservazioni a livello della linea b.

Si osserva una organizzazione radiale. Le lamine ossee di maggior calibro ad andamento radiale conferiscono tale aspetto a tutta la sezione (Fig. 1-C).

Nelle porzioni laterale e mediale si individua una struttura laminare ad andamento circolare, che divide in due parti uguali la "corticale".

Tra le lamine ad andamento radiale si evidenziano osteoni che presentano una cavità centrale dal diametro che varia tra i 30 ed i 40 μm . La componente periostale è abbondante.

Osservazioni a livello della linea c.

La porzione craniale è la più omogenea. Per brevi tratti si evidenziano zone laminari, ad andamento circolare, a contatto con il periostio. Le lamine ossee, infarcite con strutture osteoniche, presentano andamento circolare ed obliquo rispettivamente nella parte interna ed esterna.

Le restanti porzioni presentano una organizzazione plessiforme che si rende più compatta per la presenza di strutture osteoniche nella parte esterna.

TIBIOTARSO – 38 giorni.

Osservazioni a livello della linea a.

Presenta una organizzazione plessiforme con lacune molto ampie. La componente periostale si continua nelle ampie cavità delimitate dalle sottili trabecole ossee (Fig. 1-A).

Osservazioni a livello della linea b.

Presenta una organizzazione radiale divisa in due porzioni, esterna ed interna, di uguale spessore, costituita da strutture laminari ad andamento circolare. La parte periostale della porzione esterna presenta una organizzazione plessiforme e là interrotta da brevi complessi laminari ad andamento circolare.

Rare e poco omogenee sono le strutture osteoniche; esse presentano, per la maggior parte, un canale centrale ampio (Diametro medio 46,6 μm , D.S. 13,7 μm).

La porzione interna è ricca di strutture osteoniche che le conferiscono maggior compattezza (Diametro medio 22,2 μm , D.S. 7,02 μm).

Osservazioni a livello della linea c.

La faccia caudale appare organizzata in lamine ossee ad andamento circolare con interposte strutture osteoniche che presentano un canale centrale abbastanza piccolo che varia tra i 15 ed i 20 μm di diametro.

Le porzioni laterali e mediali presentano una organizzazione plessiforme ricca di strutture osteoniche con ampi canali centrali (Diametro di circa 30 – 40 μm).

La porzione craniale presenta una organizzazione radiale con ampi spazi tra le travate ossee.

Il tessuto osseo a contatto con il periostio è organizzato in modo plessiforme.

FEMORE – 55 giorni.

Osservazioni a livello della linea a.

La corticale, quasi del tutto compatta, presenta un sottile e non continuo strato di osso spugnoso a livello della cavità midollare. Evidenti gli spazi vascolari.

Alla osservazione con la luce polarizzata si evidenzia bene l'organizzazione del tessuto osseo; questo appare a fibre parallele strutturato a formare osteoni o lamine rettilinee che si susseguono senza palesare un ordinamento preferenziale (Fig. 1-D).

A livello periostale il tessuto osseo appare, per lo più, organizzato in strutture laminari pur con la presenza di ampie discontinuità.

Osservazioni a livello della linea b.

La porzione mediale risulta compatta e costituita da lamine ossee ad andamento circonferenziale. Sono evidenti strutture osteoniche con piccoli canali centrali (15 – 20 μm di diametro). Tra le lamine sono evidenti sottili canali vascolari.

Nelle altre porzioni prevale l'organizzazione radiale con la presenza di numerose strutture osteoniche con caratteristiche simili a quelle appena descritte.

Il tessuto osseo a contatto con il periostio appare, ad ampi tratti, organizzato in lamine ad andamento circonferenziale.

Osservazioni a livello della linea c.

La corticale risulta costituita da uno strato esterno o periostale compatto e da un più ampio strato endostale caratterizzato da osso spugnoso, che delimita ampi spazi vascolari.

Il tessuto osseo spugnoso è, particolarmente, presente nelle porzioni laterale e mediale.

Nella porzione caudale è prevalente la disposizione radiale delle lamine ossee rispetto alla organizzazione osteonica che prevale nelle altre porzioni.

La componente periostale è ridotta, anche se il tessuto osseo limitrofo si presenta ancora organizzato in travate ad andamento radiale.

TIBIOTARSO – 55 giorni.

Osservazioni a livello della linea a.

La porzione craniale e la porzione laterale risultano costituite da osso spugnoso che delimita ampi spazi vascolari (Fig. 1-B).

Le altre porzioni presentano tessuto osseo ad organizzazione osteonica con canali centrali dal diametro compreso tra i 40 e 45 μm .

La componente periostale risulta di notevole spessore e in continuità con gli spazi delimitati dalle travate dell'osso spugnoso.

Osservazioni a livello della linea b.

Le porzioni caudale e mediale presentano una organizzazione radiale suddivisibile in una parte esterna, caratterizzata da travate ossee con ampi spazi vascolari, ed in una parte interna dove le travate sono delimitate da sottili spazi vascolari. Le due zone sono, generalmente, delimitate da una più o meno continua travata ossea, costituita da fibre parallele e ad andamento circonferenziale.

Le rimanenti porzioni sono organizzate in strutture osteoniche frammiste a formazioni laminari ad andamento prevalentemente circonferenziale.

Il tessuto osseo a contatto con il periostio presenta ampie fenestrature che gli conferiscono un aspetto punteggiato.

Osservazioni a livello della linea c.

La porzione caudale risulta compatta e organizzata in lamine ossee ad andamento, per lo più, circonferenziale. Si evidenziano vari piccoli osteoni sparsi tra le lamine.

Le porzioni laterale e mediale risultano costituite da lamine ad andamento circonferenziale e da numerosi osteoni con ampi spazi vascolari centrali che conferiscono alle porzioni un aspetto poco compatto.

La porzione craniale presenta una organizzazione radiale dove le travate ossee sono fraposte a strutture osteoniche che presentano un canale centrale dal diametro compreso tra i 40 e 45 μm .

Il tessuto osseo a contatto con il periostio presenta una struttura plessiforme

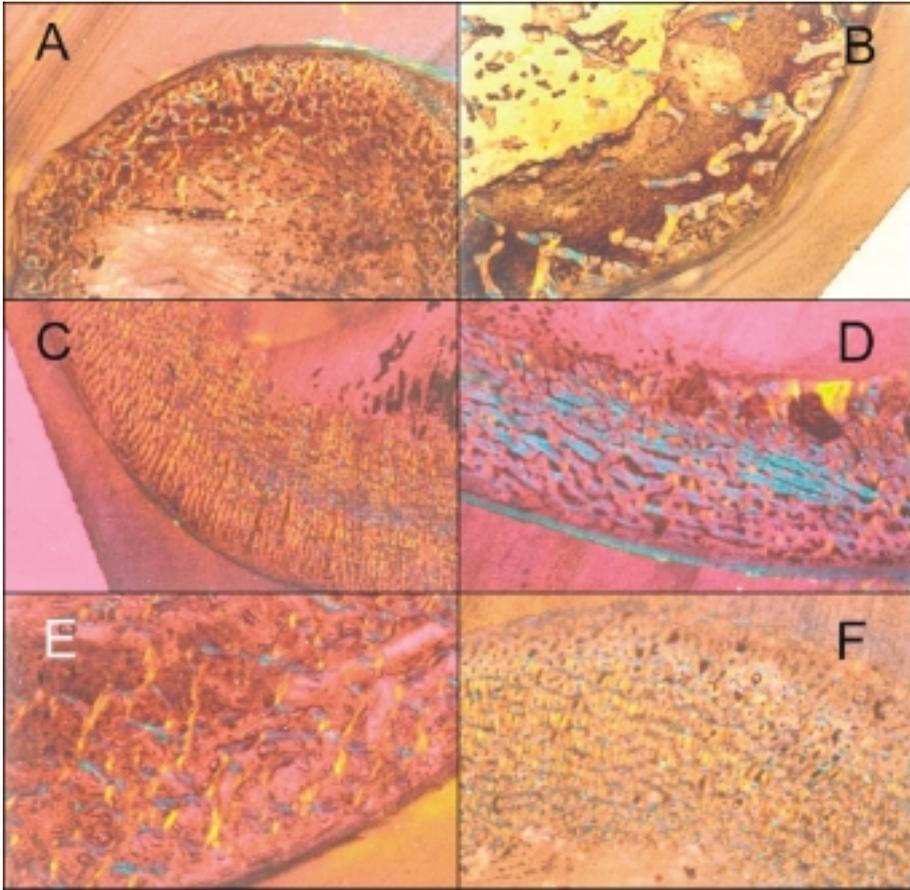


Figura 1 - (A, B, C, D, E, F). Immagini, da stereomicroscopio con luce polarizzata, relative alle varie organizzazione del tessuto osseo riscontrate nel femore e nel tibiotarso.

A: Organizzazione plessiforme. Ing. 4X. Tibiotarso 38gg a livello della linea a. **B:** Tessuto osseo spugnoso a diretto contatto con il periostio. Ing. 10X. Tibiotarso 55gg a livello della linea a. **C:** Organizzazione plessiforme. Ing. 4X. Femore 38 gg a livello della linea b. **D:** Organizzazione laminare. Ing. 8X. Femore 55 gg a livello della linea a. **E:** Organizzazione plessiforme con ampi spazi tra le trabecole ossee. Ing. 12X. Tibiotarso 28gg a livello della linea a. **F:** Organizzazione osteonica. Le strutture osteoniche sono fiancheggiate da travate ossee. Ing. 4X. Tibiotarso 28gg a livello della linea b.

Considerazioni

Le osservazioni raccolte utilizzando vari approcci metodologici ci hanno consentito di disegnare un ampio quadro delle caratteristiche morfologiche, densitometriche e strutturali del Femore e del Tibiotarso di polli maschi della linea genetica del Broiler Cobb 500.

L'analisi macroscopica prima, e microscopica poi, ci hanno permesso di evidenziare la presenza di un tessuto osseo, a fibre intrecciate e a fibre parallele, che si va organizzando, passando da una struttura plessiforme (17) ai 28 giorni, con ampi spazi vascolari, ad una più compatta ai 55 giorni. I segmenti ossei non hanno, comunque raggiunto la loro piena maturità sia a livello delle sezioni sottoposte all'analisi microscopica sia per la persistenza dei centri di ossificazione primario nel Femore e secondari nel Tibiotarso.

L'analisi densitometrica parziale convalida i risultati ottenuti dalla analisi macro e microscopica evidenziando la capacità di questa tecnica di saper individuare accuratamente le caratteristiche di compattezza e di densità delle varie porzioni del segmento osseo. È auspicabile l'implementazione di tale strumentazione al fine di poter ottenere analisi di tipo TAC (Tomografia Assiale Computerizzata) al fine di poter meglio confrontare l'operatività della macchina con la singola sezione istologica.

Interessanti sono i dati relativi al volume dei segmenti ossei. Si nota in modo evidente che il massimo incremento si ha nei primi 28 giorni di vita ed in modo più accentuato nel Femore. Vari autori (2, 8, 9, 17 e 24) evidenziano questo dato in varie linee genetiche di Broiler ed associano l'aumento di volume ad una abnorme crescita ponderale.

Il BMD totale presenta un incremento non del tutto costante; nel tibiotarso in particolare modo, si evidenzia un rallentamento al rilevamento a 38 giorni. L'analisi BMD parziale evidenzia che tale rallentamento è da ascrivere, egualmente, alle zone L1 e L3 che corrispondono rispettivamente all'epifisi prossimale ed alla metà prossimale della diafisi. Certa e già ampiamente descritta la motivazione relativa alla zona L1, meno evidente da interpretare il dato relativo alla zona L3, anche se l'analisi istologica relativa alla linea a ci presenta un tessuto osseo organizzato in maniera plessiforme, con ampie lacune ed una abbondante componente periostale. Solo una più dettagliata analisi istologica all'interno della zona L3 sarà in grado di confermare la persistenza del quadro evidenziato a livello della linea a.

Interessanti sono i dati relativi ai valori dei diametri computati alle varie altezze, perchè presentano andamenti caratteristici che si differenziano tra i due segmenti ossei, sia per omogeneità, sia per distribuzione. Potrebbero essere utili per imbastire confronti con altre linee genetiche o per testare nuove tecnologie di allevamento.

Parole chiave: pollo da carne, femore, tibiotarso, tessuto osseo, analisi istologiche, densità minerale ossea.

Key words: broiler, femur, tibiotarsus, bone tissue, histology, bone mineral density.

RIASSUNTO - Per la sperimentazione sono stati esaminati, a tre diversi tempi (28, 38 e 55 gg), polli maschi della linea genetica del broiler Cobb, come tipica razza a crescita rapida e ad elevato indice di conversione sempre più utilizzata nell'ambito dell'allevamento del pollo da carne. In relazione ai problemi scheletrici cui questa razza può incorrere a causa della spinta produttiva, si è effettuata una valutazione morfometrica ed una approfondita analisi strutturale del femore e del tibiotarso, al fine di raccogliere dati riconducibili all'ambito fisiologico. L'indagine microscopica ha messo in evidenza come il tessuto osseo analizzato passi nel corso dei tre tempi sperimentali, da una struttura plessiforme ad una più compatta, senza peraltro rag-

giungere la piena maturità. Queste rilevazioni vengono confermate dall'analisi densitometrica totale e parziale.

ABSTRACT - Meat type chicks (broiler Cobb 500), a fast growing strain selected for growth and food conversion, used for the modern rearing, were tested at three different days of age (28, 35, 55 d). The aim was to collect physiological data on structural and morphometric parameters of the femur and tibiotarsus, trying to analyse skeletal disorders that may occur in these breeds. Histological studies showed a plexiform pattern, becoming a more dense structure during the examined period, but not assuming a completely mature cortical bone aspect. Total and partial densitometric analysis confirmed these data.

Bibliografia

- 1) ACAR N., MORAN E.T., BILGILI S.F. (1991). Live performances and carcass yield of male broilers from two commercial strain crosses receiving rations containing lysine below and above the established requirement between lysine below and above the established requirement between six and eight weeks of age. *Poultry Sci.*, 70, 2315-2321.
- 2) ASHMAN, R. B., RHO, J.Y. (1988). Elastic modulus of trabecular bone material. *Journal of Biomechanics*, 21, 177-181.
- 3) BARASA A., DURIO P., CANAVESE B. (1976). Microdurezza, ceneri ed alcuni elementi minerali nelle ossa lunghe di polli allevati all'aperto ed in batteria. *SISVet.* 30, 231-233.
- 4) BARASA A., MOSSETTO G. (1989). Aspect of the surface and structure of the bone. *SISVet.* 43, 181-186.
- 5) BIGI A., CACCHIOLI A., FICHERA A. M., GABBI C., KOCK M., RAGIONIERI L., RIPAMONTI A., ROVERI N. (1998). X-ray diffraction analysis and polarising optical microscopy investigation of the structural organisation of rabbit tibia. *Journal of Biomedical Materials Research*, 41, 289-295.
- 6) BLENEAU B. (1990). Postnatal development of intertarsal and carpal joints in chicken in the roentgen image. *Ann. Warsaw Agricult. Univ. – SGGW-AR, Vet. Med.*, 15, 59-65.
- 7) BLENEAU B. (1993). Radiographic estimation of the effect of feeding level on maturation and growth of the tibial bone in chicken. *Ann. Warsaw Agricult. Univ. – SGGW-AR, Vet. Med.*, 18, 71-77.
- 8) CARTER D. R., HAYES W. C. (1977). The compressive behaviour of bone as a two-phase porous structure. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 59a, 954-962.
- 9) DAMMRICH K., RODENHOFF G. (1970). Skelettveränderungen bei Mastkuken. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 17, B, 131-147.
- 10) GETTY R. (1982) *Anatomia degli animali domestici*. Piccin, Padova, 2, 1861-2191.
- 11) GIORDANI G., MELUZZI A., CRISTOFORI C., CALINI F. (1993). Indagine

sulle prestazioni produttive e sulla adiposità del broiler moderno: confronto fra ceppi. *Zoot. Nutr. Anim.*, 19, 33-42.

12) HOGG DA. (1980). A re-investigation of the centres of ossification in the avian skeleton at and after hatching. *J. Anat.*, 130, 4, 725-743.

13) HOWLETT CR. (1979). The fine structure of the proximal growth plate of the avian tibia. *J. Anat.*, 128, 2, 377-399.

14) HOWLETT CR. (1980). The fine structure of the proximal growth plate and metaphysis of the avian tibia: endochondral osteogenesis. *J. Anat.*, 130, 4, 745-768.

15) LEBLANC B., WYERS M., COHN-BENEDIT F., LEGALL J.M., THIBAUT E. (1986). Histology and histomorphometry of the tibia growth in two turkeys strains. *Poultry Science* 65, 9, 1787-1795.

16) LETERRIER C., COSTANTIN P., LE BIHAN DUVAL E., MARCHÉ G., NYS Y. (1998). Trubles locomoteurs et qualité osseus chez les volailles de chair. *INRA Prod. Anim.* 11, 125-130.

17) LETERRIER C., NYS Y. (1992). Composition, cortical structure and mechanical properties of chicken tibiotarsi: effect of growth rate. *British Poultry Science.* 33, 925-939.

18) MUIR P., MARKEL M. D. (1996). Geometric variables and bone mineral density as potential predictors for mechanical properties of the radius of Greyhounds. *Am. J. Vet. Res.*, 57, 7, 1096-1097.

19) NOVELLI A., GIUSTI L. (1992). Risultati delle prove comparate di allevamento di diversi ibridi di broilers. *Rivista di Avicoltura*, 61, 4, 37-41.

20) ORR H.L., HUNT E.C., RANDALL C.J. (1984). Yield of carcass, parts, meat, skin and bone of eight strain of broilers. *Poultry Science.*, 63, 2197-2200.

21) SCHOLTYSSSEK S., SEEMANN G. (1988). Studies on the chemical composition of broilers: differences due to strain, sex and diet. in: Proceeding 8th World's poultry Science Association Meeting, Nagoya, Japan, 1362-1364.

22) WILLIAMS B., SOLOMON S., WADDINGTON D., THORP B., FARQUHARSON C. (2000). Skeletal development in the meat-type chicken. *British Poultry Science*, 41, 2, 141-149.

23) WILSON S.P. (1969). Genetic aspects of feed efficiency in broilers. *Poultry Sci.* 48, 487-495.

24) WISE D. R. (1970). Comparison of the skeletal systems of growing and laying strain chickens. *British Poultry Science*, 11, 333-339.

25) ZOTTI A., TACCHIO G., MORGANTE M. (2001). Densitometria ossea computerizzata. *Obiettivi & Documenti Veterinari*, 6, 57-65.

L'ANESTESIA IN OFTALMOLOGIA VETERINARIA

(Barbara Simonazzi, Stefano Zanichelli)

INTRODUZIONE

La chirurgia oculistica veterinaria ha fatto progressi evidenti, raggiungendo livelli di eccellenza grazie anche alla migliore gestione anestesiológica del paziente. Gli studi eseguiti sugli animali e poi le esperienze cliniche sia in campo umano che veterinario, hanno dimostrato risposte oculari pressoché identiche con l'uso di tranquillanti, analgesici narcotici, anestetici dissociativi, anestetici inalatori generali e rilassanti neuromuscolari (6).

Non vi è, tuttavia, un unico protocollo anestesiológico applicabile a tutti i pazienti con patologie oftalmiche per le diversità relative a specie, età, stato generale di salute e tipologia della patologia in essere (3).

EFFETTI DEGLI ANESTETICI SULL'OCCHIO

La pressione intraoculare

I farmaci utilizzati per tranquillizzare, sedare ed anestetizzare gli animali, interferiscono sulla pressione intraoculare (IOP), influenzando direttamente o indirettamente la dinamica del flusso dell'umor acqueo. In corso di chirurgia corneale ed intraoculare è molto importante evitare un rialzo pressorio intraoculare poiché può portare alla formazione di edema corneale e predisporre all'instaurarsi di un glaucoma (7).

Numerosi farmaci quali ad esempio morfina, diazepam e midazolam (3) diminuiscono la pressione intraoculare agendo sul sistema nervoso centrale, su quello respiratorio e sul circolatorio (2). Batista et al. (2000) hanno dimostrato come l'uso del propofolo non comporti diminuzione della pressione intraoculare (1), mentre studi eseguiti in medicina umana sostengono il contrario (3).

La riduzione della pressione intraoculare sembra essere anche direttamente collegata alla profondità dell'anestesia generale. Infatti, molti anestetici generali, quali ad esempio i barbiturici (3), sono considerati responsabili di una diminuzione della pressione intraoculare attraverso un incremento del flusso dell'umor acqueo (6).

I farmaci che producono un aumento della pressione arteriosa e venosa sembrano invece predisporre ad aumento della pressione intraoculare (6).

La secchezza oculare e l'esposizione corneale

L'uso degli anestetici generali in medicina umana predispone alla comparsa di secchezza oculare, irritazione congiuntivale, erosioni corneali ed alla diminuzione della secrezione lacrimale. Anche nel cavallo e nel cane gli studi eseguiti in anestesia generale hanno dimostrato una notevole diminuzione della secrezione lacrimale (5). Ancora, è stato visto che anestetici topici, anticolinergici, preanestetici ed anestetici generali inducono una riduzione a breve termine della porzione acquosa del film lacrimale misurata mediante test di Schirmer (7).

Nel gatto l'impiego della ketamina comporta secchezza oculare, tuttavia non è chiarito se la causa sia da imputare maggiormente a reale diminuzione della secrezione lacrimale piuttosto che all'apertura permanente delle palpebre per la durata dell'azione della ketamina stessa (6).

Studi fatti sulla somministrazione di atropina per via sottocutanea, associata ad alotano e metossifluorano, hanno dimostrato una rilevante diminuzione della secrezione lacrimale misurata mediante test di Schirmer (6).

Durante l'anestesia generale, quindi, è sempre consigliato lubrificare e proteggere la cornea mediante l'uso di lacrime artificiali (16).

Il riflesso oculocardiaco

Il riflesso oculo-cardiaco o oculo-respiratorio-cardiaco è stato per la prima volta descritto nel 1908 da Aschner e Dagnini (6). Pressioni esercitate sul globo oculare, trazioni sui muscoli extraoculari, manipolazione dei tessuti in corso di enucleazione, iniezioni intraorbitali e manipolazione dei muscoli palpebrali possono generare la comparsa di questo riflesso (2, 3). La stimolazione di questo riflesso trigemino-vagale esita nella comparsa di bradicardia, ipotensione e depressione respiratoria (6, 18), evento questo, piuttosto infrequente nel cavallo (12).

La posizione dell'occhio

Molti anestetici generali iniettabili ed inalatori inducono la rotazione del globo oculare limitando così l'accesso alla cornea, alla camera anteriore ed al segmento anteriore dell'occhio. Se il globo ruota in direzione ventromediale, la membrana nititante tende a coprire la cornea limitando l'esposizione della cornea stessa e del globo al chirurgo (3, 6). Per ovviare a questi inconvenienti si possono posizionare dei punti di sutura a livello della porzione anteriore della sclera o delle inserzioni del muscolo retto. E' stato pure descritto l'uso di iniezioni retrobulbari di soluzione salina al fine di esporre maggiormente il globo oculare (6).

La fessura pupillare

Numerosi agenti anestetici e sedativi, causano miosi (3). La ketamina provoca sempre midriasi, effetto da tenere ben presente durante il monitoraggio del paziente sottoposto ad anestesia generale con questo agente. La morfina, invece, causa miosi nell'uomo, nel cane e nel coniglio e midriasi nei gatti, nei topi e nelle scimmie (3).

ANESTESIA LOCALE

Gli anestetici locali sono molto importanti ed utili nella clinica pratica poiché ci consentono di eseguire la visita oculistica anche quando sono necessarie manualità fastidiose per l'animale (ispezione della terza palpebra, cateterismo e lavaggio dei dotti nasolacrimali, misurazione della pressione intraoculare, gonioscopia ed elettroretinografia) (Foto 1, 2) (6).

L'anestesia locale, inoltre, ci consente di eliminare il dolore superficiale che comporta blefarospasmo e fotofobia; ci semplifica l'esecuzione della visita anche in corso di evidenti manifestazioni dolorifiche da parte del paziente dovute alle diverse patologie oculari (erosioni, ulcere, ferite, presenza di corpi estranei, congiuntiviti, cheratiti, etc...).

In anestesia locale si eseguono alcune semplici pratiche chirurgiche quali l'asportazione di corpi estranei corneali, congiuntivali o situati dietro la terza palpebra (Foto 3), l'esecuzione di iniezioni sottocongiuntivali, di cheratotomie (a griglia, puntata multipla), prelievi citologici e biopsie, spesso senza l'ausilio della sedazione (3, 17).

Le precauzioni doverose da attuare durante l'uso di questi farmaci sono date dal fatto che possono aumentare la possibilità di traumi e possono provocare sensibiliz-



Foto 1: cateterismo e lavaggio dei dotti nasolacrimali in anestesia locale (ossibuprocaina cloridrato 0,4%).



Foto 2: misurazione della pressione intraoculare con tonometro di Schiötz in anestesia locale (ossibuprocaina cloridrato 0,4%).

zazione (16). Inoltre quasi tutti gli anestetici locali inibiscono la cicatrizzazione dell'epitelio corneale e, perciò, il loro uso per alleviare il dolore nell'ulcera corneale è assolutamente controindicato (13). Il benoxinato, la butacaina, la cocaina cloridrato, la dibucaina, la fenacaina e la proparacaina cloridrato 0,5% danno marcato ritardo dell'epitelizzazione, mentre la tetracaina 0,5% provoca solo lieve ritardo dell'epitelizzazione (19). In particolare nell'uomo, dopo l'uso topico di proparacaina si sono osservate degenerazione ed erosione dell'epitelio corneale e congiuntivale (10). Non sembrano invece generare alcun tipo di ritardo la piperocaina al 2% e la lidocaina cloridrato al 2% e 4% (16). Tra gli anestetici locali più usati vi è sicuramente l'ossibuprocaina cloridrato 0,4% (14, 19).

Dal momento dell'instillazione del collirio, l'anestesia avviene dopo un minuto per quanto riguarda la cornea ed appena un po' più lentamente per quanto concerne la congiuntiva (16). Questo tipo di anestesia permane per circa 10-20 minuti (17).



Foto 3: asportazione di un corpo estraneo vegetale della congiuntiva della terza palpebra, versante corneale in anestesia locale (ossibuprocaina cloridrato 0,4%).

ANESTESIA LOCALE REGIONALE NEL CAVALLO

Nel cavallo è possibile effettuare molte procedure diagnostiche e chirurgiche servendosi dell'anestesia regionale (blocco tronculare) (11). Secondo le procedure cliniche da effettuare possiamo eseguire un'anestesia della palpebra superiore e della porzione anteriore della testa, oppure indurre un'acinesia palpebrale.

Anestesia della palpebra superiore e della porzione anteriore della testa

Con questo tipo di anestesia regionale si anestetizza la palpebra superiore, ad eccezione del canto mediale e laterale. Si procede iniettando 5 ml di lidocaina al 2% (ago da 22-25 Gauge) nel forame sopraorbitario. Detto forame si apprezza con la palpazione 5-7 cm circa al di sopra del canto mediale, a livello del processo sopraorbitale dell'osso frontale. L'ago va inserito nel forame ad una profondità di 1,5-2 cm, si iniettano 2 ml di anestetico nel forame, poi 1 ml durante la retrazione ed infine altri 2 ml nel sottocute al di sopra del forame. Con questa procedura si anestetizza il nervo sopraorbitale o frontale, branca terminale del nervo trigemino, al fine di desensibilizzare la palpebra superiore e bloccare l'innervazione motoria palpebrale derivante dal nervo auricolopalpebrale, branca terminale del nervo facciale (11, 13, 14). Questa anestesia viene utilizzata per eseguire biopsie palpebrali o congiuntivali e per il posizionamento di cateteri sottopalpebrali per l'esecuzione delle terapie locali (7).

Acinesia palpebrale

Questo tipo di anestesia regionale, invece, provoca la paralisi dei muscoli orbicolari dell'occhio. Si ottiene iniettando 5 ml di lidocaina al 2% (ago da 22-25 Gauge) in corrispondenza del punto più alto dell'arcata zigomatica (o caudalmente al ramo posteriore della mandibola) (7, 17). L'ago viene inserito 3 cm ventralmente al punto più elevato del margine dorsale dell'arcata zigomatica, diretto dorsalmente e spinto lungo l'osso sino a che la punta non arriva in prossimità del bordo dorsale dell'arcata zigomatica (10). L'anestetico viene iniettato a livello sottofasciale durante la retractione dell'ago. Con questa tecnica si ottiene l'anestesia del nervo auricolopalpebrale che ci consente di esaminare l'occhio bloccando l'innervazione motoria ed impedendo così al cavallo di chiudere le palpebre (11, 14, 16). Viene utilizzata per eseguire procedure diagnostiche quali citologia corneale, elettroretinografia e terapeutiche quali iniezioni sottocongiuntivali e piccoli interventi chirurgici (7).

ANESTESIA LOCALE REGIONALE NEL CANE E NEL GATTO

Nel cane e nel gatto questo tipo di anestesia, pur essendo descritta, è impiegata raramente. Si riescono ad anestetizzare la regione dell'occhio, le palpebre e la cute della parte anteriore della testa, l'orbita e la congiuntiva (10, 11). Si ottiene iniettando 2 ml di lidocaina all'1% (ago da 22-25 Gauge) nella fessura orbitale. L'ago va inserito ventralmente al bordo del processo zigomatico a livello del canto laterale dell'occhio e quindi diretto in senso mediodorsale e, in una certa misura, caudale, fino a raggiungere la fessura orbitale. Con questa tecnica si ottiene l'anestesia dei nervi lacrimale, zigomatico e del ramo oftalmico del trigemino (11).

ANESTESIA DI INFILTRAZIONE

Si tratta della possibilità di eseguire iniezioni infiltranti di anestetico nelle zone in cui si dovrà eseguire l'intervento chirurgico. In genere questo tipo di anestesia viene utilizzato per eseguire chirurgia palpebrale minore come entropion, asportazione di piccole neoformazioni e tarsorrafie. Si possono pure eseguire iniezioni retrobulbari per potenziare l'effetto dell'anestesia generale (17). Gli anestetici maggiormente usati sono lidocaina al 2% (inizio dell'effetto dopo 4-6 minuti dall'inoculazione; durata dell'effetto da 60 a 90 minuti) e mepivacaina al 2% (inizio dell'effetto dopo 3-5 minuti dall'inoculazione; durata dell'effetto da 90 a 120 minuti) (17).

Infiltrazione locale delle palpebre

In genere è usata più frequentemente nel cavallo che nei piccoli animali. Si parte ad un cm di distanza dal canto laterale con un ago spinale da 23-25 Gauge (2,5 inches) e si eseguono delle infiltrazioni ad un cm di distanza dal margine palpebrale fino al canto nasale (17). Essendo questi aghi flessibili, possono essere guidati seguendo la curvatura delle palpebre. In genere il volume di anestetico utilizzato varia da 3 a 6 ml per palpebra e possono essere infiltrate allo stesso modo sia la palpebra inferiore sia quella superiore (17) (Foto 4).

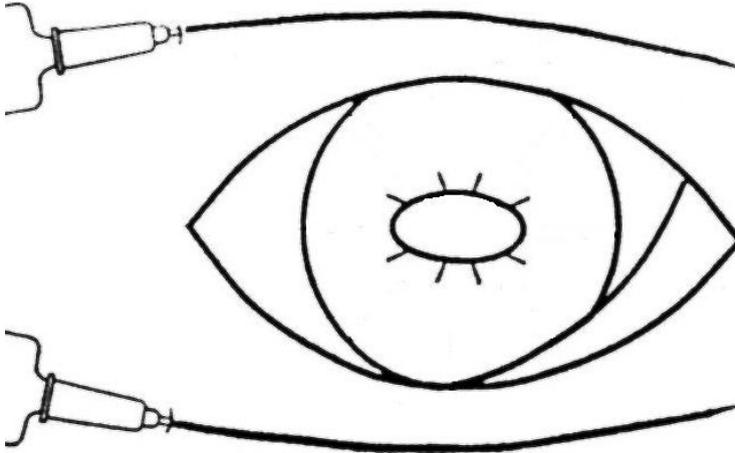


Foto 4: anestesia di infiltrazione locale delle palpebre.

Anestesia retrobulbare

Questo tipo di anestesia nel cavallo e nel cane può essere utilizzata in aggiunta all'anestesia generale per ridurre il nistagmo e l'enoftalmo durante la chirurgia corneale ed intraoculare (3, 15). Essa provoca desensibilizzazione del globo e delle palpebre, acinesia del globo, perdita temporanea della visione, midriasi e diminuzione della pressione intraoculare (3).

In combinazione con l'infiltrazione locale delle palpebre, può essere utilizzata per eseguire l'enucleazione od altre procedure chirurgiche negli animali da reddito (3, 13, 17).

Nel cane viene usata piuttosto raramente poiché si preferisce l'utilizzo dell'atracurio che genera paralisi dei muscoli oculari estrinseci.

Il punto di reperi per l'iniezione retrobulbare è la protuberanza caudale al legamento orbitale nei pressi dell'arco zigomatico. In genere vengono iniettati 1-2 ml di anestetico con ago da 20 Gauge nel tessuto retrobulbare con direzione mediale. Un'alternativa a questa tecnica può essere l'esecuzione di un'iniezione perpendicolare al canto laterale eseguita sotto all'arco zigomatico e anteriormente al processo coronoideo della mandibola con direzione mediale.

Nel cavallo può essere utile eseguire quattro punti di blocco durante l'anestesia generale, utilizzando per ogni quadrante da 5 a 10 ml di lidocaina. Vengono eseguiti un blocco a livello del quadrante superiore, uno a livello di quello temporale, uno a livello di quello inferiore, e l'ultimo a livello nasale. Per quello superiore si inietta l'anestetico dirigendo l'ago attraverso il centro della palpebra superiore, tangente al globo. Per il quadrante temporale l'ago viene introdotto attraverso la cute del canto temporale seguendo posteriormente il globo oculare. Nel quadrante inferiore si dirige l'ago attraverso la cute della palpebra inferiore o direttamente nel tessuto congiuntivale, parallelamente al margine palpebrale. Il quadrante nasale viene infiltrato elevando la terza palpebra e dirigendo l'ago attraverso la sua base, tangente al globo oculare (7, 17) (Foto 5).

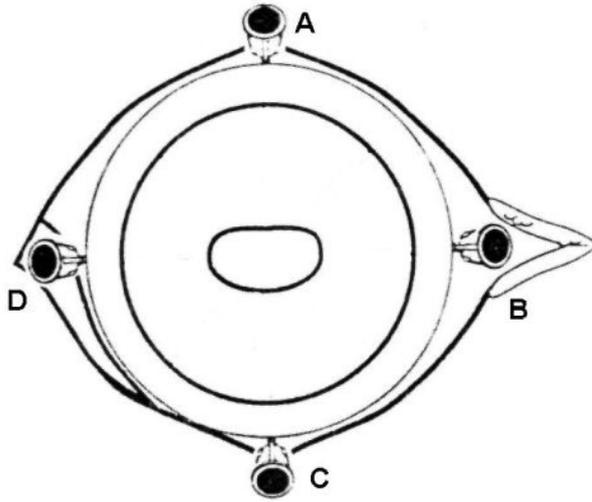


Foto 5: i quattro punti di blocco per l'anestesia retrobulbare nel cavallo.

TRANQUILLANTI E SEDATIVI

La sedazione risulta necessaria se, durante la visita oculistica, l'animale non collabora e/o si presenta piuttosto aggressivo, oppure se il paziente deve essere sottoposto ad intervento chirurgico. Sedativi e tranquillanti (fenotiazine e benzodiazepine) diminuiscono la pressione intraoculare incrementando il flusso dell'umor acqueo (2, 6). Inoltre, provocando la procidenza della terza palpebra, risultano inadatti per l'esecuzione di una buona visita oculistica (17, 21). Verbruggen e collaboratori, riportano, invece, come la medetomidina (α -2 agonista) somministrata per via endovenosa nel cane, non influenzi la pressione intraoculare. Al contrario, se applicata localmente, provoca abbassamento della pressione intraoculare nel gatto e nel coniglio (20).

ANESTESIA GENERALE

In caso anestesia locale e sedazione siano insufficienti o inadeguate per le procedure da attuare, allora risulta necessario sottoporre il paziente ad un'anestesia generale.

Nel gatto ed a volte anche nel cane, per anestesi di breve durata sono ottime le miscele di ketamina, xylazina ed atropina poiché non provocano né rotazione dell'occhio, né enoftalmo (19). Kommonen e Raitta (1987) hanno effettuato uno studio sull'utilizzo dell'associazione di ketamina e xylazina durante l'esecuzione dell'esame elettroretinografico, prediligendo questo tipo di protocollo anestetico proprio per l'assenza di rotazione del globo, tuttavia, non hanno ottenuto nei cani di razza Labrador Retrievers da loro esaminati, i risultati sperati (9).

Nell'uomo l'uso della ketamina è associato all'aumento della pressione intraocu-

lare, evento non sempre riscontrato negli animali (2, 6, 8). Negli animali, gli effetti oculari conseguenti all'uso di questo farmaco sono dati da midriasi, posizionamento centrale del globo oculare e mantenimento dei riflessi palpebrale e corneale (3, 6, 21).

L'anestesia generale inalatoria con induzione barbiturica e mantenimento con alotano provoca, invece, marcata rotazione del bulbo oculare ed enoftalmia e, per questo motivo, non è indicata per la chirurgia intraoculare (19). In genere l'isofluorano viene preferito all'alotano per l'adeguato rilassamento dei muscoli extraoculari (3, 8, 17).

Barbiturici ed anestetici volatili, come già ricordato, inducono una diminuzione della pressione intraoculare (2, 3, 6), mentre anestesie generali piuttosto prolungate, con cambiamenti del pH ematico, sembra possano comportare aumenti della pressione intraoculare (6).

ANESTESIA PER LA CHIRURGIA INTRAOCULARE

Per alcuni interventi di chirurgia oculare (ferite penetranti) e per gli interventi di chirurgia intraoculare (estrazione della lente con cataratta, lussazione del cristallino, trapianto corneale, vitrectomia aperta o chiusa) ai fini di prevenire la rotazione del bulbo oculare e l'enoftalmia, è necessaria l'anestesia inalatoria associata ad agenti miorilassanti, detti di blocco neuromuscolare. I più usati sono l'atracurio besilato, il pancuronio bromuro ed il vecuronio (11, 19). L'atracurio è considerato responsabile di una lieve liberazione di istamina, ma i suoi effetti cardiovascolari sono minimi. Il pancuronio è un miorilassante a rapida azione che non rilascia istamina, mentre il vecuronio è considerato il migliore miorilassante fino ad ora sviluppato per quanto riguarda la stabilità cardiovascolare, è strettamente correlato al pancuronio, ma leggermente più potente. Tali agenti di blocco interferiscono con la trasmissione dell'impulso a livello neuromuscolare, arrestando quindi la respirazione ed imponendo il ricorso ad una ventilazione controllata ed al costante monitoraggio del paziente (11). Il loro effetto paralitico, col completo rilassamento muscolare, mantenimento della posizione centrale dell'occhio e lieve proptosi del bulbo, è particolarmente indicato nei cani di razze dolicocefaliche, caratterizzate da orbite profonde (3). Inoltre gli agenti di blocco neuromuscolare non depolarizzanti non influiscono sulla pressione intraoculare evitando quindi innalzamenti pre-operatori della pressione intraoculare e di conseguenza eventuali rischi di estrusione vitreale. Questo tipo di anestesia è stato utilizzato, oltre che nell'uomo, anche nei cavalli, nei ponies, nei gatti, nelle scimmie e nei lama (4).

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'anestesia è sicuramente un aspetto piuttosto critico nella gestione della chirurgia oftalmica in medicina veterinaria. Tutti gli agenti anestetici presentano caratteristiche sia desiderabili e vantaggiose che indesiderabili e svantaggiose. Una caratteristica che può essere vantaggiosa in una determinata circostanza potrebbe non essere importante in un'altra o persino indesiderabile in un terzo caso. Tuttavia, i pazienti che necessitano un'anestesia per una chirurgia a livello oculare possono essere oggi

tranquillamente sottoposti all'intervento senza nessun tipo di complicanze, se l'anestesista possiede una perfetta conoscenza degli effetti dei farmaci utilizzati sulla fisiologia oculare. Tutti gli agenti anestetici di uso comune sono, infatti, considerati sicuri se somministrati ad un animale normale fintanto che si rispettino i giusti dosaggi e si adottino le debite precauzioni. Le caratteristiche farmacologiche degli anestetici usati devono, quindi, quanto più possibile, essere tenute in considerazione in relazione alla patologia oculare del paziente esaminato.

E' inoltre importante sottolineare come in oftalmologia veterinaria numerose procedure diagnostiche invasive (es. drenaggio dei dotti nasolacrimali, asportazione di corpi estranei posti dietro la terza palpebra, iniezioni sottocongiuntivali), ma anche alcune procedure chirurgiche banali (es. cheratotomia a griglia e multipla puntata, prelievi citologici e biotici) possano essere tranquillamente effettuate esclusivamente mediante anestesia locale od eventualmente con l'ausilio di una lieve sedazione. L'obiettivo di tutti i protocolli anestesiolgici è infatti quello di aumentare il più possibile il margine di sicurezza e limitare i rischi al fine di migliorare le possibilità di un risveglio scevro da complicazioni.

Parole chiave: anestesia, occhio, chirurgia

Key words: anesthesia, eye, surgery

Palabras claves: anestesia, ojo, cirugía

RIASSUNTO - Vengono presi dapprima in considerazione gli effetti dei farmaci anestetici a livello oculare. Si procede poi alla descrizione dell'anestesia locale, locale regionale ed infiltrante nei piccoli e nei grandi animali. Per ultimo vengono trattati gli effetti dei farmaci utilizzati nella sedazione, nella preanestesia, nell'anestesia generale ed il tipo di anestesia ottimale da utilizzare durante la chirurgia intraoculare.

SUMMARY - Initially the Authors consider the anesthetic drugs effects on the eye. Then they describe local anesthesia, regional local and infiltrative anesthesia in small and large animals. Next the effects of drugs used in sedation, in pre-anesthesia, in general anesthesia and the best possible anesthesia for intra ocular surgery are examined.

RESUMEN - Por primero vienen considerados los efectos de los fármacos anestéticos a nivel ocular. Después se procede a la descripción de la anestesia local, local regional y infiltrante en los pequeños y grandes animales. Vienen por último tratados los efectos de los fármacos utilizados en la sedación, en la pre-anestesia, en la anestesia general y el mejor tipo de anestesia que tendrá que ser utilizado en la cirugía intraocular.

BIBLIOGRAFIA

1. Batista C.M., Laus J.L., Nunes N., Patto dos Santos P.S., Costa J.L.O.: Evaluation of intraocular and partial CO₂ pressure in dogs anesthetized with propofol. *Vet. Ophth.*, 2000, 3, 17-19.
2. Brunson D.B.: Anesthesia in Ophthalmic Surgery. *Vet. Clin. of North. Am.: Small Anim. Pract.*, 1980, 10, 2, 481-495.
3. Collins B.K., Gross M.E., Moore C.P., Branson K.R.: Physiologic, pharmacolog-

ic, and practical considerations for anesthesia of domestic animals with eye disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, 207, 2, 15, 220-230.

4. Donaldson L.L., Holland M., Koch S.A.: Atracturium asan adjunct to halothane-oxygen anesthesia in a llama undergoing intraocular surgery. A case report. *Vet. Surg.*, 1992, 21, 1, 76-79.

5. Herring I.P., Pickett J.P., Champagne E.S., Marini M.: Evaluation of Aqueous Tear Production in Dogs Following General Anesthesia. *J Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 2000, 36, 427-430.

6. Gelatt K.N., Gelatt J.P.: *Small Animal Ophthalmic Surgery. Volume 1: Extraocular Procedures.* Pergamon, 23-31, 1994.

7. Gelatt K.N.: *Veterinary ophthalmology.* 3rd ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 153, 339-341, 430-431, 1999.

8. Hodgson D.S., Dunlop C.I.: General Anesthesia for Horses with Specific Problems. *Vet. Clin. of North Am.*, 1990, 6,3, 625-650.

9. Kommonen B., Raitta C.: Electroretinography in Labrador Retrievers given ketamine-xylazine anesthesia. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, 48, 9, 1325-1331.

10. Lumb W.V., Jones E.W.: *Anestesiologia Veterinaria.* Ed. sbm, Noceto (Parma), 470-485, 1990.

11. Muir W.W., Hubbell J.A.E.: *Manuale di anestesia veterinaria.* Ed. SCIVAC, Cremona, 19, 26, 49-53, 1991.

12. Parviainen A.K., Trim C.M.: Complications associated with anaesthesia for ocular surgery: a retrospective study 1989-1996. *Eq. Vet. J.*, 2000, 32,6, 555-559.

13. Peruccio C.: *Atlante di oftalmologia veterinaria.* Ed. Medico Scientifiche, Torino, 44, 52, 62, 1985.

14. Peruccio C., Barbasso E.: *Oftalmologia Equina.* Ed. SCIVAC, Cremona, 12, 1999.

15. Raffé M.R., Bistner S., Crimi A.J., Ruff J.: Retrobulbar Block in Combination with General Anesthesia for Equine Ophthalmic Surgery. *Vet. Surg.*, 1986, 15, 1, 139-141.

16. Severin G.A.: *Manuale di oftalmologia veterinaria.* Ed. SCIVAC, Cremona, 30-31, 45, 1990.

17. Severin G.A.: *Veterinary ophthalmology notes.* 2nd ed. Ft. Collins, Colorado State University, 100-104, 139, 1996.

18. Short C.E., Rebhun W.C.: Complications Caused By the Oculocardiac Reflex During Anesthesia in a Foal. *J Am. Vet. Med. Assoc.*, 1980, 176, 7, 630-631.

19. Stades F.C., Wyman M., Boevé M.H., Neumann W.: *Ophthalmology for the Veterinary Practitioner.* Hannover, Schlütersche GmbH & Co., 27-28, 1998.

20. Verbruggen A.M., Akkerdaas L.C., Hellebrekers L.J., Stades F.C. The effect of intravenous medetomidine on pupil size and intraocular pressure in normotensive dogs. *Vet. Quarterly*, 2000, 22, 3, 179-80.

21. Zanichelli S., Scrollavezza P.: *Manuale di anestesiologia veterinaria (parte prima):* Ed. Scientifiche Oppici, 24-27, 40-41, 1996.

STUDIO RETROSPETTIVO SULL'UTILIZZO DELLA TECNICA POCKET NELLA CORREZIONE DEL PROLASSO DELLA GHIANDOLA DELLA TERZA PALPEBRA NEL CANE

Barbara Simonazzi, Stefano Zanichelli

INTRODUZIONE

Il prollasso della ghiandola della terza palpebra, è una patologia oculare congenita, in genere indicata dagli allevatori come "cherry eye", ovvero occhio a ciliegia, in quanto la ghiandola prollassata è comunemente interessata da flogosi ed ipertrofia. Fisiologicamente la ghiandola si trova adesa al tessuto periorbitale mediante bande di tessuto connettivale; se queste non si sviluppano in modo corretto, il grasso retroorbitale può provocare il prollasso della ghiandola nel momento in cui l'occhio viene retratto nell'orbita dai muscoli estrinseci (10, 28). La ghiandola può prollassare parzialmente o totalmente e spesso ritornare poi, da sola, o mediante pressione digitale, nella sua posizione fisiologica. Quando la lassità legamentosa è molto marcata la ghiandola prollassa continuamente senza tornare in sede propria. L'eziologia, probabilmente ereditaria, è quindi dovuta all'assenza congenita o alla debolezza del tessuto connettivo che ancora la ghiandola alla regione periorbitaria (13, 21).

Il prollasso è raro nei gatti (problema ereditario nel Burmese ed in genere associato ad altre anomalie oculari) (4, 9, 27, 29) (Foto 1), ma frequente in cani di circa 3-6 mesi (30) o comunque sotto i due anni d'età (13). Si osserva di frequente in cani di razza Beagle, Bulldog Inglese, Boxer, Alano, Cocker Spaniel, Lhasa-Apso, Pechinese, Cavalier King Charles Spaniel, Mastino Napoletano, Terranova, Bloodhound, Boston Terrier, Shih-Tzu e anche Shar Pei, San Bernardo, Bull Terrier e Bassett Hound (1, 6, 8, 11, 17, 20, 21, 30) (Foto 2). Poiché esiste una propensione per i soggetti delle razze brachicefale è possibile che all'insorgenza della patologia contribuisca anche la conformazione dell'orbita (10).

La congiuntiva si presenta spesso iperemica, a volte può comparire ipertrofia follicolare e secondariamente possono insorgere epifora e congiuntivite (6, 29, 30). In genere la patologia insorge come monolaterale, ma il secondo occhio viene spesso interessato entro i successivi 1-3 mesi (30).

Per diverso tempo il trattamento eseguito in caso di prollasso della ghiandola della terza palpebra è stato l'asportazione della ghiandola stessa o ancor peggio di tutta la terza palpebra. Ora, dopo anni di studi si è arrivati alla conclusione che la rimozione di detta ghiandola predisponga l'animale alla comparsa di alterazioni qualitative e quantitative del film lacrimale (cheratocongiuntivite secca, KCS) specie in alcune



Foto 1: prolasso della ghiandola della terza palpebra in un gatto Persiano (per gentile concessione del Dott. Adolfo Guandalini)



Foto 2: prolasso della ghiandola della terza palpebra in un Pechinese (caso n.6)

razze canine e sia, quindi, controindicata (3, 5, 15, 21, 22, 25, 26). L'occhio secco è poi una condizione grave e difficile da trattare per la quale si richiede una terapia di mantenimento piuttosto costosa (7, 23). La ghiandola della terza palpebra secerne, infatti, dal 29 al 57% (11, 17, 18, 25) della produzione lacrimale totale in un occhio, mentre la restante parte viene secreta dalla ghiandola lacrimale principale. Nel cane la rimozione della ghiandola sembra abbassare i valori dello Schirmer tear test dal 29 al 57%, mentre nel gatto dal 12 al 26% (18). Anche il prolasso cronico della ghiandola, non corretto chirurgicamente, può esitare in una congiuntivite cronica, in una riduzione della funzionalità ghiandolare ed essere quindi associato a KCS (30). E' stato riportato che l'insorgenza della KCS nei cani operati chirurgicamente per il prolasso della ghiandola sia del 14%, salga invece al 42% se non si interviene in nessun modo e passi addirittura al 48% se la ghiandola viene invece asportata (20).

Il trattamento d'elezione è quindi sicuramente il riposizionamento chirurgico (12). In uno studio del 1996 di Moore e collaboratori è stato dimostrato come la tecnica chirurgica di riposizionamento della ghiandola non interferisca con l'integrità dei dotti escretori della ghiandola della terza palpebra (19). Tra le varie tecniche riportate in bibliografia le più usate sono la tecnica pocket descritta da Morgan (20) (Foto 3) e l'ancoraggio al periostio della rima periorbitale (13, 14, 16, 30, 31). Morgan riporta il 94,1% di successi con la tecnica pocket (20) ed il 41,2% con quella di

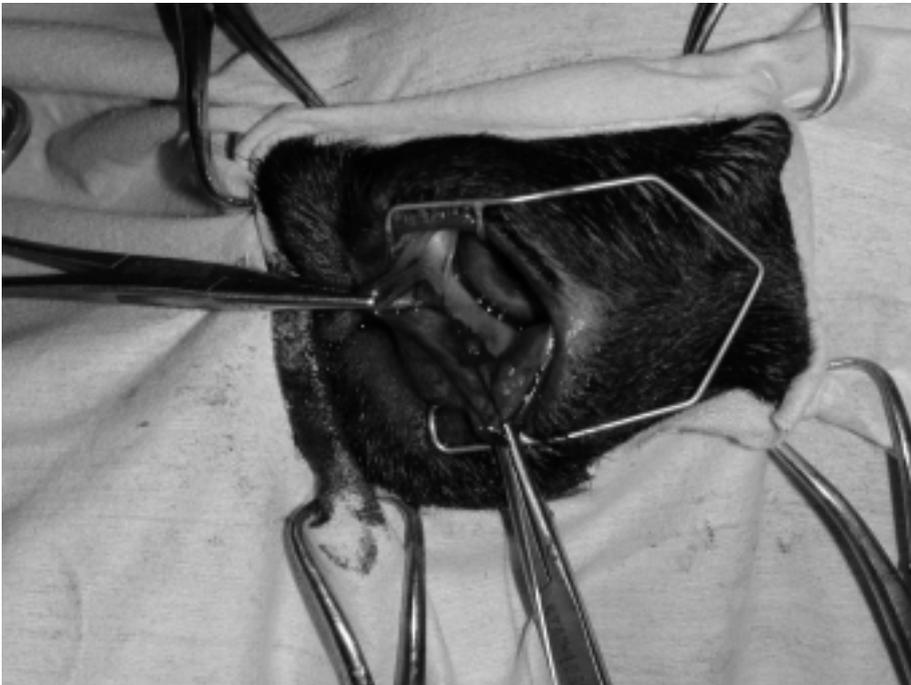


Foto 3: riposizionamento chirurgico di un prolasso della ghiandola della terza palpebra mediante tecnica pocket

ancoraggio. Puddu l'80,55% di successo con la pocket (24), mentre Arcelli e collaboratori descrivono invece un successo del 60% con la tecnica pocket e del 20% con l'ancoraggio periostale (2). Guandalini et al., al contrario, riportano percentuali di successo del 75,5% in uno studio eseguito riposizionando 49 ghiandole prolassate mediante la tecnica dell'ancoraggio periorbitale (14).

Scopo di questo studio è quello di valutare le razze più comunemente interessate dal prolasso della ghiandola della terza palpebra e, contemporaneamente, l'efficacia dell'intervento chirurgico di riposizionamento mediante tecnica pocket.

MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati inclusi 32 cani e complessivamente 42 casi di prolasso della ghiandola della terza palpebra. Nella maggior parte dei soggetti l'anamnesi riportava la presenza del prolasso della ghiandola da almeno 15 giorni, senza alcun segno di guarigione, nonostante l'effettuazione, nella maggior parte dei casi, di terapie locali antiinfiammatorie a base di cortisonici.

Tutti gli animali sono stati sottoposti a visita oftalmologica completa. Sono stati valutati la reazione di ammiccamento alla minaccia, i riflessi pupillari diretti e consensuali, la produzione delle lacrime (Schirmer tear test) e la pressione intraoculare mediante tonometria. E' stato inoltre eseguito il test di colorazione con fluoresceina. L'esame del segmento anteriore è stato condotto mediante biomicroscopia, il segmento posteriore è stato valutato mediante oftalmoscopia diretta previa dilatazione pupillare con tropicamide 0,5% e fenilefrina 10% (Visumidriatic Fenilefrina, Visufarma). In questo studio non sono stati presi in considerazione i casi di prolasso della ghiandola associati ad eversione della cartilagine della terza palpebra.

Tutti i soggetti sono stati poi sottoposti ad intervento chirurgico di riposizionamento della ghiandola mediante tecnica "pocket" ed utilizzo di polidossanone (PDS) 5/0 come materiale di sutura. Tutti i cani sono stati sottoposti ad intervento chirurgico mediante anestesia inalatoria gassosa in miscela di ossigeno, protossido d'azoto e isofluorano al 2% (Forane, Abbot) previa sedazione per via intramuscolare con medetomidina al dosaggio di 0,04-0,08 ml/kg p.v. (Domitor, Pfizer) ed acepromazina al dosaggio di 0,25-0,5 mg/kg p.v. (Prequillan, Fatro) ed induzione per via endovenosa mediante propofol al dosaggio di 4 mg/kg p.v. (Rapinovet, Schering-Plough).

In tutti i casi è stata prescritta una terapia antibiotica post-operatoria sia per via topica che per via sistemica. Per la terapia locale ci siamo avvalsi dell'uso di una pomata contenente tetracicline, cloramfenicolo e colistina (Colbiocin, Sifi), applicata ogni otto ore fino alla successiva rivalutazione del paziente, per quanto riguarda la terapia antibiotica sistemica abbiamo utilizzato un'associazione di amoxicillina ed acido clavulanico al dosaggio di 12,5 mg/kg p.v. ogni 12 ore (Synulox compresse, Pfizer).

In tutti i soggetti è stata consigliata l'applicazione del collare Elisabettiano. Dopo 7 e 15 giorni tutti i soggetti sono stati rivalutati.

RISULTATI

L'età media dei soggetti presi in esame è risultata di 7,1 mesi con un minimo di

3 ed un massimo di 27 mesi. Sono stati esaminati 20 maschi e 12 femmine. Le razze più rappresentate sono state il Bulldog Inglese (10 casi), il Boxer (6 casi), il Beagle (4 casi) e l'Alano (3 casi). In 10 casi è stato colpito l'occhio destro, in 12 il sinistro ed in 10 cani la lesione si è presentata bilateralmente (Foto 4). Di questi ultimi dieci, otto hanno manifestato contemporaneamente il prolasso della ghiandola, mentre nei restanti due vi è stato un intervallo di 30 giorni tra la presenza del prolasso nel primo occhio e la comparsa nel secondo occhio (casi n. 7 e 18). Il test di Schirmer per la valutazione della secrezione lacrimale è risultato normale (tra 15 e 25 mm/min) in 29 cani e diminuito in 3 cani (casi n. 7, 12 e 30). Dei 42 casi inclusi in questo studio 40 (95,2%) sono perfettamente guariti dopo l'intervento chirurgico. In 2 casi (4,8%) si è verificata una recidiva, rispettivamente a 10 (caso n. 1) e 12 (caso n. 11) giorni di distanza dalla chirurgia (Tabella n.1). Questi soggetti sono stati nuovamente trattati mediante la stessa tecnica, con esito positivo.

Il test di Schirmer pre-operatorio aveva evidenziato valori della lacrimazione inferiori alla norma in tre casi, ma a quindici giorni dall'intervento chirurgico di riposizionamento della ghiandola si è avuta una regolarizzazione della secrezione lacrimale.



Foto 4: prolasso bilaterale della ghiandola della terza palpebra in un Bulldog Inglese (caso n.1)

Tabella n.1.

	RAZZA	SESSO	ETA' (mesi)	PROLASSO OCCHIO	STT OD mm/min	STT OS mm/min	RECIDIVE
1	Bulldog Inglese	F	8	BIL	16	17	OS
2	Alano	F	21	OD	18	18	/
3	Bracco Tedesco	M	12	OS	24	22	/
4	Cane Corso	F	11	OS	21	20	/
5	Bulldog Inglese	M	3	OS	20	18	/
6	Pechinese	M	3	OS	23	25	/
7	Bulldog Inglese	M	6	BIL (1 mese)	20	12	/
8	Boxer	F	11	OS	22	20	/
9	Beagle	M	7	BIL	15	16	/
10	Bulldog Inglese	F	3	BIL	19	21	/
11	Alano	M	7	OD	21	23	OD
12	Bulldog Inglese	M	3	BIL	13	14	/
13	Meticcio	M	5	OS	19	18	/
14	Boxer	F	7	OD	15	16	/
15	Boxer	F	8	OD	27	27	/
16	Bulldog Inglese	M	13	OS	20	20	/
17	Bulldog Inglese	M	5	OD	21	22	/
18	Boxer	F	5	BIL (1 mese)	17	19	/
19	Beagle	M	4	OD	23	25	/
20	Cane Corso	M	7	BIL	17	19	/
21	Pechinese	F	8	OS	26	24	/
22	Past. Maremmano	F	24	OS	16	17	/
23	Mastino Nap.	M	5	BIL	21	23	/
24	Beagle	M	5	BIL	24	25	/
25	Alano	F	5	OD	19	19	/
26	Bulldog Inglese	M	3	OD	24	21	/
27	Bulldog Inglese	M	4	OS	22	22	/
28	Boxer	F	7	OS	24	22	/
29	Beagle	M	4	OD	17	16	/
30	Shih-Tzu	M	3	OD	11	16	/
31	Bulldog Inglese	M	3	OS	19	20	/
32	Boxer	M	7	BIL	18	20	/

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le razze più frequentemente interessate dal prolasso della ghiandola della terza palpebra sono risultate in questo nostro studio, le stesse descritte anche dagli altri Autori. Anche per quanto riguarda l'età media dei soggetti presi in considerazione ed il carattere bilaterale della patologia, ci avviciniamo sostanzialmente ai dati riportati in bibliografia.

I tre soggetti che hanno riportato valori del test di Schirmer inferiori ai valori minimi di normalità confermano che il prolasso contribuisca ad una diminuzione complessiva della funzione secretoria ghiandolare. Le razze predisposte al prolasso della ghiandola della terza palpebra sono per buona parte le stesse predisposte alla comparsa di cheratocongiuntivite secca.

Il riposizionamento chirurgico della ghiandola della terza palpebra rappresenta quindi la tecnica ideale in caso di prolasso, in quanto ci permette di ridurre i rischi relativi ad un'eventuale comparsa di cheratocongiuntivite secca iatrogena. Per quanto riguarda la percentuale di recidive, con l'utilizzo della tecnica "pocket" noi abbiamo ottenuto dei risultati relativamente bassi rispetto alla media descritta dagli altri Autori, nonostante questo dato sia sicuramente da correlare al numero non particolarmente elevato dei soggetti presi in considerazione.

La tecnica della "tasca", pur essendo piuttosto semplice da eseguire, richiede comunque una buona conoscenza di tecnica operatoria per ottenere i migliori risultati.

Parole chiave: cane, occhio, chirurgia, prolasso, ghiandola, terza palpebra

Key words: dog, eye, surgery, prolapse, gland, third eyelid

Palabras claves: perro, ojo, cirugía, prolapso, glándula, tercer párpado

RIASSUNTO - Quarantadue casi di prolasso della ghiandola della terza palpebra in 32 cani sono stati trattati mediante la tecnica pocket di riposizionamento della ghiandola. I Bulldog Inglesi sono stati la razza più frequentemente colpita dal prolasso della ghiandola della terza palpebra rispetto alle altre razze (31,2%). In 40 casi (95,2%) la tecnica ha avuto successo ed i cani sono guariti completamente, mentre 2 casi (4,8%) hanno avuto una recidiva del prolasso e sono stati di nuovo trattati usando la stessa tecnica.

SUMMARY - Forty-two prolapsed glands of the third eyelid in 32 dogs were treated by the pocket technique. English Bulldogs were more likely to have prolapse of the gland of the third eyelid than other breeds (31,2%). In 40 cases (95,2%) the surgery was uneventful and the patients recovered completely. Two eyes (4,8%) showed recurrence of prolapse and were treated again by the same technique.

RESUMEN - Cuarenta y dos casos de prolapso de la glándula del tercer párpado en 32 perros han sido tratados con la técnica pocket de reposición de la glándula. El Bulldog Inglés ha sido la raza más frecuentemente atacada de el prolapso de la glándula del tercer párpado respecto a las otras razas (31,2%). En 40 casos (95,2%) la técnica ha tenido éxito positivo y los perros han recuperado completamente, mientras 2 casos (4,8%) han tenido una recidiva de el prolapso y han sido nuevamente tratados con la misma técnica.

BIBLIOGRAFIA

1. ACVO Genetics Committee: Ocular disorders or suspected to be hereditary in dogs. ACVO ed., 2nd ed., 1996.
2. Arcelli R., Moriconi F., Di Meo A., Bufalari A., Gialletti R. Nostre esperienze nella chirurgia conservativa del prolasso della ghiandola lacrimale della III palpebra nel cane. Atti SISVET, 1995, 1125-1126.
3. Barnett K.C. Diseases of the nictitating membrane of the dog. J Small Anim. Pract., 1978, 18, 101-108.

4. Barnett K.C., Crispin S.M.: "Feline Ophthalmology", Ed. W.B. Saunders Company, London, 57, 1998.
5. Bojrab M.J. Current Techniques in Small Animal Surgery, Lea & Febiger ed., third ed., Philadelphia, 85-86, 1998.
6. Bojrab M.J. Disease Mechanisms in Small Animal Surgery. Lea & Febiger ed., second ed., Philadelphia, 145, 1993.
7. Bounous D.I., Carmichael K.P., Kaswan R.L., Hirsh S., Stiles J. Effects of Ophthalmic Cyclosporine on Lacrimal Gland Pathology and Function in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. *Vet. & Comp. Opth.*, 1995, 5, 1, 5-12.
8. Christmas R.E. Common ocular problems of Shih Tzu dogs. *Can. Vet. J.*, 1992, 33, 390-393.
9. Christmas R.E. Surgical correction of congenital ocular and nasal dermoids and third eyelid gland prolapse in related Burmese kittens. *Can. Vet. J.*, 1992, 33, 265-266.
10. Collins B.K.: Le malattie della terza palpebra del cane. Tratto da: "Veterinary Technician", 1995, 16, 11, 16-19.
11. Cook C.S., Peiffer R.L. Complications of Ocular Surgery. *The Comp. on Cont. Ed.*, 1985, 7, 9, 710-720.
12. Dugan S.J., Severin G.A., Hungerford L.L., Whiteley H.E., Roberts S.M. *J Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, 201, 12, 15, 1861-1867.
13. Gelatt K.N. *Veterinary ophthalmology*. 3 rd ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 609-614, 1999.
14. Guandalini A., Rovesti G., D'Anna N. Studio retrospettivo sulla tecnica di ancoraggio alla rima periorbitale per il prolasso della ghiandola della terza palpebra nel cane in 49 casi. *Veterinaria*, 1997, 11, 4, 7-11.
15. Helper L.C. The Effect of Lacrimal Gland Removal on the Conjunctiva and Cornea of the Dog. *J Am. Vet. Med. Assoc.*, 1970, 157, 1, 72-75.
16. Kaswan R.L., Martin C.L. Surgical correction of third eyelid prolapse in dogs. *J Am. Vet. Med. Assoc.*, 1985, 186, 1, 1, 83.
17. Martin C.L., Munnell J., Kaswan R. Normal ultrastructure and histochemical characteristics of canine lacrimal glands. *Am. J Vet. Res.*, 1988, 49, 9, 1566-1572.
18. McLaughlin S.A., Brightman II A.H., Helper L.C., Primm N.D., Brown M.G., Greeley S. *J Am. Vet. Med. Assoc.* Effects of removal of lacrimal and third eyelid glands on Schirmer tear test results in cats. *Vet. Med. Assoc.*, 1988, 193, 7, 1, 820-822.
19. Moore C.P., Frappier B.L., Linton L.L. Distribution and Course of Ducts of the Canine Third Eyelid Gland: Effects of Two Surgical Replacement Techniques. *Vet. & Comp. Opth.*, 1996, 6, 4, 258-263.
20. Morgan R.V., Duddy J.M., McClurg K. Prolapse of the Gland of the Third Eyelid in Dogs: A Retrospective Study of 89 Cases (1980 to 1990). *J Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1993, 29, 56-60.
21. Peiffer R.L., Nasisse M.P., Cook C.S., Harling D.E. Surgery of the Canine and Feline Orbit, Adnexa and Globe Part 5: The Conjunctiva and Nictitating Membrane. *Comp. Anim. Pract.*, 1987, 15-28.

22. Peruccio C. Atlante di oftalmologia veterinaria. Torino, Ed. Medico Scientifiche, 105-106, 1985.
23. Peruccio C. Il prollasso della ghiandola della terza palpebra nel cane. Boll. AIVPA; 301-306.
24. Puddu G.L., Petruzzi V., Schirru F. Tecnica della tasca per il riposizionamento della ghiandola della terza palpebra nel cane: studio retrospettivo. Atti S.I.C.V., 2002, 171-173
25. Read R.A., Dunn K.A., Smith K.C., Barnett K.C. A Histological Study of Nictitans Glands From Dogs With Overflow of Unknown Cause. Vet. & Comp. Ophth., 1996, 6, 3, 195-204.
26. Saito A., Izumisawa Y., Yamashita K., Kotani T. The effect of third eyelid gland removal on the ocular surface of dogs. Vet. Ophth., 2001, 4, 13-18.
27. Schoofs S.H.: Prolapse of the Gland of the Third Eyelid in a Cat: A Case Report and Literature Review. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 1999, 35, 240-242.
28. Severin G.A. Manuale di oftalmologia veterinaria. Ed. SCIVAC, 79-83, 1990.
29. Severin G.A. Veterinary ophthalmology notes. 2 nd ed. Ft. Collins, Colorado State University, 214-217, 1996.
30. Stades F.C., Wyman M., Boevé M.H., Neumann W. Ophthalmology for the Veterinary Practitioner. Hannover, Schlütersche GmbH & Co., 93-96, 1998.
31. Stanley R.G., Kaswan R.L. Modification of the orbital rim anchorage method for surgical replacement of the gland of the third eyelid in dogs. J Am. Vet. Med. Assoc., 1994, 205, 10, 1412-1414.

LA SALIVA: APPROCCIO COMPLEMENTARE NELLA DIAGNOSTICA CLINICA E NELLA RICERCA BIOLOGICA

Marini A*., Cabassi E.

Introduzione

L'argomento saliva in campo veterinario è un tema sicuramente negletto; non altrettanto si può dire però in ambito umano, dove la letteratura degli ultimi anni ha prodotto diverse pubblicazioni sull'importanza che l'esame della saliva, quale mezzo diagnostico, può rivestire nell'identificazione di lesioni primitive delle ghiandole salivari ed ancor più nella caratterizzazione di affezioni sistemiche di tipo metabolico-immunologico o per trattamenti farmacologici più o meno leciti.

Com'è noto la saliva è un fluido fisiologico secreto dalle ghiandole salivari in quantità abbondante e con flusso relativamente costante.

Scopo della presente nota è quello di illustrare in forma succinta le conoscenze scientifiche della secrezione salivare nei mammiferi domestici, sulle sue componenti e sul loro significato funzionale, ma soprattutto di richiamare l'attenzione sulle possibilità d'impiego della saliva quale mezzo diagnostico primario o complementare in campo veterinario è zootecnico.

1. Cenni di anatomia funzionale

La saliva è secreta principalmente da tre formazioni simmetriche di cellule conosciute come ghiandole salivari maggiori: parotide, sottomascellare (mandibolare), sottolinguale in tutte le specie di mammiferi domestici, nonché la ghiandola zigomatica dei carnivori e la ghiandola molare del gatto. Vi sono altre numerose ghiandole salivari, c.d. minori, sparse nella mucosa orale.

Sul piano anatomofisiologico possiamo descrivere le ghiandole salivari in termini di unità funzionali (acino), formate di più cellule secernenti e da un articolato sistema duttale confluyente che termina in cavità orale (fig.1) [33-34-35-36].

Le ghiandole salivari sono lobulate con parenchima costituito da distinti lobuli secretori separati da setti interlobulari di tessuto connettivo. Le unità secernenti sono in genere sostenute da un gruppo di cellule contenenti filamenti di actomiosina, c.d. cellule mioepiteliali o cellule a canestro (fig.2). Data la loro localizzazione dentro la lamina basale che avvolge l'acino, esse vanno considerate parte dell'unità secernen-

* Borsista, Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria.

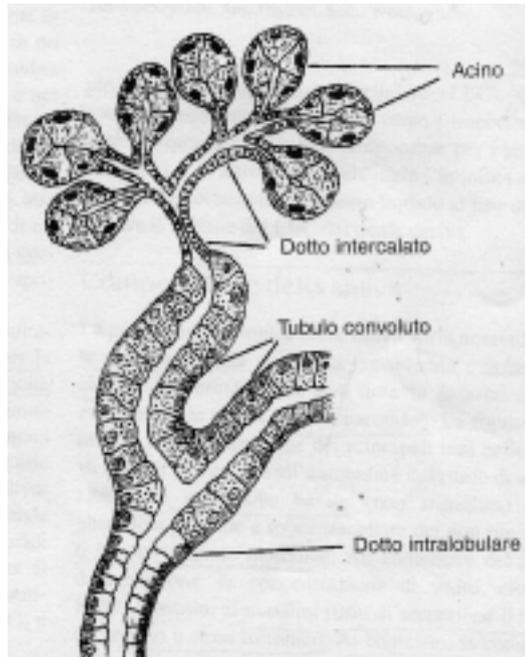


Figura 1 Sistema acinoso e duttale di una ghiandola salivare sottomascellare di bovino [30]

te. Le cellule mioepiteliali hanno un ruolo indiretto nel trasporto salivare (fase post-secretiva duttale). Esse infatti, oltre a supportare l'unità secernente che altrimenti si distenderebbe durante il processo secretivo, forniscono "forza propulsiva" per il transito e l'espulsione di secrezioni particolarmente dense [30].

La fig. 2 mostra i canalicoli secretori (s) che si aprono nel lume ghiandolare (lu). I canalicoli si addossano a livello delle giunzioni serrate o nexus (z) che li separano dagli spazi intercellulari laterali (ics). Diversamente dagli spazi intercellulari, i canalicoli non circondano la cellula su tutti i lati e quindi sono visibili solo in alcune sezioni particolari.

Le cellule adiacenti dell'acino sono agganciate da giunzioni intercellulari dette desmosomi che permettono scambi transcellulari di ioni e piccole molecole.

Ricerche condotte sulla ghiandola parotide di ratto [31] indicano una diversa permeabilità nel sistema giunzionale intercellulare: elevata permeabilità fra le cellule dell'acino, bassa permeabilità fra dotti intercalari, impermeabilità fra dotti striati.

I vasi ematici e linfatici e le fibre nervose penetrano nelle ghiandole in corrispondenza dell'ilo.

Il flusso ematico ha direzione opposta rispetto al flusso salivare; l'apporto di sangue arterioso all'intera unità funzionale è di tipo "controcorrente" [25].

Le ghiandole salivari hanno una doppia innervazione vegetativa: le fibre simpatiche e quelle parasimpatiche che controllano l'attività secretoria.

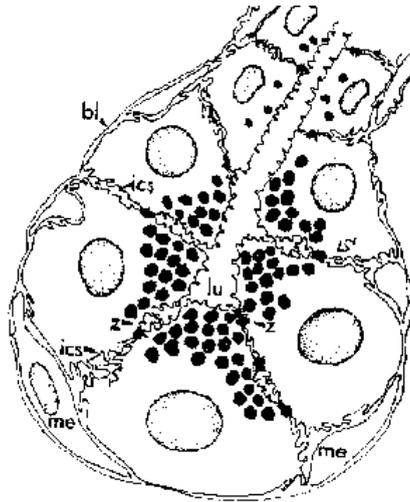


Fig. 2 Ricostruzione schematica dell'unità secernente di una tipica ghiandola sierosa come la parotide. Lume (lu); canalicoli secretori (s); giunzioni strette (z); spazi intercellulari laterali (ics); cellule mioepiteliali (me); capillare ematico (bl) [30]

In base alla tipologia del secreto si distinguono:

- ghiandole sierose: secreto acquoso, contenente proteine ma non mucine. Esempi: parotide nei mammiferi domestici; sottomascellare nei roditori;
- ghiandole mucose: secreto denso, viscido, ricco di mucine. Esempi: sottolinguale dei roditori; ghiandole disseminate nei mammiferi;
- ghiandole miste: secreto di composizione intermedia. Esempi: sottomascellare nel cane, gatto, ungulati; sottolinguale nel cane, gatto, cavallo, bovino, maiale.

2. Funzioni della saliva

Le funzioni espletate sono di:

- imbibizione dell'alimento: facilitazione della masticazione e deglutizione;
- solubilizzazione di molecole idrosolubili presenti nell'alimento, con conseguente agevolazione della percezione gustativa papillare;
- protezione della mucosa orale dall'azione potenzialmente traumatica dell'alimento ammorbidendo e lubrificando le parti molli della bocca e delle labbra;
- facilitare le fermentazioni della microflora nei prestomaci e apportare liquido con effetto tampone per la presenza degli anioni bicarbonato e fosfato;
- regolazione del bilancio idrico dell'organismo;
- fonte principale d'acqua per lo scomparto ruminale;
- termoregolazione nel cane e nel gatto;
- igiene a livello orale, poiché favorisce la rimozione dei residui di cibo e per l'effetto tampone limita le propagazioni batteriche;
- parziale azione digestiva negli onnivori, per la presenza di un'alfa-amilasi, detta ptialina (ghiandole salivari sierose);

- attività escretoria: eliminazione di molecole varie, di tossici, di virus, etc;
- apporto d'azoto, nei ruminanti, mediante l'urea presente nella saliva in modo da favorire le sintesi proteiche della microflora ruminale.

3. Premesse concettuali sul processo secretivo

La secrezione della saliva sinteticamente può differenziarsi in "fasi" che sono rappresentate da processi di:

- a) metabolizzazione specifica nella cellula ghiandolare di substrati d'origine ematica (introdotti / assorbiti) che è vettorializzata dal genoma cellulare;*
- b) emissione / eliminazione di sostanze, specifiche e non, mediante un secreto, attraverso una struttura duttale, convogliato nel sangue o in cavità dell'organismo.*

Affinché il fenomeno secretivo si attui è indispensabile il trasporto / passaggio delle molecole da metabolizzare dal sangue alla cellula secernente.

Conseguentemente nel secreto si possono rilevare diverse tipologie di molecole, che in base alla loro genesi, possono essere classificate in:

- molecole "specifiche" sintetizzate dalla ghiandola in esame;
- molecole presenti nel plasma che, nel secreto salivare, possono essere espresse ad una concentrazione più o meno elevata ed appartenere o non al pool fisiologico.

4. Formazione del secreto e meccanismi di trasporto

Una molecola circolante nel plasma per arrivare a livello duttale deve passare attraverso diverse strutture: parete capillare, membrana basale, membrana cellulare dell'epitelio ghiandolare.

Un altro percorso seguito dalle molecole è dato dal sistema giunzionale dell'epitelio secretorio, che permette il passaggio di queste dal liquido extracellulare interstiziale al secreto salivare attraverso i c.d. nexus.

Il flusso secretorio di una molecola è dato dal prodotto della concentrazione salivare per il flusso salivare ed è espresso in mM / min.

Differenti meccanismi di trasporto sono implicati nel passaggio delle molecole dal plasma alla saliva [1]:

1) Per ultrafiltrazione attraverso il sistema giunzionale delle cellule costituenti l'unità secernente.

Data la presenza nello spazio intercellulare dei c.d. nexus, solo molecole con p.m. < 1900 Da possono essere interessate.

Sono coinvolte molecole di piccole dimensioni sciolte nel plasma o nel liquido interstiziale: elettroliti ed ormoni (catecolamine e alcuni ormoni steroidei).

Le molecole che utilizzano questa modalità di passaggio hanno una bassa concentrazione salivare rispetto a quella plasmatica (da 1/300 a 1/3000).

2) Per ultrafiltrazione attraverso i pori delle membrane cellulari.

L'ultrafiltrazione permette il transito solo a sostanze con p.m. < 400 Da (acqua, elettroliti).

3) *Essudazione / trasudazione del plasma in cavità orale.*

La trasudazione origina dal solco gengivale o direttamente dalla membrana della mucosa orale.

Essa permette l'immissione nella saliva anche di molecole come l'albumina.

Allorché dalla trasudazione si passa all'essudazione, come in caso di gengiviti o di soluzioni di continuo della mucosa gengivale, nella saliva si hanno proteine di maggior peso molecolare (globulina, fibrinogeno).

Questo meccanismo può influenzare la valutazione sia degli ormoni steroidei che delle proteine nella saliva, dato che le concentrazioni plasmatiche sono più elevate rispetto a quelle salivari in condizioni normali, con possibile sovrastima nel risultato.

4) *Trasporto selettivo attraverso le membrane cellulari:*

a) *Diffusione passiva di molecole lipofile.*

Le variabili che influenzano questo tipo di trasporto sono elencate nella tab. 1. Solo molecole ad elevata liposolubilità possono attraversare le strutture sopra elencate, e la barriera che maggiormente ne condiziona il flusso, è data dalla membrana plasmatica della cellula secernente. Lo stesso meccanismo permette il passaggio di molecole attraverso le membrane delle cellule che limitano i dotti ghiandolari.

Gli ormoni steroidei non esterificati e non legati entrano nella secrezione salivare mediante questo meccanismo [1 – 2]. In questo caso si ha equilibrio fra la concentrazione salivare e quella plasmatica libera, con valori da 10 a 100 volte inferiori nella saliva rispetto al plasma. E' importante notare che, dato il passaggio relativamente veloce, l'equilibrio fra la concentrazione plasmatica e quella salivare tende ad essere costante. Oltre agli steroidi molte altre sostanze (farmaci) entrano nella saliva mediante diffusione passiva.

b) *Trasporto attivo dei peptidi attraverso i canali proteici.*

c) *Pinocitosi.* Utilizzato dalle proteine enzimatiche e non . Non esiste nessuna prova che questo meccanismo sia usato per il trasporto dei farmaci.

5) *Trasporto attivo mediato da sistemi di membrana (pompe) contro un gradiente di concentrazione.*

Gli ioni sodio sono attivamente pompate nelle cellule dell'acino generando così un gradiente osmotico tale che l'acqua e piccole molecole fluiscono nella cellula. Chiaramente questo tipo di meccanismo è operante per molti elettroliti e per alcune molecole come le IgA ed è stato dimostrato per penicillina e tetracicline, mentre per altre molecole è stato solo supposto.

In generale il trasporto attivo è invocato per le molecole che hanno un elevato rapporto saliva / plasma (S/P).

5. Processo secretivo e composti salivari

La saliva non è semplicemente un ultrafiltrato del plasma, ma piuttosto un fluido composito che si forma in conseguenza di diversi processi.

Essa è essenzialmente un fluido acquoso contenente proteine, elettroliti, cellule di desquamazione dell'epitelio buccale, linfociti, corpuscoli salivari e residui di cibo.

Tab.1. Fattori che influenzano la diffusione passiva molecolare dal sangue alla saliva [29]

Relativi alla molecola
Acidità , basicità, pKa
Solubilità lipidica
Carica o neutra
Peso molecolare e configurazione spaziale
Relativi alla concentrazione molecolare circolante in forma libera
Concentrazione ematica non legata al carrier
Dose e clearance della molecola
Concentrazione ematica totale
Relativi alla saliva
Velocità del flusso salivare
pH
Enzimi capaci di metabolizzare la molecola
Trasudazione plasmatica e volume totale della saliva
Legame proteico salivare

Dal punto di vista osmotico è isotonica o ipotonica rispetto al plasma.

La secrezione salivare può differenziarsi in primaria e secondaria (fig.3). La saliva primaria è secreta a livello dell'acino ghiandolare, mentre quella secondaria si forma lungo i dotti ghiandolari.

5.1 Composti inorganici

- Acqua

L'acqua è quantitativamente la componente più rappresentata (97-99%).

Essa determina il volume di saliva secreta nell'unità di tempo.

La quantità di saliva prodotta giornalmente è approssimativamente:

bovino: 100-200 l; suino 10-30 l; pecora: 60 l; cane e gatto: ½ l; uomo: 0,5-1,5 l.

- Elettroliti

Gli ioni principali presenti nella saliva sono: sodio, potassio, cloro, bicarbonato e fosfato.

Le cellule dell'acino pompano gli ioni sodio dal sangue nel lume ghiandolare. La differenza d'attività osmotica risultante fra il sangue e la secrezione primaria, causa il flusso di acqua dal sangue nel lume, attraverso le membrane cellulari e le giunzioni poste fra le cellule dell'acino.

La secrezione primaria è isotonica e simile per composizione elettrolitica a quella del plasma. Fanno eccezione le concentrazioni elevate degli ioni fosfato e bicarbonato nei ruminanti.

Con il fluire della saliva primaria lungo il sistema duttale si osserva (fig. 3):

- riassorbimento attivo del sodio e passivo del cloro;
- secrezione attiva degli ioni potassio e bicarbonato;
- secrezione attiva di H⁺ con parziale neutralizzazione degli ioni bicarbonato.

Durante il passaggio duttale la saliva rispetto al plasma contiene più ioni potassio e bicarbonato, meno ioni sodio e cloro, diventa più ipotonica in quanto le cellule dei dotti sono relativamente impermeabili all'acqua.

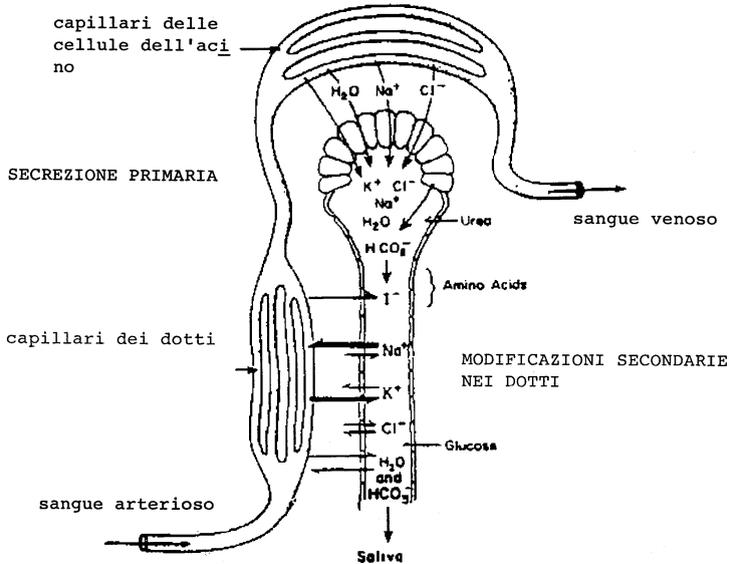


Fig 3. Schema dello scambio elettrolitico durante il processo secretivo nella ghiandola parotide. Secrezione primaria delle cellule dell'acino e secrezione secondaria nei dotti [26]

Nei mammiferi sono descritti due tipi di secrezioni: non stimolata (basale) e stimolata.

La secrezione basale della ghiandola parotide e sottomascellare dei non ruminanti è ipotonica e con pH vicino alla neutralità (6.2 – 7.4), mentre nei ruminanti è isotonica e alcalina (pH = 8.1) per la presenza di ioni bicarbonato e urea.

Nella fig.4 vengono schematizzate le variazioni elettrolitiche all'aumentare del flusso salivare (secrezione stimolata) sia nei non-ruminanti che nei ruminanti .

All'aumentare del flusso salivare nei non-ruminanti la concentrazione degli ioni sodio, cloro e bicarbonato aumenta, e ai valori massimi di flusso la saliva è isotonica [4].

Le cellule che delimitano i dotti hanno una limitata capacità di pompare il sodio fuori dalla saliva.

La diminuzione della $[K^+]$ si suppone che sia dovuta alla velocità costante di secrezione delle cellule che delimitano i dotti internamente.

Nei ruminanti invece all'aumentare del flusso si osserva una diminuzione della concentrazione di ione fosfato contemporanea all'incremento di ione bicarbonato [Fig. 4].

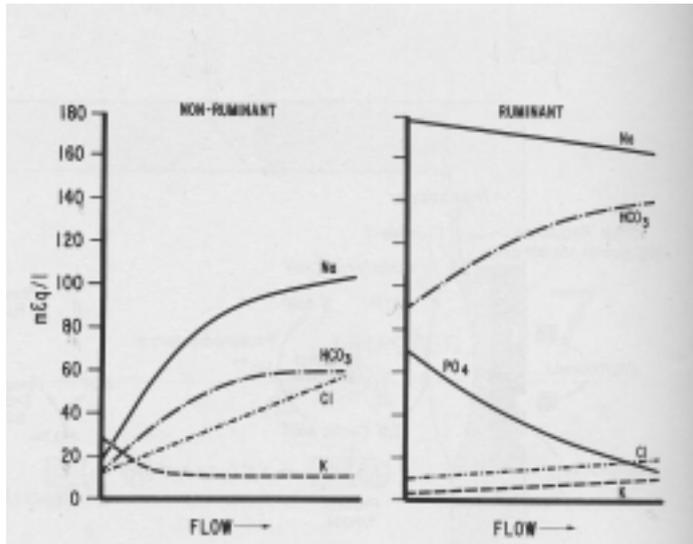


Figura 4. Concentrazione salivare dei principali elettroliti nei non-ruminanti e nei ruminanti in funzione dell'aumento del flusso salivare [25]

La saliva dei ruminanti è quindi costantemente tamponata con la prevalenza del sistema tampone bicarbonato durante l'ingestione dell'alimento e la ruminazione.

Quando il flusso salivare aumenta, la composizione salivare si avvicina a quella del secreto primario, perché i tempi di scambio (secrezione / riassorbimento) ionico a livello duttale sono ridotti.

I secreti parotidici del cane, gatto, ratto e uomo sono ipotonici quando il volume salivare è ridotto perché il riassorbimento duttale ionico e di acqua sono piuttosto scarsi [25].

5.2 Composti salivari organici

La maggior parte dei composti organici del plasma come proteine, lipidi, immunoglobuline, enzimi e ormoni possono essere rilevati nella saliva in tracce.

- Proteine

Appartengono a questo gruppo i composti sintetizzati dalle cellule degli acini. La loro origine è secretoria (95%), plasmatica o combinata.

La concentrazione delle proteine totali è trascurabile rispetto a quella del plasma (circa 1%) e sono rappresentate da:

- 1) glicoproteine (mucopolisaccaridi): forniscono viscosità alla saliva, protezione all'epitelio e rendono più appetibile il cibo.
- 2) enzimi: amilasi, lisozima, antiproteasi. La loro sintesi avviene all'interno della cellula ghiandolare secernente.

3) altre proteine: albumina e globulina sono di origine plasmatica. Le albumine, dato il loro peso molecolare, entrano nella saliva con il fluido gengivale e la loro concentrazione è relativamente ridotta (rapporto saliva / plasma < 1/500)

- *Lipidi*

La saliva contiene lipidi neutri. La loro concentrazione massima nella saliva mista nei mammiferi monogastrici varia da 3 a 15 mg /100ml. Il colesterolo e i suoi esteri, i mono, di e trigliceridi e gli acidi grassi rappresentano il 99% dei lipidi.

In accordo con i valori pubblicati in letteratura, sembra che la concentrazione salivare di queste molecole, le quali originano esclusivamente dal plasma, rappresenti solo 1/500 dei valori del siero [4]. Ciò corrisponde al rapporto saliva / plasma di molecole entrate in cavità orale col fluido gengivale, molecole per le quali la valenza dei test salivari non è molto indicativa.

- *Altre molecole organiche*

Aminoacidi, urea, ac. urico, creatinina ecc.

6. Controllo della secrezione salivare

Si ritiene fondamentalmente che, almeno per le piccole ghiandole salivari, per le ghiandole sottolinguali dei carnivori e per la mandibolare del coniglio, la secrezione sia spontanea e continua; come è per i ruminanti la secrezione parotidea. Mentre nelle altre specie la secrezione salivare è espressione di una risposta riflessa incondizionata il cui fattore più importante è l'ingestione del cibo.

La secrezione salivare di tipologia riflessa può essere modulata dal SNA.

Sia gli stimoli sui recettori periferici di tipo chimico e meccanico, dovuti alla presenza dell'alimento nella bocca e nello stomaco, sia gli stimoli visivi e olfattivi sono trasdotti in impulsi. Altri impulsi provengono dal centro del vomito.

Alcuni stimoli inducono una risposta riflessa (meccanorecettori, chemiocettori), altri attivano i centri salivatori nel midollo allungato. Da quest'ultimo, tramite il SNA, partono gli impulsi efferenti modulari che hanno come organo effectore le ghiandole salivari.

Con la stimolazione di fibre parasimpatiche post-gangliari colinergiche si ha: l'incremento del volume salivare prodotto, la diminuzione della concentrazione proteica e la vasodilatazione in tutte le ghiandole salivari.

Le fibre simpatiche post-gangliari adrenergiche hanno minor effetto sul volume salivare, mentre influenzano la composizione salivare aumentando la concentrazione proteica e la mucina. La stimolazione simpatica ha inoltre un effetto vasocostrittore.

L'attivazione del simpatico non antagonizza le risposte parasimpatiche, ma modifica l'attività secretiva delle ghiandole salivari in modo diverso a seconda della specie.

La prevalenza dell'attività di una delle due sezioni del SNA determina la tipologia salivare sopra descritta.

L'accoppiata stimolazione-secrezione è mediata per le fibre colinergiche dagli ioni Ca⁺⁺, mentre per le fibre adrenergiche dall'AMPc.

Nei ruminanti oltre alla regolazione nervosa viene segnalata anche una modulazione ormonale legata ai mineralcorticoidi che influenzano il rapporto cationico sodio/potassio della saliva[25].

L'aldosterone infatti, agendo sulle cellule dei dotti intercalari, incrementa il riassorbimento di Na⁺ e la secrezione del K⁺ (scambio) .

E' noto che nell'aldosteronismo il rapporto Na⁺: K⁺ della saliva diminuisce, mentre aumenta nella insufficienza surrenale.

7. Molecole salivari di interesse clinico e biologico

Attualmente i test salivari sono utilizzati per il monitoraggio oltre del pool molecolare fisiologico anche per i composti esogeni, per studi farmacocinetici, o per la determinazione di molecole impropriamente o fraudolentemente utilizzate in campo medico, zootecnico e veterinario [6-7-8-9-10].

7.1 Immunoglobuline

Sono secrete dai plasmociti della "lamina propria", principalmente dalle ghiandole salivari minori [4].

La tipologia per il 90% è rappresentata dalle IgAs che costituiscono la fonte primaria delle molecole di protezione del tratto respiratorio.

Diversi autori, in medicina, propongono la determinazione delle IgAs mediante metodiche di immunodiffusione radiale o con tecniche radio e immunoenzimatiche per vagliare la risposta immunitaria della cavità orale, del primo tratto respiratorio e altresì per valutare lo stato immunitario della persona che pratica agonismo sportivo [11-12-13].

Si sono proposti alcuni parametri, non ancora validati, per valutare la produzione salivare di IgAs; per es. la concentrazione salivare assoluta (mg / proteine totali) o la secrezione salivare per unità di tempo.

In veterinaria non si hanno pubblicazioni mirate al riguardo, se non limitatamente ad animali di laboratorio.

7.2 Ormoni non steroidei

Le catecolamine sono presenti nella saliva in quantità rilevabili (250-800 pg/ml). La loro origine è duplice: dal siero per diffusione o dalla stimolazione delle terminazioni simpatiche degli stessi nervi ghiandolari. Di conseguenza la loro concentrazione salivare è scarsamente correlata al contenuto plasmatico.

E' noto che in condizioni di stress le ghiandole salivari rispondono con il rilascio di noradrenalina in quantità significativa, di conseguenza è bene ricordare che il prelievo di saliva deve essere il meno "emozionale" possibile per l'animale.

7.3 Ormoni steroidei

La correlazione elevata fra concentrazione salivare e sierica è da rapportare alla modalità di passaggio degli ormoni steroidei nella saliva.

Il rapporto fra la concentrazione salivare e il livello plasmatico totale (1/10 a 1/100) dipende dall'entità di legame dell'ormone al suo carrier proteico e dalla elevata costante di permeabilità;

ne deriva che il tasso salivare degli ormoni steroidei è rappresentativo della frazione plasmatica libera, anche nelle situazioni in cui la concentrazione ematica può variare rapidamente [17].

Va sottolineato che il campionamento salivare costituisce la metodica di elezione per il dosaggio degli ormoni steroidei che risentono particolarmente delle condizioni di stress.

7.3.1 Cortisolo

Il cortisolo presenta un definito ritmo circadiano che in alcuni mammiferi si manifesta già nei primi 3 mesi di vita [18].

La media della concentrazione salivare di cortisolo nell'uomo varia da 15 nmol/l al mattino a 3 nmol/l alla sera [17], e il rapporto S/P è di circa 1/30 [15].

Parte del cortisolo è convertita in cortisone dall' 11-beta-idrossisteroide-deidrogenasi nelle stesse ghiandole salivari [14 - 19].

Le correlazioni fra cortisolo salivare e cortisolo sierico sono elevate nei mammiferi (da 0.6 a 0.9) [15-16].

Va ricordato che la determinazione salivare del cortisolo è un test diagnostico usato correntemente in clinica umana per il follow-up della sindrome di Cushing, per patologie psicologiche [20 - 21] e per la valutazione di mirate situazioni di stress [22]. Essa viene ritenuta comunemente più rispondente rispetto a quella plasmatica, [9-17] in quanto la concentrazione salivare è indipendente dal comportamento del CBG (cortisol bound globulin) che può complicare l'interpretazione dei risultati.

7.3.2 Aldosterone

Sull'aldosterone si hanno pochi riferimenti in letteratura.

Data l'assenza di una specifica proteina legante, di tutti gli ormoni steroidei l'aldosterone presenta il più elevato rapporto saliva/plasma (15%) [23]. Considerata la sua ridotta concentrazione plasmatica, il tasso salivare dell'ormone nell'uomo varia da 10 a 30 pg /ml in parallelo al ritmo circadiano.

7.3.3 Steroidi sessuali

Gli ormoni steroidei sessuali surrenali e delle gonadi sono stati rilevati nella saliva.

La correlazioni fra concentrazione salivare e concentrazione sierica libera e il rapporto saliva/plasma sono stati definiti per testosterone, estradiolo, estrone, estriolo, progesterone nonché per gli androgeni della corticale surrenalica [15].

7.3.3.1 Testosterone

Il testosterone sierico è legato al carrier specifico proteico (TeBG o SHBG) per il 98,5%. Da misure condotte mediante gascromatografia associata a spettrometria di massa, la concentrazione salivare è uguale alla frazione sierica libera, cioè 1,5% del testosterone totale sierico.

Tuttavia i risultati ottenuti con test radioimmunologici danno percentuali dall'1 al 5% [15]. Sembra che queste variazioni siano dovute a reazioni crociate del diidrotestosterone con pool diversi di anticorpi policlonali. Tali reazioni possono evocare valori sovrastimati per la presenza nelle ghiandole salivari di un'idrossilasi che converte oltre il 50% di testosterone in diidrottestosterone.

Pur in presenza di questi riscontri, il rilevamento del testosterone salivare viene ampiamente utilizzato [15].

In campo umano i livelli di testosterone sono rappresentativi della tendenza "anabolica", in contrapposizione al cortisolo, che è significante della tendenza "catabolica".

Questo viene spesso esplicitato dal rapporto testosterone/cortisolo le cui fluttuazioni sono associate al grado di allenamento o sforzo del soggetto sportivo [24].

7.3.3.2 Estradiolo, estrone, estriolo, progesterone

Gli ormoni femminili sono analizzati nella saliva dell'uomo, principalmente per il follow-up clinico delle patologie ovariche o in corso di procreazione assistita. I dati finora raccolti sono scarsi per l'estradiolo e l'estrone probabilmente per la loro bassa concentrazione nella saliva che ne rende difficile la misurazione, mentre più notizie si hanno circa la determinazione del progesterone salivare frequentemente usata per il follow-up del ciclo sessuale e della gravidanza della donna. L'estriolo salivare viene talvolta usato durante la gravidanza per indagini sulla vitalità o meno del feto [16].

7.3.3.3 Androgeni della corticale del surrene

Questi sono rappresentati da: androstenedione (A), 11-beta-idrossi-androstenedione (OHA), deidroepiandrosterone (DHA) e il suo solfato (SDHA).

L'SDHA non è liposolubile ed entra nella cavità orale solo mediante filtrazione. Esso presenta nell'uomo il rapporto saliva/plasma da 1/500 a 1/1000 [17] e un coefficiente saliva /plasma di 0,51, che supporta la significatività del suo rilevamento nella saliva.

Nell'uomo gli androgeni non esterificati hanno un rapporto saliva/plasma di: 1/10 per A e OHA, 1/30 per DHA [15], corrispondente al rapporto plasmatico libero/legato.

La loro concentrazione salivare è tale da consentire test radioimmunologici senza difficoltà in entrambe i sessi.

Nella pratica clinica umana, questi composti (ai quali va aggiunto il 17-idrossi-progesterone) sono usati per la diagnosi dell'iperplasia congenita cortico-surrenale e

nell'iperandrogenismo [17] . Gli androgeni surrenalici, a livello salivare vengono spesso determinati anche per valutare l'evoluzione puberale nelle giovani.

8. Metodi di analisi per la determinazione delle biomolecole nella saliva

8.1 Immunologici

I metodi immunologici sono ampiamente applicati in diversi settori della medicina.

I motivi principali del loro utilizzo sono dovuti alle limitate manipolazioni estrattive preliminari e alla elevata sensibilità di rilevamento.

Presentano comunque lo svantaggio della non specificità richiesta per distinguere i metaboliti dai loro precursori.

Per quanto concerne la determinazione degli steroidi nella saliva i metodi utilizzati sono principalmente:

a) *RIA (radioimmunoassay).*

Questa metodica si dimostra adatta specialmente per l'analisi di ormoni come: estradiolo, progesterone, testosterone, cortisolo e cortisone.

Il livello di sensibilità massima è di 10(-12) µM utilizzando (125 I);

b) *ELISA (enzime linked immunoassorbent assay).*

Il livello di sensibilità massima con determinazione spettrofotometrica è di 10(-10) µM;

c) *FIA (fluorescence immunoassay).*

d) *CIA (chemiluminescence immunoassay).*

Il livello di sensibilità massima è di 10(-12) µM e viene utilizzato soprattutto per la determinazione degli estrogeni nella saliva.

L'uso di mirate procedure immunologiche non radioattive come l'EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) è stato relativizzato tenuto conto del livello di sensibilità inferiore rispetto ai metodi sopra citati.

8.2 Metodi cromatografici

Questi metodi sono applicati per la determinazione di diversi tipi di biomolecole.

a) *Cromatografia su strato sottile (TLC)*

Ha il vantaggio della semplicità e della determinazione simultanea di più molecole. Il fattore limitante consiste nel rilevamento dei rispettivi "spots" sullo strato sottile della piastra, allorchè le molecole dosate sono in basse concentrazioni.

Questo metodo ha subito di conseguenza un contenuto utilizzo.

b) *Cromatografia ad alta prestazione su TLC (HPTLC)*

Con il suo utilizzo si sono migliorate la sensibilità e la precisione del metodo. Viene utilizzata per la determinazione sia di farmaci che di ormoni.

c) *HPLC (cromatografia liquida ad alta prestazione)*

Metodo spesso utilizzato per la determinazione di molti farmaci, per gli ormoni e i loro metaboliti.

d) GC (gascromatografia)

E' la tecnica più utilizzata in quanto permette il dosaggio di concentrazioni nell'ordine dei nano e pico-grammi. Il potenziamento del metodo si è ottenuto mediante associazione con la spettrometria di massa (GC/MS). Viene spesso applicato per la determinazione degli ormoni non proteici, per sostanze che creano dipendenza e nel doping.

Conclusioni

In diverse tipologie di ricerca applicata alla biologia e alla medicina, l'analisi della saliva costituisce un mezzo primario o complementare. Il suo utilizzo è in fase di avanzato sviluppo e fornisce la possibilità di adattarlo facilmente a molti protocolli di ricerca .

In campo veterinario la valutazione della saliva come mezzo diagnostico per ricerche di interesse immunologico e tossicologico è ancora ai primordi.

E' auspicabile che la saliva venga presa in attenta considerazione sia per test di patologie primarie del cavo orale o come substrato per esami complementari in grado di caratterizzare particolari affezioni morbose, ma soprattutto nel contesto valutativo di più o meno leciti trattamenti praticati nel campo delle produzioni zootecniche o delle attività sportive agonistiche negli animali.

I vantaggi nell'utilizzo della saliva in questo costruito diagnostico, oltre che per le determinazioni citate sono auspicabili anche:

- per la facilità di esecuzione del prelievo;
- per le contenute condizioni di stress evocabili per l'animale;
- per la consonanza tra valori plasmatici e salivari in animali con problemi comportamentali, dove la raccolta di routine del sangue risulta difficile;
- per l'agevole conservazione dei campioni. Possono essere mantenuti senza inconvenienti per una settimana a 4 °C o per 24h a temperatura ambiente [16];
- per il limitato rischio infettivo degli operatori che manipolano il campione di saliva rispetto al prelievo di sangue e di urine;
- per la limitatezza di interventi nelle preparazioni preliminari sul campione;
- per gli studi di farmacocinetica che si possono eseguire su molecole che variano notevolmente di concentrazione nel plasma nel corso della giornata;
- per l'elevata rappresentatività della frazione plasmatica libera delle molecole in esame.

Parole chiave: saliva, analisi, composizione chimica, secrezione, pool molecolare fisiologico.

Key words: saliva, assays, chemical composition, secretion, physiological molecular pool.

RIASSUNTO - *Questa sintetica rassegna, riguardante la secrezione salivare nelle sue varie componenti ha lo scopo di richiamare l'attenzione sull'esame della saliva quale test di interesse diagnostico e biologico in campo medico, veterinario e zootecnico.*

Dopo alcuni richiami di anatomia funzionale e della secrezione salivare, vengo-

no descritti i principali costituenti della saliva stessa e come essi entrano a far parte del secreto.

Sono illustrati inoltre in modo succinto i test concernenti gli ormoni steroidei (cortisolo e ormoni sessuali), la cui valutazione è ampiamente applicata in campo umano attraverso l'utilizzo di metodi analitici ad elevata sensibilità.

Nel settore veterinario è auspicabile un approfondimento di conoscenze sia per quanto attiene alla composizione della saliva e dei suoi costituenti come pool fisiologico che per eventuali ricerche di molecole di derivazione esogena, utilizzate per trattamenti più o meno leciti sugli animali allevati in produzione zootecnica.

SUMMARY - *The saliva: complementary approach in the diagnostic clinic and in the biological search*

This synthetic review on saliva secretion and its various components, is focused on what diagnostic and biological tests can be used in the veterinary field to examine saliva.

After some functional and physiological recalls about salivary secretion, some chemical components of saliva are described .

Subsequently steroids hormones (cortisolo and sexual hormones) tests and their application in human medicine are described.

This section focuses in particular on the sensitivity of the analytical methods.

In the veterinary field not much is known about saliva constituents and their physiological functions.

The study of saliva could evaluate the presence of molecules of exogenous origin and could be a useful tool in the identification of forbidden treatments in livestock animals.

Bibliografia

- 1 Haeckel R., Hanecke P. - The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. *Ann Biol Clin* 1993; 50: 903-910.
- 2 Vining RF, Mc Ginley RA, Symons RG - Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem* 1983; 29: 1752-56.
- 3 Chicharro JL, Legido JC, Alvarez J . - Saliva electrolytes as useful tool for anaerobic threshold determination. *Eur J Appl Phys* 1994; 69: 214-218.
- 4 Grimound AM, Pontet F, Arnaud C, Duffau D. - Dialogue avec le praticien. Dosage de protéines dans la salive: méthodologie. *OPTION/BIO* 1996; 156(Suppl.): 1-8.
- 5 Fulton A, Chan S, Coleman G. - Effect of salivary proteins on binding curves of radioimmunoassay kit: Amerlex-M progesterone, Amerlex cortisol and biodata testosterone. *Clinical Chem* 1989; 35: 641-4.
- 6 Matin SB, Wan SH, Karam JH. - Pharmacokinetics of tolbutamide: prediction by concentration in saliva. *Clinical Pharmacology Therapeutics*. 1974; 16, 1052-1058.
- 7 Lee TC, Charles BG, Steer PA. - Saliva as a valid alternative to serum in monitoring intravenous caffeine treatment for apnea of prematurity. *Ther Drug Monit* 1996; 18: 288-293.

- 8 Rodopoulos N, Norman A. - Assessment of dimethylxanthine formation from caffeine in healthy adults: comparison between plasma and saliva concentration, and urinary excretion of metabolites. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 259-268.
- 9 Marquet P., Lofti H., Debord J., Merle L., Lachatre G. - Dosage des drogues illicites dans la salive: Revue de la litterature. *Toxicorama* 1996; 8: 5-14.
- 10 Haeckel R., Bucklitsch I. - The comparability of ethanol concentration in peripheral blood and saliva. The phenomenon of variations in saliva to blood concentration ratio. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* 1987;25: 199-204.
- 11 Brandtzaeg P. Human secretory immunoglobulins. Concentration of parotid IgA and other secretory proteins in relation to the rate of flow and duration of secretory stimulus. *Arch Oral Biol* 1971;16: 1295-310.
- 12 Housh T.J., Johnson G.O., Housh D.J. - The effect of exercise at various temperatures on salivary levels of Immunoglobulin A. *Int. J. Sports Med.* 1991; 12: 498-500.
- 13 Mackinnon L.T., Ginn E., Seymour G.J. - Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval Exercise in elite kayakers. *Eur. J. Appl. Phys.* 1993;67: 180-4.
- 14 Vining R.F., McGinley R.A. - The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *J. Steroid Biochem* 1987;27: 81-94.
- 15 Lac G., Lac N., Robert A. - Steroid assays in saliva: a method to detect plasmatic contaminations. *Arch. Int Physiol Bioch. Biophys* 1993; 101: 257-62.
- 16 Vining R.F., McGinley R.A., Maksvytis J.J. - Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann. Clin. Biochem* 1983; 20:329-35.
- 17 Lac G. - Saliva assay in clinical and research biology. *Pathol. Biol* 2001; 49:660-7.
- 18 Riad-Fahmy D., Read G.F., Walker R., F. - Steroid in saliva for assessing endocrine function *Endocr. Rev.* 1982; 3: 367-95.
- 19 Ferrguson M.M., MacPhee G.B. - Kinetic study of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat submandibular Salivary gland. *Arch. Oral Biol* 1975; 20:241.
- 20 Kirschbaum C., Helhammer D. - Responses variability of salivary cortisol under psychological stimulation . *J. Clin. Chem. Biochem.* 1989; 27:237.
- 21 Kirschbaum C., Helhammer D. - Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and application. *Psychoneuroendocrinology* 1994; 19:313-33.
- 22 Sthal P., Dorner G. - Responses of salivary cortisol levels to stress situations. *Endocrinology* 1982; 80: 158-62.
- 23 Few J.D., Unwin R.J., Carmichael D.J.S. - Diurnal fluctuation in saliva aldosterone concentration. *J. Steroid Biochem* 1987; 26: 265-71.
- 24 Passelergue P., Robert A., Lac G. - Salivary cortisol and testosterone variations during an official and simulated weight-lifting competition. *Int J. Sport Med.* 1995; 16: 289-303.
- 25 H. Hugh Dukes - *Fisiologia degli Animali Domestici*, 2002, Idelson – Gnocchi; Pag 375-78.

- 26 Davenport, H. W. (1977). - Salivary secretion. In H. W. Davenport (Ed.), Physiology textbook series . Physiology of the digestive tract: an introductory text (Fourth ed., pp. 85-94). Chicago: Year Book Medical Publishers.
- 27 Chu, F. W., Ekins, R. P. (1988). - Detection of corticosteroid binding globulin in parotid fluids: evidence for the presence of both protein-bound and non-protein-bound (free) steroids in uncontaminated saliva. *Acta Endocrinologica*. 119, 56-60.
- 28 Hammond, G. L., Langley, M. S. (1986). - Identification and measurement of sex hormone binding globulin (SHBG) and corticosteroid binding globulin (CBG) in human saliva. *Acta Endocrinologica*. 112, 603-608.
- 29 Landon, J., Mahmud, S. (1982). - Distribution of drugs between blood and saliva. In G. F. Read, D. Riad-Fahmy, R. F. Walker, K. Griffiths (Eds.), Immunoassays of steroids in saliva: proceedings of the ninth Tenovus workshop, Cardiff november 1982 (pp. 47-55).
- 30 Young, J. A., Van Lennep, E. W. (Eds.). (1978). The morphology of salivary glands. London: Academic Press.
- 31 Simson, J. A. V., Bank, H. L. (1984). - Freeze-fracture and lead ion tracer evidence for a paracellular fluid secretory pathway in rat parotid glands. *Anatomical Record*. 208, 69-80.
- 32 Mazariegos, M. R., Tice, L. W., Hand, A. R. (1984). - Alteration of tight junctional permeability in the rat parotid gland after isoproterenol stimulation. *Journal of Cell Biology*. 98, 1865-1877.
- 33 Aureli G., Ferrandi B., Schneider R. (1975). - Ricerche istochimiche e ultrastrutturali della parotide di Sus scrofa nel corso della vita. *Riv. Istoch. norm. pat.*, XIX, 150.
- 34 Aureli G., Rizzotti M., Gobis B. (1960). - Contributo alla conoscenza delle modificazioni morfocitochimiche post natali nella parotide di cane. *Atti S.I.S. Vet.* 14, 292-295.
- 35 Bignardi C. (1961). - Evoluzione morfologica ed istochimica post natale nella parotide di alcuni mammiferi. *Riv. Istoch. norm. pat.* VII, 231-254.
- 36 Menghi G., Materazzi G., Vitaioli L., Bello L., Bolognani L. (1978). - La ghiandola sottolinguale del coniglio: indagini istochimiche e biochimiche. *Riv. Istoch. norm. pat.* XXII, 225-233.

SU ALCUNI ASPETTI DELLA PATOGENICITÀ DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Fabrizio Cattabiani*

Yersinia enterocolitica è un enteropatogeno per l'uomo e gli animali, dotato di spiccata attitudine invasiva, che si trasmette per ingestione di acqua e alimenti contaminati. I sintomi sono rappresentati da enterocolite acuta, con diarrea acquosa ed emorragica, che spesso evolve, nei bambini oltre i 5 anni e negli adulti, in un quadro clinico di pseudoappendicite con segni di ileite terminale e linfadenite mesenterica (11). La diffusione setticemica è rara ma descritta sia in ospiti normali, ma con elevata sideremia, che in immunodepressi (15, 22, 12): fra le conseguenze della setticemia si segnalano la comparsa di ascessi epatici e splenici (38), polmonite (35), artrite settica (46), osteomielite (43), cellulite (1), endocardite (4). Complicanze post-infettive di natura immunitaria, come artrite, eritema nodoso, sindrome di Reiter, glomerulonefrite e miocardite, sono predominanti presso le popolazioni scandinave e correlate ad un particolare alotipo dell'ospite (HLA-B27 positivo) nonché al biosiero-fagotipo 4/O:3/VIII (21, 2).

Tassonomia

Dalla prima descrizione del genere *Yersinia*, effettuata nel 1944 da VanLoghem, la situazione tassonomica si è evoluta e modificata in continuazione in conseguenza delle diversità emerse a seguito di indagini effettuate sia con tecniche classiche che di biologia molecolare.

Accanto alle 3 specie "storiche" - *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* - sono oggi descritte altre 8 specie che evidenziano profili biochimico-enzimatici tali da discostarsi dalla specie *enterocolitica* e proporsi, prima come ceppi "enterocolitica-like", poi come specie a se stanti: *Y. frederiksenii* (48), *Y. intermedia* (10), *Y. kristensenii* (7), *Y. mollaretii* (52), *Y. bercovieri* (52), *Y. aldovae* (8), *Y. rhodei* (3), *Y. ruckeri* (14).

Nell'ambito di *Y. enterocolitica* "sensu strictu" permangono tuttavia condizioni di variabilità fenotipica tali da imporre l'individuazione di 5 biotipi (53); più di recente, a conferma del fatto che la situazione tassonomica è ben lungi dall'essere cristallizzata, è stato proposto l'inserimento del nuovo biotipo 1B che si discosta dall'1A per la non utilizzazione della salicina e la mancanza dell'attività pyrazimidinica, biotipo in cui confluiscono ceppi isolati prevalentemente negli USA.

*Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi - 43100 Parma

Tabella 1. Differenze fenotipiche nell'ambito dei biotipi di *Yersinia enterocolitica*

Test	Biotipi					
	1A	1B	2	3	4	5
Salicina (24 h)	+	-	-	-	-	-
Xilosio	+	+	+	+	-	v
Trealosio	+	+	+	+	+	-
Sorbitolo	+	+	+	+	+	-
Lipasi	+	+	-	-	-	-
Esculina (24 h)	+/-	-	-	-	-	-
Indolo	+	+	v	-	-	-
V-P	+	+	+	+	+	+ (+)
Nitrati	+	+	+	+	+	-
Ornitina	+	+	+	+	+	+ (+)
Pyrazimidasi	+	-	-	-	-	-

(+): positivo con ritardo; v: variabile

Nell'ambito dei biotipi sono individuabili attualmente circa 60 sierotipi - con riferimento agli antigeni O - e svariati fagotipi (50, 51). Ceppi patogeni, isolati cioè nel corso di manifestazioni gastroenteriche o loro complicanze, sono ascrivibili a tutti i biotipi, con l'eccezione dell'1A che comprende stipiti cosiddetti "ambientali". La circolazione dei sierotipi patogeni appare ben delineata: in Europa prevalgono i sierotipi O:3 e O:9, negli USA O:8, O:3 e O:5,27, in Giappone O:5,27.

Tabella 2. Bio-sierotipi patogeni isolati con maggiore frequenza

Biotipo	Sierotipo
1B	O:8, O:4, O:13a, O:13b, O:18, O:20, O:21, O:9, O:5,27
2	O:9, O:5,27
3	O:1,2,3, O:5,27
4	O:3
5	O:2,3

Fattori di patogenicità

Le prime osservazioni sulle basi genetiche della patogenicità di *Y. enterocolitica* risalgono agli anni '80 e sono relative alla scoperta di un plasmidio (16) e, successivamente, allo studio di geni a localizzazione cromosomica (26). Nel primo caso si tratta di un plasmidio di 70-75 kb denominato da Portny e Falkow (36) pYV, nel secondo di loci cromosomici denominati *inv*, *ail* e *yst*.

Plasmidio - Il plasmidio pYV (plasmidio di virulenza di *Y. enterocolitica*), presente solo nei ceppi virulenti, codifica per l'espressione di numerose proteine (da 16 a 20), localizzate sulla membrana esterna della parete (34, 44). Una di queste è attualmente denominata YadA - in accordo con la nomenclatura adottata nel 1990 in occa-

sione del Los Angeles Meeting on Molecular Biology of *Yersinia*, termine che sostituisce Yop1 e proteina P1; si tratta di una proteina della membrana esterna, espressa a 37°C ma non a 25°C, di natura fibrillare, che ricopre la superficie batterica e media l'adesione del patogeno alle cellule della mucosa intestinale, specialmente a livello della regione ileo-ciecale (19, 24, 28). Inoltre la sua presenza induce un incremento dell'idrofobicità di superficie (20) - con conseguente aumento della resistenza alla fagocitosi (23), conferisce attitudine autoagglutinante (45) ed inibisce l'attivazione del complemento (33). Di recente è stata segnalata una ulteriore caratteristica che consiste nel proteggere il microrganismo eventualmente fagocitato dai processi litici ossigeno-dipendenti con la conseguenza che macrofagi e neutrofilo divengono essi stessi veicoli di disseminazione (5, 6, 41).

E' stato osservato che la presenza di YadA promuove l'adesione del batterio al muco: inopinatamente lo strato di muco a protezione della mucosa si trasforma - nel caso di *Y. enterocolitica* - da meccanismo di difesa ad elemento facilitante la colonizzazione; Paerregard et al. (28) hanno dimostrato che il microrganismo intrappolato nel muco si moltiplica più rapidamente metabolizzando sia la mucina stessa sia gli altri componenti del muco; inoltre il rivestimento di muco trasforma l'idrofobicità di superficie in idrofilia, condizione che facilita l'adesione all'epitelio.

Geni cromosomici - L'individuazione di due determinanti cromosomici, denominati *ail* e *inv*, ha consentito l'esecuzione di ricerche che, con il ricorso a processi di deplezione e di ricombinazione, hanno iniziato a delineare alcuni aspetti fenotipici tuttora oggetto di studio e di interpretazione.

E' emerso che i ceppi "ambientali" o comunque non virulenti non posseggono una sequenza di basi omologa al gene *ail* ed il gene *inv*, pur presente, è represso (31, 27). Entrambi i geni codificano per l'espressione di proteine di membrana - chiamate anche "proteine di ingresso" - che coadiuvano l'adesione alla mucosa e ne condizionano l'invasione. L'ingresso nelle cellule mucosali, possibile solo nei ceppi *ail*⁺ e *inv*⁺ (23), consente il raggiungimento del sito di elezione del microrganismo rappresentato dalle cellule M delle placche di Peyer: come altri patogeni enteroinvasivi, salmonelle, shigelle e campilobatteri, viene trasportato dalle cellule M nella lamina propria della sottomucosa (17), ove si moltiplica e da dove, per via linfo-ematogena, può disseminare a tutto l'organismo.

La presenza del gene *ail* coadiuva il plasmidio pYV nell'aumentare la resistenza all'attività battericida del siero (9), caratteristica questa che si esprime al massimo grado nella fase stazionaria di crescita piuttosto che nella fase logaritmica (49). Pierson e Falkow (32) hanno inoltre dimostrato mediante processi di ricombinazione come il gene in oggetto intervenga anche nelle fasi di adesione e di ingresso.

Il gene *inv* codifica per una delle "proteine di ingresso" denominata anche "invasina" (30,18), che dà inizio all'ingresso nelle cellule epiteliali legandosi ai recettori specifici; la diretta responsabilità del gene nell'attività invasiva si desume dai risultati di indagini su ceppi di *Y. enterocolitica* invasivi e non invasivi: il trasferimento del gene *inv* dagli uni agli altri ha portato alla comparsa in questi ultimi di ricombinanti invasivi (31).

Quanto al gene cromosomico *yst*, infine, esso codifica per l'elaborazione di una enterotossina termolabile, denominata Yst (47, 29). Essa agisce stimolando la produzione di guanylateo-ciclastasi nelle cellule epiteliali intestinali e, nella sua conformazio-

ne molecolare, pare molto simile alla tossina termostabile degli stipiti enterotossigeni di *E. coli*. Il suo ruolo nella patogenesi della diarrea nell'uomo e negli animali è tuttora controverso essendo stati riscontrati risultati contraddittori (39). "In vitro" i ceppi *yst⁺*, enterotossigeni, elaborano enterotossina solo a temperatura ambiente o comunque non superiore a 30°C, ma non a 37°C: il gene, cioè, verrebbe represso a quest'ultima temperatura (29). Nonostante questa evidenza, alcune indagini effettuate "in vivo" su suinetti gnotobiotici (40), su topi (42) e su conigli (13) hanno, come accennato, evidenziato risultati contrastanti.

Più di recente, Mikulskis et al. (25), nell'intento di far luce su questa apparente contraddizione, hanno dimostrato come l'elaborazione di enterotossina in ceppi *yst⁺* a 37°C "in vitro" possa essere indotta aumentando l'osmolarità ed il pH del substrato sino ai valori normalmente riscontrabili nell'ambiente dell'ileo degli animali: il processo di trascrizione di *yst*, cioè, sarebbe "in vitro" - ma presumibilmente anche "in vivo", e ciò spiegherebbe il riscontro di risultati contraddittori - condizionato da ben definite condizioni chimico-fisiche.

In aggiunta alla enterotossina classica ne è stata descritta una nuova, denominata Yst II, prodotta da un ceppo non invasivo appartenente al bio-sierotipo 1A/O:6 isolato da un bambino affetto da diarrea (39). Sebbene le due enterotossine siano antigenicamente correlate, diversi sarebbero i geni che le codificano: lo dimostrerebbe il fatto che il ceppo produttore di Yst II non ha consentito l'ibridazione della biosonda recante la sequenza oligonucleotidica del gene Yst di uno stipite di *Y. enterocolitica* virulento.

Tabella 3. Caratteri genetici di virulenza e loro espressione fenotipica

Caratteristiche	pYV	<i>inv</i>	<i>ail</i>
Localizzazione plasmidica	+	-	-
Localizzazione cromosomica	-	+	+
Proteine di membrana	+	+	+
Adesività	+	-	+
Invasività	-	+	+
Autoagglutinazione	+	-	-
Protezione da:			
fagocitosi	+	-	-
lisi fagocitaria	+	-	-
attività battericida del siero	+	.	+

Patogenesi

Dal momento che la via usuale di infezione è rappresentata dal consumo di alimenti contaminati, il patogeno deve in primo luogo adattarsi al diverso livello di temperatura. L'adattamento è mediato dal plasmidio pYV: Lian et al. (23) hanno evi-

denziato come dopo già 6 ore dalla somministrazione orale al coniglio di ceppi pYV⁺, coltivati a 25°C, le proteine di superficie codificate dal plasmidio siano espresse nell'ambiente del piccolo intestino. Si presume che le cellule, incubate a 25°C, abbiano un limitato numero di copie di queste proteine o, come supposto da Portnoy e Martinez (37), esse siano presenti a livello citoplasmatico e inizino ad essere trasportate sulla membrana esterna quando la temperatura raggiunge i 37°C.

Quanto suaccennato porta a considerare come *Y. enterocolitica* sia sottoposta ad un ciclo di trasmissione "caldo-freddo" durante il quale il microrganismo, provvisto di tutti gli attributi di virulenza, viene eliminato da un ospite a sangue caldo, contamina acqua o alimenti - regolando o abolendo il suo corredo di fattori di patogenicità - e provvede di nuovo ad aumentare rapidamente il numero delle copie delle sue proteine di membrana non appena torna a trovarsi alla temperatura di 35-37°C. Sembra, cioè, che esista nell'ambito dei numerosi fattori di patogenicità di *Y. enterocolitica* una cooperazione armonica in funzione della temperatura ambientale. In un primo momento, in seguito all'ingestione di alimenti contaminati - e quindi in condizioni termiche ben inferiori a 35-37°C - i ceppi virulenti farebbero ricorso ai determinanti di patogenicità sotto controllo cromosomico, indipendenti dal livello di temperatura, per iniziare la colonizzazione; successivamente, in seguito all'acclimatazione alla temperatura dell'ospite, esprimerebbero i fattori di patogenicità sotto controllo plasmidico, comprendenti i meccanismi atti a contrastare le difese dell'organismo, la fagocitosi, la devitalizzazione ossigeno-dipendente, l'attivazione del complemento.

Da quanto sommariamente accennato emerge un patogeno dalla fisionomia estremamente poliedrica e dotato di notevole versatilità, sul quale, nonostante la mole imponente di ricerche delle quali è stato fatto oggetto, permangono a tutt'oggi numerosi interrogativi.

Parole chiave: *Yersinia enterocolitica*, fattori di virulenza, ipotesi patogenetiche.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, some virulence factors, pathogenesis.

RIASSUNTO - Vengono presi in considerazione alcuni aspetti della patogenicità di *Yersinia enterocolitica*. Ne emerge la fisionomia di un patogeno estremamente versatile, in grado di adattarsi a diverse condizioni ambientali e di contrastare le difese dell'ospite mediante numerosi fattori di patogenicità codificati da geni a localizzazione cromosomica e plasmidica.

SUMMARY - *Yersinia enterocolitica* is a most versatile bacterial pathogen. Endowed with an array of chromosomal and plasmid-mediated virulence factors, this microorganism has emerged as the species capable of navigating through various host defense mechanisms.

Bibliografia

1. ABRAMOVITCH H., BUTAS C.A. (1973). Septicemia due to *Yersinia enterocolitica*. Can. Med. Assoc. J., 109, 112-1115.

2. AHO K., LIRISALO-REPO M., REPO H. (1985). Reactive arthritis. Clin. Rheum. Dis., 11, 25-40.
3. ALEKSIC S., STEIGERWALT A.G., BOCKEMUHL J., HUNTLEY-CARTER G.P., BRENNER D.J. (1987). *Yersinia rohdei* sp. nov. isolated from human and dog feces and surface water. Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 327-332.
4. APPELBAUM J.S., WILDING G., MORSE L.J. (1983). *Yersinia enterocolitica* endocarditis. Arch. Intern. Med., 143, 2150-2151.
5. AUTENRIETH I.B., KEMPF V., SPRINZ T., PREGER S., SCHNELL A. (1996). Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrin and cytokines. Infect. Immun., 64, 1357-1368.
6. AUTENRIETH I.B., VOGEL U., PREGER S., HEYMER B., HEESEMANN J. (1993). Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57 BL/6 mice: comparison of time course histomorphology and immune response. Infect. Immun., 61, 2585-2595.
7. BERCOVIER H., URSING J., BRENNER D.J., STEIGERWALT A.G., FANNING G.R., CARTER G.P., MOLLARET H.H. (1980). *Yersinia kristensenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of sucrose-negative strains (formely called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol., 4, 219-424.
8. BERCOVIER H.A., STEIGERWALT A.G., GUIJOLE A., HUNTLEY-CARTE G., BRENNER D.J. (1984). *Yersinia aldovae* (formarly called *yersinia enterocolitica*-like group X2) a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from acquatic ecosystem. Int. J. Syst. Bacteriol., 34, 1166-1172.
9. BLISKA J.B., FALKOW S. (1992). Bacterial resistance to complement killing mediated by the *ail* protein of *Yersinia enterocolitica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3561-3565.
10. BRENNER D.J., BERCOVIER H., URSING J., ALONSO J.M., STEIGERWALT A.G., FANNING G.R., CARTE G.P., MOLLARET H.H. (1980). *Yersinia intermedia*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melibiose-positive strains (formely called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol., 4, 207-212.
11. CHANDLER N.D., PARISI M.T. (1994). *Yersinia enterocolitica* masquerading as appendicitis. Arch. Pediatr. Adol. Med., 148, 527-528.
12. CHIU H.Y., FLYNN D.M., HOFFRAND A.V., POLITIS D. (1986). Infection with *Yersinia enterocolitica* in patients with iron overload. Br. Med. J., 292, 97.
13. DELOR I., CORNELIS R. (1992). Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. Infect. Immun., 60, 4269-4277.
14. EWING W.H., ROSS A.J., BRENNER D.J., FANNING G.R. (1978). *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., 28, 37-44.
15. FOBERG U., FRYDEN A., KOHLSTROM E., PERSSON K., WEILBAN O. (1986). *Yersinia enterocolitica* septicemia: clinical and microbiological aspects. Scand. J. Infect. Dis., 18, 269-279.

16. GEMSKI P., LAZERE J.R., CASEY T. (1980). Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 17, 682-685.
17. GRUTZKAU A., HANSKI C., NAUMANN M. (1993). Comparative study of histopathological alterations during intestinal infection of mice with pathogenic and non-pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 423, 97-103.
18. ISBERG R.R., LEONG J.M. (1990). Multiple B₁ chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, 60, 861-871.
19. KAPPERUD G., NAMORK E., SKURNUK M., NESBAKKEN T. (1987). Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: Relationship to outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect. Immun.*, 55, 2247-2254.
20. LACHICA R.V., ZINK D.L. (1984). Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 44, 540-543.
21. LAITENEN O., TUUHEA J., AHVONEN P. (1972). Polyarthritis associated with *Yersinia enterocolitica*: clinical features and laboratory findings in nine cases with severe joint symptoms. *Ann. Rheum. Dis.*, 31, 34-39.
22. LENZ T., SCHULTE K.L., MEYER-SABELLEK W. (1984). *Yersinia enterocolitica* septicemia during long-term immunosuppression treatment. *J. Infect. Dis.*, 150, 963.
23. LIAN C.J., HWANG W.S., KELLY J.K., PAI C.H. (1987). Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid: an in-vivo study. *J. Med. Microbiol.*, 24, 219-226.
24. MANTLE M., BASARABA L., PERCOOK S.C., GALL D.G. (1989). Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus and mucin. *Infect. Immun.*, 57, 3292-3299.
25. MIKULSKIS A.V., DELOR I., THI V.H., CORNELIS G.R. (1994). Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol. Microbiol.*, 14, 905-915.
26. MILLER V.L., FALKOW S. (1988). Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Immun.*, 56, 1242-1248.
27. MILLER V.L., FARMER III J.J., HILL W.E., FALKOW S. (1989). The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect. Immun.*, 57, 121-131.
28. PAERREGAARD A., ESPERSEN F., JENSEN O.M., SILURNIK M. (1991). Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.*, 59, 253-260.
29. PAI C.H., MORS V. (1978). Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 19, 908-911.

30. PEPE J.C., MILLER V.L. (1993). *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6473-6477.
31. PIERSON D.E., FALKOW S. (1990). Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. Infect. Immun., 58, 1059-1064.
32. PIERSON D.E., FALKOW S. (1993). The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. Infect. Immun, 61, 1846-1852.
33. ILZ D., VOCKE T., HEESEMANN J., BRADE V. (1992). Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. Infect. Immun., 60, 189-195.
34. PORTNOY D., A., WOLF-WATZ H., BOLIN I., BEEDER A.B., FALKOW S. (1984). Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. Infect. Immun., 43, 108-114.
35. PORTNOY D., MARTINEZ L.A. (1979). *Yersinia enterocolitica* septicemia with pneumonia. Can. Med. Assoc. J., 120, 61-62.
36. PORTNOY D.A., FALKOW S. (1981). Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. J. Bacteriol., 148, 877-883.
37. PORTNOY D.A., MARTINEZ R.J. (1985). Role of plasmids in the pathogenicity of *Yersinia* species. Curr. Topics Microbiol. Immunol., 118, 29-51.
38. RABSON A.R., HALLETT A.F., KOORNHOFF H.J. (1975). Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. J. Infect. Dis., 131, 447-451.
39. ROBINS-BROWNE R.M., TAKEDA T., FASONO A., BORDUN A., DOHI S., KASUGA H., FONG G., PRADO V., GUERRANT R.L., MORRIS J.G. (1993). Assessment of enterotoxin production by *Yersinia enterocolitica* and identification of a novel heat-stable enterotoxin produced by noninvasive *Y. Enterocolitica* isolated from clinical material. Infect. Immun., 61, 764-767.
40. ROBINS-BROWNE R.M., TZIPORI S., GONIS G., HAYES J., WITHERS M., PRPIC J.K. (1985). The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. J. Med. Microbiol., 19, 297-308.
41. RUSSMANN H., RUCKDESCHEL K., HEESEMANN J. (1996). Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an endothelial monolayer by polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun., 64, 1016-1019.
42. SCHIEMANN D.A., (1981). An enterotoxin-negative strain of serotype is capable of producing diarrhoea in mice. Infect. Immun., 32, 571-574.
43. SEBES J.I., MAYBRY E.H., RABINOWITZ J.G. (1976). Lung abscess and osteomyelitis of rib due to *Yersinia enterocolitica*. Chest., 69, 546-548.
44. SKURNIK M. (1985). Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. Infect. Immun., 47, 183-190.
45. SKURNIK M., BOLIN I., HEIKKINEN H., PIHA S., WOLF-WATZ H. (1984).

Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. J. Bacteriol., 158, 1033-1036.

46. SPIRA T.J., KABINS S.A. (1976). *Yersinia enterocolitica* septicemia with septic arthritis. Arch. Intern. Med., 136, 1305-1308.

47. STRALEY S.C., PERRY R.D. (1995). Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. Trends in Microbiology, 3, 310-317.

48. URSING J., BRENNER D.J., BERCOVIER J., FANNIN G.R., STEIGERWALT A.G., ALONSO J.M., MOLLARET H.H. (1980). *Yersinia frederiksenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive strains (formely called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol., 4, 213-218.

49. WACHTEL M.R., MILLER V.R. (1995). In vitro and in vivo characterization of an *ail* mutant of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 63, 2541-2548.

50. WAUTERS G., (1981). Antigens of *Yersinia enterocolitica*, p. 41-43, In: *Yersinia enterocolitica*, Bottone E.J. (ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

51. WAUTERS G., ALEKSIC S., CHARLIER J., SCHULZE G. (1991). Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. Contrib. Microbiol. Immunol., 12,239-243.

52. WAUTERS G., JANSSENS M., STEIGERWALT A.G., BRENNER D.J. (1988). *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovierii* sp. nov. formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. Int. J. Syst. Bacteriol., 38, 424-429.

53. WAUTERS G., KANDOLO K., JANSSENS M. (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. Contrib. Microbiol. Immunol., 9, 14-21.

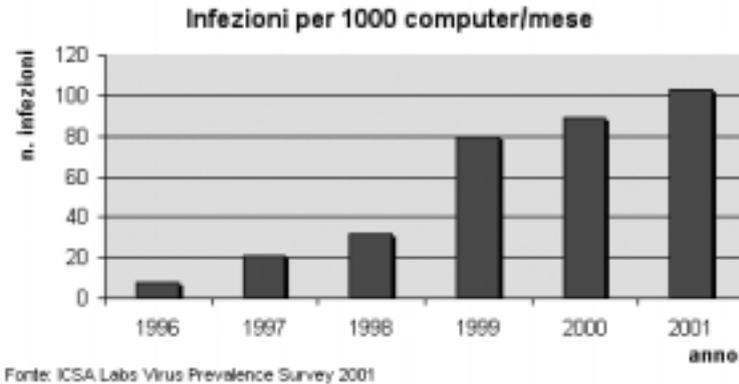
EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI DA VIRUS ANIMALI E VIRUS INFORMATICI: UN RAFFRONTO ARTIFICIOSO?

*Ezio Bottarelli**

Introduzione

Da oltre 15 anni i virus informatici (VI)¹ provocano danni agli utilizzatori di computer, con un tasso di infezione che è andato aumentando costantemente, passando negli U.S.A. dall'1% mensile nel 1996 a circa il 10% nel 2001 (Fig. 1) (Bridwell e Tippett, 2001). In passato, solo occasionalmente le epidemie hanno avuto un andamento esplosivo, coinvolgendo in tempi brevissimi un gran numero di macchine, ma ora la situazione è cambiata: i virus-worm, sfruttando la disseminazione via posta elettronica, hanno dimostrato più volte di possedere una potenzialità diffusiva finora impensabile.

L'impatto negativo del fenomeno "virus-informatici" sulle attività umane ha raggiunto livelli elevati, poiché i computer oggi infiltrano capillarmente il contesto socio-produttivo di tutti i Paesi industrializzati, ed una massa enorme di persone dipende, per attività talvolta vitali e comunque spesso di importanza basilare, da servizi erogati da computer o da reti di computer (traffico aereo e ferroviario, infra-



* Università degli Studi di Parma - Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Microbiologia e Immunologia Veterinaria.

¹ Per virus informatico si intende "un codice in grado di replicarsi e di diffondersi, all'insaputa dell'operatore, con l'utilizzo delle risorse di un sistema terzo". Per semplicità, in questa sede con la denominazione 'virus informatico' ci si riferisce impropriamente anche altri tipi di software "malizioso" (*malicious software* o "*malware*") come i *worm* (virus che diffondono via rete o posta elettronica) ed i *trojan-virus* (troiano = ossia programma che, per deliberata scelta del programmatore, fa una cosa diversa da quella che dichiara di fare; virus troiano = troiano capace di replicare e diffondersi).

strutture di erogazione di energia, sistemi bancari, telecomunicazioni ecc.). In questo quadro, il danno indotto da qualsiasi intrusione di software “contagioso” (cioè che possa essere trasmesso da un computer all’altro) in sistemi informatici critici può raggiungere un peso comparabile, certo non in termini di vite umane perdute ma senz’altro sul piano economico e sociale, a quello delle grandi epidemie che nel passato hanno condizionato storia e destino di molti popoli.

L’epidemiologia delle infezioni da VI è scienza giovane che ha ricevuto di recente un notevole impulso e si è sviluppata come gemmazione dell’informatica, pur essendo oggetto di interesse anche da parte di altre discipline, come ad esempio la sociologia (Boase e Wellman, 2001). Essa, per ammissione dei suoi stessi iniziatori, si basa largamente sull’epidemiologia medica (White e coll., 2002); in effetti possono essere individuati parallelismi sorprendenti nelle modalità di trasmissione tra agenti biologici (ed in particolare i virus animali, VA²) e VI all’interno di popolazioni ospiti (costituite rispettivamente da computer o animali). Ovviamente i metodi di indagine delle due discipline - l’epidemiologia informatica e quella medica - sono diversi, ma i principi di base riconoscono un identico approccio logico-speculativo (Murray, 1988). Il paragone fra VI e VA non deve essere ritenuto forzato né artificioso (Anon., 2002), se è vero che i VI sono assimilabili, seppure con numerose limitazioni, alla “prima forma di vita di intelligenza artificiale” (Spafford, 1994) e che i server di rete hanno una loro propria “vita sociale” (Kerbs, 2001). D’altra parte, anche l’obiettivo di entrambe le discipline è comparabile, almeno se si è disposti ad accettare l’assunto che il fine ultimo cui entrambe tendono è racchiuso in un’unica parola: “prevenzione”.

La “micro-” e la “macro-prospettiva”

Lo sviluppo della scienza medica, ed in particolare della microbiologia, ha condotto i microbiologi e gli epidemiologi ad affrontare lo studio della storia naturale delle malattie trasmissibili in un’ottica combinata di “micro-prospettiva” e di “macro-prospettiva”. La prima è rivolta all’analisi del microorganismo agente di malattia e della sua interazione con l’organismo ospite a livello molecolare o cellulare (patogenesi). Con la seconda (“macroprospettiva”) si individua invece un livello dimensionalmente superiore, rappresentato dallo studio delle caratteristiche e dell’andamento della malattia su scala di popolazione.

La “microprospettiva”

In termini di microprospettiva, non poche analogie esistono fra VA e VI: oltre alla ben nota contagiosità, basterà citare l’incapacità a condurre vita propria (tipica sia dei virus animali che di quelli informatici, i quali per riprodursi devono “agganciarsi” ad un programma ospite) e le minime dimensioni dei rispettivi agenti, che corrispondo-

² Nel testo, con la sigla VA si intendono non soltanto i virus propriamente detti, ma tutti gli agenti di malattia trasmissibile (batteri, virus, miceti, protozoi ecc.), ad eccezione dei macroparassiti.

no da un lato alla eseguità in lunghezza del genoma e, dall'altro, al numero molto ridotto (se paragonato a quello dei programmi convenzionali) di istruzioni contenute nel codice dei VI. Quest'ultimo elemento fa segnare un punto a favore dello studio di VI, che può analizzarne le caratteristiche e comprenderne il funzionamento molto più agevolmente - e senza alcuna apparecchiatura particolare - rispetto a quanto avvenga per lo studio dei VA.

D'altra parte, è noto che l'interazione tra un dato agente di malattia ed un determinato individuo ospite si può esplicitare con combinazioni pressochè infinite, in quanto dipendenti da una gran varietà di fattori e condizioni riguardanti la classica triade: agente, ospite, ambiente. Relativamente all'ospite, risultano particolarmente importanti, per l'attecchimento dell'infezione, elementi quali: specie animale di appartenenza, età, background genetico, risposta immune, condizioni di salute generale ecc. (Holmes, 1982).

Molto più semplice appare invece l'interazione computer-VI, per la quale, sempre restando a livello di microprospettiva, le variabili importanti sono rappresentate - oltre che dal tipo di virus - dalla piattaforma (Windows, MacIntosh, Unix, Linux ecc.) e dalla presenza di software antivirus più o meno efficace ed aggiornato. La prima variabile può essere vista come il corrispettivo della specie animale ed il secondo della risposta immune (Forrest e coll., 1997) o, più in generale delle difese biologiche. A questo proposito, va sottolineato che le nuove frontiere delle difese anti-VI vengono individuate in algoritmi ispirati al sistema immunitario degli animali e capaci di riconoscere il *self* dal *non-self* (D'Haeseleer e coll., 1996; Forrest e coll., 1996; Kephart, 1994; Kephart e coll. 1995).

I VI, diversamente da molti VA, hanno uno spettro d'ospite ristretto e limitato ad un solo tipo di piattaforma, fatta eccezione per alcuni virus del tipo "macro". Anche nell'interazione fra computer e VI possono interferire fattori assimilabili - in senso lato - alle variabili ambientali, come ad esempio la data che può rappresentare quello che gli informatici chiamano "*trigger*" (grilletto), cioè il fattore scatenante capace di attivare il potenziale distruttivo (se presente) del virus.

La "macroprospettiva"

Storicamente, per i VA l'approccio "macroprospettiva" ha preceduto quello della microprospettiva; infatti lo studio dei microrganismi ha richiesto il raggiungimento delle tecniche microbiologiche di base, cosa che è avvenuta soltanto a partire dalla fine del XIX secolo. La macroprospettiva ha invece consentito di raggiungere in passato risultati di tutto rispetto attraverso la semplice osservazione della malattia naturale, anche se con il sostegno indispensabile di doti accessorie quali: buon senso, discernimento, acume ed intuizione. Non possono essere dimenticati a questo proposito gli studi di preta impronta epidemiologica dovuti a Peter Panum (1820-1885), medico danese che, indagando su una epidemia di morbillo nelle isole Faeroe nel 1846 e raffrontando l'andamento della malattia in popolazioni diverse, giunse ad individuare alcuni parametri epidemiologici essenziali quali "morbilità", "infettività" e "recettività". Il primo grande trionfo dell'epidemiologia empirica è però attribuito a John Snow e riguarda lo studio - ormai divenuto un "classico" - di due epidemie di colera nella Londra della metà dell'800. In questo caso, i risultati in termini di macro-

prospettiva giunsero sia grazie alle straordinarie capacità di innovazione e di perspicacia di Snow che alla disponibilità di dati statistici, già allora piuttosto precisi, riguardanti la popolazione studiata, ed in particolare le tabelle di mortalità.

La disseminazione dei VA all'interno di popolazioni animali è condizionata da una estesa gamma di parametri di vario tipo (spettro d'ospite, infettività e stabilità dell'agente dell'ambiente, vie di escrezione, intervento di vettori, efficienza del contatto fra ospite infetto e ospite recettivo, densità di popolazione ecc.). Ancora una volta, è possibile individuare analogie fra VI e VA; in particolare, verranno qui accennate a quelle riguardanti le vie di trasmissione e la densità delle popolazioni ospiti.

Le vie di trasmissione

Pur con le limitazioni connesse con ogni generalizzazione e tenuto conto di numerose eccezioni, si può ammettere che le più frequenti vie di trasmissione per molte malattie infettive degli animali e dell'uomo siano la "trasmissione orizzontale diretta" (che implica un contatto fisico tra un ospite recettivo e un ospite infetto) e la "trasmissione orizzontale indiretta" (che implica un contatto con un veicolo intermedio animato o no).

Per i VI non è necessaria una autentica contiguità fisica fra macchina infettante e macchina da infettare, e quindi non esiste un corrispettivo della trasmissione diretta. Esiste invece la possibilità di una trasmissione indiretta, individuabile nello scambio di "materiale" diverso, come ad esempio programmi o floppy disk. Questa abitudine risale all'era pre-Internet e, per la sua stessa natura (gli scambi di files fra utenti non sono poi così frequenti), ha contribuito a tenere bassa la velocità di diffusione delle infezioni. Oggi la situazione è cambiata: quasi tutti i computer sono connessi ad una rete (tipicamente Internet) in permanenza o almeno saltuariamente, e ciò viene abilmente sfruttato dai creatori di VI, con un sistematico adeguamento delle strategie di attacco. Infatti, i virus informatici, che ovviamente non nascono per generazione spontanea, vengono creati incessantemente ed immessi nella "popolazione" - con i più diversi intenti ma spesso per irresponsabile divertimento - ad opera di persone in possesso di conoscenze informatiche più o meno approfondite.

Sotto il profilo dell'evoluzione dei VI, l'incessante attività dei programmatori di VI comporta due elementi favorevoli. Il primo è rappresentato dalla grande e crescente varietà di specie esistenti: nel 1997 se ne contavano oltre 10.000 (Gordon, 1997), mentre alla fine del 2002 il loro numero è stimato in 60.000, di cui fortunatamente pochi "*in the wild*" ossia attivamente circolanti. Il secondo è rappresentato dalla estrema rapidità di aggiornamento dei VI, i quali evolvono o - per meglio dire - *vengono fatti evolvere* in tempi infinitamente più brevi rispetto a quelli della naturale mutazione dei VA. Pertanto, le nuove generazioni di VI sono in grado di mantenere una elevata capacità di trasmissione nella popolazione e di sfuggire anche alle più efficaci difese (tipicamente: software antivirus).

La densità di popolazione

La densità degli individui che formano una popolazione costituisce un ulteriore elemento importante ai fini della disseminazione delle malattie trasmissibili.

Si possono riconoscere due archetipi di base: i “gruppi ad alta densità”, in cui numerosi individui sono in relazione reciproca ed i contatti con l’esterno sono scarsi e le “popolazioni ramificate”, ove gli addensamenti di individui, se presenti, sono di dimensioni minori ed i contatti fra individui sono meno frequenti (Fig. 2).

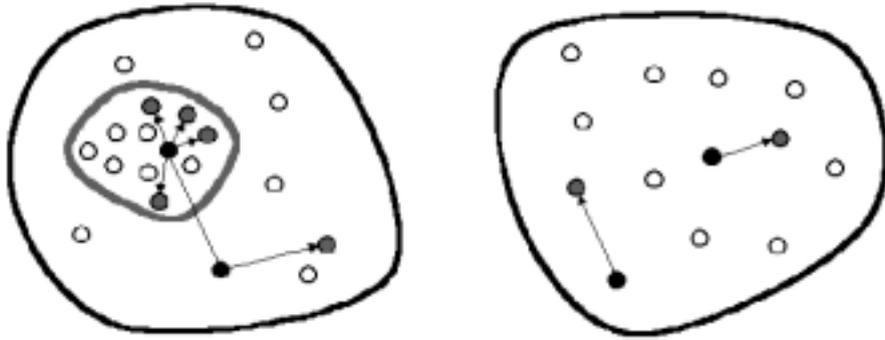


Figura 2. Densità di popolazione e trasmissione delle infezioni. A sinistra: un gruppo ad alta densità all’interno di una popolazione ramificata. A destra, una popolazione ramificata. I cerchi neri indicano gli individui infetti, quelli grigi gli individui in via di infezione.

Nella società contemporanea va comparando anche un altro modello, detto di “glocalizzazione” (*glocalization*) (Wellmann 1999; Hampton, 2001) in cui *clusters* di computer ad alta densità di relazioni condividono numerose ramificazioni con altre persone o gruppi; per gli animali, questo tipo di distribuzione spaziale è ipoteticamente riconoscibile, ad esempio, nel caso di allevamenti intensivi (cluster ad alta densità) che abbiano fra loro frequenti scambi.

Per i VI, i gruppi ad alta densità sono esemplificati dalle reti locali di computer in organizzazioni di grandi dimensioni, mentre per i VA la stessa situazione è bene esemplificata dagli animali in allevamento intensivo oppure da quelli che, pur conducendo vita libera, tendono a raggrupparsi spontaneamente. In queste popolazioni i virus (sia VI che VA) si trasmettono con grande facilità, non solo perché i singoli componenti sono a stretto contatto, ma anche perché essi sono altamente omogenei, in quanto tendono a condividere alcune importanti caratteristiche che influenzano la recettività all’infezione, come ad esempio, razza e età (negli allevamenti intensivi) oppure sistema operativo e software installato (nelle reti locali) (Hampton, 2001).

Sia i VI che i VA ottengono il massimo successo nella trasmissione se non distruggono rapidamente l’ospite. Infatti, un ospite vivo e possibilmente in buona salute rappresenta un elemento importante che favorisce la disseminazione dell’infezione. Se il VI non può eseguire il protocollo di istruzioni previsto dal suo codice perché si trova di fronte ad un software incompatibile, non riuscirà ad infettare il computer, analogamente ad un VA che non può infettare un individuo di una specie animale non recettiva. D’altre parte, un VI che distrugge le funzioni del computer ospite immediatamente dopo l’infezione si auto-preclude ogni possibilità di disseminazione, e quindi è destinato ad estinguersi; parallelamente, un VA che induce una

malattia a decorso iperacuto e rapidamente letale riduce l'efficienza della trasmissibilità e deve essere provvisto di altri meccanismi che gli assicurino la "sopravvivenza".

Per i suddetti motivi, i creatori di VI sono propensi a scrivere codici virali che rispettino la funzionalità della macchina-ospite indefinitamente (infezione inapparente) o almeno finché non interviene un eventuale fattore scatenante (*trigger*) previsto dallo stesso programmatore. Ad esempio, il virus *SirCam* era provvisto di un *trigger* a tempo, essendo programmato per rimanere silente fino al 16 settembre 2001, data in cui si sarebbe attivato cancellando gli hard disk (Vamosi 2001). Questa strategia ha il suo corrispettivo in alcuni VA, come ad esempio i retrovirus o, più tipicamente, gli herpesvirus, che danno luogo al fenomeno della latenza, cioè provocano una infezione persistente riattivabile in seguito ad eventi diversi (es. stress).

Oggi la via di diffusione preponderante dei VI è la posta elettronica; in tempi recenti i creatori di VI hanno adottato una nuova ed efficientissima strategia, favoriti dalla massiva diffusione di una stessa piattaforma (Windows) e di uno stesso *client* di posta elettronica, offerto automaticamente all'atto dell'installazione del sistema operativo. Agevolati dalla uniformità di popolazione nel mondo dei computer ed agendo con strategie innovative, i VI (più precisamente: *worm*) non attendono che l'utente infetto contatti via e-mail un'altra persona, ma sono in grado di appropriarsi autonomamente della rubrica dell'ospite (o addirittura di effettuare una scansione di tutti i file nella memoria di massa del PC, sempre alla ricerca di indirizzi e-mail) e di spedire un messaggio, unitamente ad una copia del virus, a tutti i riferimenti trovati (Newman e coll., 2002). Questa modalità di reperimento di nuovi ospiti recettivi genera una catena di infezioni che tende ad aumentare con tasso esponenziale e che, virtualmente, può consentire la disseminazione del VI su scala mondiale nel volgere di poche ore e comunque prima che gli utenti se ne rendano conto. Ad esempio, nel settembre 2002 l'epidemia di infezione da virus *Nimda* raggiunse una diffusione tale da consigliare l'Amministrazione di una Regione del Canada ad attuare un periodo di 1 giorno di "quarantena" (un'altra misura derivata dalle malattie infettive!) per tutti i computer in rete.

Riprendendo l'analogia con i VA, non si può fare a meno di notare come l'infezione extra-rapida ("*rapidly in - rapidly out*") (Thrusfield, 1995) rappresenti una delle strategie di sopravvivenza di alcuni agenti biologici, i quali hanno modo di passare da un ospite all'altro prima dell'instaurarsi di una efficiente difesa immunitaria. Questa strategia richiede la disponibilità continua di ospiti suscettibili ed è tipica, ad esempio, dei virus delle vie respiratorie superiori, i quali possono compiere l'intero ciclo di infezione-replicazione-escrezione in sole 24 ore. Per questa ragione, si ritiene che le società primitive, a bassa densità di popolazione, non conoscessero il comune raffreddore (Black 1975).

Anche per i VA la disseminazione a lunga distanza può verificarsi, sebbene in misura assai più casuale e meno mirata rispetto ai VI, attraverso veicoli naturali (venti, acque, uccelli migratori ecc.) o eventi legati ad attività umane (commercio di animali esotici e non, transumanza) oppure accidentali (trasporto insetti vettori per via aerea ecc.).

Dobbiamo però sottolineare, a questo punto, due significative differenze nella trasmissione dei VI e dei VA che giustificano la maggiore capacità diffusiva dei primi

rispetto ai secondi. Una differenza è dovuta al fatto che per i VI la geografia è non-consequenziale, in quanto le reti (e quindi i relativi *cluster* di computer) si formano e crescono indipendentemente dalla effettiva ubicazione geografica dei singoli componenti. L'altra differenza è riferita al fattore-tempo: nelle reti i contatti, ossia lo scambio di informazioni (ed eventualmente di VI!) avvengono con frequenza e velocità notevolmente superiore rispetto ai contatti che si possono avere in una popolazione di animali (Weissman, 2001).

I modelli

Un modello è una rappresentazione che contiene la struttura essenziale di un oggetto o un processo o un evento reale. Molto utilizzati in epidemiologia sono i cosiddetti "modelli matematici". Un modello matematico è un modello simbolico costituito da una equazione (o una serie di equazioni) che prende in considerazione i diversi parametri che sono coinvolti nella genesi e nella evoluzione del fenomeno studiato (in genere: la malattia). La messa a punto di modelli matematici che descrivono la dinamica della trasmissione delle malattie in popolazioni è da sempre uno degli obiettivi qualificanti dell'epidemiologia medica. La maggior parte del lavoro teorico si è basata, almeno inizialmente, sulla formulazione della "Legge di azione di massa", secondo cui il tasso di comparsa di nuovi casi è proporzionale al prodotto dei soggetti suscettibili (S) per gli infettanti (I) (Fine e coll., 1982) secondo la funzione

$$f_{S \rightarrow I} = \beta SI$$

dove β è un parametro che misura la possibilità che si verifichi un contatto efficiente in un dato lasso di tempo, assumendo che vi sia una completa omogeneità nella popolazione, cioè che ogni ospite abbia la stessa probabilità di interagire con ogni altro ospite (Daley e Gani, 1999). L'equazione rappresenta già, di per sé, un semplice modello, adattabile sia ai VA che ai VI, che prevede l'esistenza di due soli stati S e I (modello S-I-S). Aggiungendo l'eventualità di un terzo stato P (cioè protetto, con riferimento ad un animale immune oppure ad un computer provvisto di qualche difesa anti-virus), è possibile ottenere un modello di tipo S-I-P:

$$f_{I \rightarrow P} = I * \gamma / (\sigma + \delta)$$

$$f_{I \rightarrow S} = I * (1 - \gamma) / (\sigma + \delta)$$

La prima equazione misura la transizione di un ospite dallo stato di infezione a quello di protezione. Questa transizione è proporzionale al numero di infetti nella popolazione e si verifica con probabilità γ ogni $(\sigma + \delta)$ unità di tempo. Il parametro γ rappresenta la probabilità di immunizzazione dopo infezione. Il denominatore rappresenta il tempo totale che intercorre tra l'infezione e la comparsa di uno stato di protezione, ed è suddiviso in $\sigma + \delta$, che costituiscono rispettivamente il tempo tra infezione e diagnosi e quello tra diagnosi ed immunizzazione. Molto spesso, almeno per i VI, $\delta = 0$ in quanto si suppone che una macchina infetta venga immediatamente messa in quarantena e quindi cessa di essere infettante.

La seconda equazione descrive il passaggio dallo stato di infezione allo stato di suscettibilità, che avviene per le malattie che non lasciano immunità residua (VA) oppure per i computer da cui il VI viene rimosso ma in seguito non viene adottato alcun dispositivo di protezione antivirale (Weissman, 2001).

Il semplice modello generale è ora descritto è di tipo deterministico, in quanto le variabili di *input* assumono valori fissi, e pertanto l'*output* non dipende da eventuali fattori di incertezza (es. variazione casuale) che invece spesso assumono importanza nella realtà e che vengono invece considerati nei modelli detti "stocastici". Esso, messo alla prova nel tempo, si è dimostrato inappropriato per la maggior parte delle malattie, ma ha rappresentato il prototipo di una serie di modelli, alcuni di grande complessità, messi a punto sia nel campo dei VA (Billings e Schwartz, 2001) che dei VI (Kephart e White, 2001; Pastor-Satorras e Vespignani, 2001). In effetti, i modelli più recenti tengono conto di un maggior numero di parametri e delle loro possibili interazioni, e quindi risultano più efficienti e capaci di meglio rappresentare (e prevedere) l'andamento delle epidemie.

Parole chiave: epidemiologia, virus animali, virus informatici, infezione, trasmissione.

Key words: epidemiology, computer virus, animal virus, infection, transmission.

RIASSUNTO - L'epidemiologia delle infezioni da agenti biologici negli animali condivide alcune caratteristiche con quella delle infezioni da virus informatici nei computer. In particolare, possono essere individuate analogie riguardo agli eventi patogenetici, ossia alle interazioni fra agente-animale ospite e fra virus informatico-computer. Ancor più interessante, sotto il profilo epidemiologico, è lo studio dell'andamento delle epidemie a livello di popolazioni. A questo proposito, una delle variabili più importanti è indubbiamente rappresentata dalla densità di popolazione; infatti questo parametro condiziona la frequenza dei contatti fra i componenti della popolazione. Per quanto riguarda i virus informatici, lo scambio di file o di floppy disk può essere assimilato ad una sorta di trasmissione indiretta attraverso fomite o vettori. I virus informatici più recenti si trasmettono attraverso la posta elettronica. Questa temibile via trae profitto dall'uniformità delle piattaforme installate ed è paragonabile alla trasmissione a lunga distanza attraverso correnti aeree oppure a quelle malattie il cui agente utilizza la strategia detta "*rapidly in-rapidly out*"; essa può consentire la disseminazione dei virus informatici su scala mondiale in tempi e con una intensità assai superiore rispetto a qualsiasi malattia trasmissibile degli animali. Infine, lo studio dell'epidemiologia di entrambi i tipi di agenti (informatici e biologici) può condurre a risultati interessanti attraverso la messa a punto e l'applicazione di modelli matematici di tipo deterministico o stocastico.

SUMMARY - The epidemiology of animal infections shares some interesting features with the epidemiology of computer viruses (or trojan-viruses or worms). A few analogies can be observed regarding the pathogenesis of the infection (interaction between infectious agents and animal or between the computer virus and the host). More interesting is the study of the evolution of both kind of infections inside populations. One of the most important variables is the population density, which influ-

ences the rate of effective contact between members of the population. The sharing of floppies or files was rather common during the pre-Internet era, and this way of spreading can be compared with the indirect transmission (via fomites or vector) of animal viruses. More recently, computer viruses are spreading via e-mail. This could be seen as equivalent (regarding to space) to the long-distance transmission through air or water, or (regarding to time) to the “rapidly in-rapidly out” strategy of some viruses (i.e. those of common cold). Finally, the epidemiology of both type of agents can lead to interesting results with the application of mathematical models.

Bibliografia

1. ANON. (2002) DIMACS Working Group on analogie between computer viruses and immune systems and biological viruses and immune systems. June 10-13, DIMACS Center, CoRE Building, Rutgers University. <http://dimacs.rutgers.edu/Workshops/Analogies/> (accesso: 21 nov. 2002).
2. BILLINGS L., SCHWARTZ I.B. (2001) Exciting chaos with noise: unexpected dynamics in epidemic outbreaks. *Journal of Mathematical Biology*, Digital Object Identifier: 1 0.1007/s0028501001 1 0
3. BLACK F.L. (1975) Infectious diseases in primitive societies. *Science*, 187, 515-18.
4. BOASE J., WELLMAN B. (2001) A plague of viruses: biological, computer and marketing. *Current Sociology*, 49, 6,
5. BRIDWELL L.M., TIPPETT P. (2001) ICSA Lab 7th Annual Computer Virus Prevalence Survey, Trusecure Corp., Herndon, VA, U.S.A. <http://www.trend-micro.com/NR/rdonlyres/e5iokdy6cyre4parabrksi4gufe7rs66gqai7alc6kmfqlzv2adm4pqyz3mf3scepmez7rv4oayxp/icsavps2001.pdf> (accesso: 9 dic. 2002).
6. DALEY D.J., GANI J. (1999) Epidemic modeling: an introduction. Cambridge University Press, UK.
7. D’HAESELEER P., FORREST S., HELMAN P.O. (1996) An immunological approach to change detection: algorithms, analysis and implications. In: Proceedings of the 1996 IEEE Symposium on Computer Security and Privacy, Oakland, Ca, May 6-6. IEEE Press, Los Alamitos, pp. 110-19.
8. FINE P.E.M., ARON J.L., BERGER J., BRADLEY D.J., BÜRGER H.J., KNOX E.G., SEELIGER H.P.R., SMITH C.E.G., ULM K.W., YEKUTIEL P. (1982) The control of infectious disease. Group report. In: Population biology of infectious diseases, eds. R.M. Anderson and R.M. May, pp 121-47. Dahlem Konferenzen 1982. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
9. FORREST S., HOFMEYER S.A., SOMAYAJI A. (1997) Computer immunology. *Communications ACM*, 40, 10, 88-96.
10. FORREST S., HOFMEYER S.A., SOMAYAJI A., LONGSTAFF T. (1996) A sense of self for Unix processes. In Proceedings of the 1996 IEEE Symposium on Computer Security and Privacy, Oakland, Ca, May 6-6. IEEE Press, Los Alamitos, pp. 120-28.
11. GORDON S. (1997) What is wild? 20th NISSC Proceedings, Oct. 1997, Baltimore, Maryland. <http://src.nist.gov/nissc/1997/proceedings/> (accesso: 7 dic. 2002).

12. HAMPTON K. (2001) Living in the wired life in the wired suburb: netville and civil society. Doctoral Dissertation (cit. da Boase e Wellman, 2001).
13. HOLMES J.C. (1982) Impact of infectious disease agents on the population growth and geographical distribution of animals. In: Population biology of infectious diseases, eds. R.M. Anderson and R.M. May, pp 37-51. Dahlem Konferenzen 1982. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
14. KERBS V. (2001) Social life of servers. SocNet listserve, Aug. 9 (cit. da Boase e Wellman, 2001).
15. KEPHART J.O. (1994) A biologically inspired immune system for computers. Proc. 4th International Workshop on the Synthesis and Simulation of Living Systems, MIT Press.
16. KEPHART J.O., CHESS D.M., WHITE S.R. (1993) Computers and epidemiology. IEEE SSPECTRUM, May 1993. <http://researchweb.watson.ibm.com/antivirus/SciPapers/Kephart/Spectrum/Spectrum.html> (accesso: 20 nov. 2002).
15. KEPHART J.O., SORKIN G.B., ARNOLD W.C., CHESS D.M., TESAURO G.J., WHITE S.R. (1995) Biologically inspired defenses against computer viruses. In: Proceedings of the International Joint Conference on Artificial Intelligence.
18. KEPHART J.O. WHITE S.R. (1991) Directed-graph epidemiological models of computer viruses. IBM Antivirus Research - Scientific Papers. <http://www.research.ibm.com/antivirus/SciPapers.htm> (accesso: 9 dic. 2002).
19. LLOYD A., MAY M. (2001) How viruses spread among computers and people. Science, 292, 1316-17.
20. MURRAY W.H. (1988) The application of epidemiology to computer viruses. Computers & Security, 7, 130-50.
21. NEWMAN M.E., FORREST S., BALTHROP J. (2002) Email networks and the spread of computer viruses. Physical Review E, 66, 035101.
22. PASTOR SATORRAS R., VESPIGNANI A. (2001). Epidemic spreading in scale-free networks. Physical Review Letters, 86, (14), 3200-13.
23. SPAFFORD E.H. (1994) Computer viruses as artificial life. J. Artificial Life, 1, (3), 249-65.
24. THRUSFIELD M. (1995) Transmission and maintenance of infection. In: Veterinary epidemiology, 2nd ed., Blackwell Science, Cambridge, UK, pp 81-96.
25. VAMOSI R. (2001) SirCam worm is now a worldwide epidemic. <http://techupdate.zdnet.com/zdhelp/stories/main/0,5594,2800626,00.html> (accesso: 30 nov. 2002).
26. WEISSMAN G. (2001) Beubonica: mitigating duration and peak intensity with a new model of computer virus epidemics. DUJS, Dartmouth Undergraduate Journal of Science, Spring 2001, vol. III, n.2. <http://www.dartmouth.edu/~dujs/2001S/> (accesso: 7 dic. 2002).
27. WHITE S., KEPHART J., CHESS D. (2002) Computer viruses: a global perspective. IBM Antivirus Research - Scientific Papers. <http://www.research.ibm.com/antivirus/SciPapers.htm> (accesso: 5 dic. 2002).

IL CONGELAMENTO LENTO DI EMBRIONI BOVINI MICROMANIPOLATI: RECENTI PROGRESSI NELLA COMPOSIZIONE DEI *MEDIA*

Ambrosi V., Morini G., Parmigiani E., Bigliardi E.

Premessa

Le diagnosi embrionali precoci pre-impianto vedono negli ultimi anni una sempre maggiore diffusione, sia in campo umano che animale, seppure con finalità anche diverse ma tecnicamente coincidenti.

Purtroppo le diagnosi pre-impianto non possono prescindere dalla micromanipolazione dell'embrione e dalla successiva asportazione dei blastomeri, con un'inevitabile soluzione di continuo nella zona pellucida, il contatto con soluzioni certamente non ottimali, seppur per pochi minuti, ed una perdita di sostanza cellulare insita nella tecnica di biopsia [Kasai M., 2002; Ambrosi V. et al., 2001].

In campo animale, ma anche in medicina umana, un limite veramente importante è costituito dalla possibilità di conservare vivi e vitali i gameti femminili e gli embrioni micromanipolati, dal momento che fino ad ora il congelamento lento con *media* tradizionali ha dato risultati scadenti nella maggior parte dei casi [Agca Y. et al., 1998; Lange H., 1995; Niemann H. et al., 1993]

Una possibile soluzione a questo problema, che vede nella relativa impossibilità di conservare gli embrioni il più grande limite del diffondersi della tecnica, è stata individuata nella vitrificazione [Agca Y. et al., 1998].

Questa metodica, che è ancora in fase di definizione ma che ha cominciato a fornire risultati incoraggianti, ha anch'essa dei limiti dovuti, in realtà, più a problemi tecnici di scelta di materiali, *media* e metodiche standard che offrano sicurezze dal punto di vista sanitario e di reale praticità.

Affinché il congelamento di questo tipo di embrioni possa trovare applicazione, ed unitamente possa diffondersi maggiormente la tecnica del sessaggio, si sta rendendo necessario trovare una soluzione che preveda il congelamento lento associato a nuove molecole, in modo da garantire percentuali di gravidanza accettabili.

Considerazioni generali sui crioprotettori

I crioprotettori sono necessari per prevenire il danneggiamento delle cellule durante il congelamento e lo scongelamento degli embrioni.

Si possono distinguere due gruppi principali di crioprotettori:

- 1) permeabili a basso peso molecolare, tra i quali i più utilizzati sono il glicole etilico (PM 62) ed il glicerolo (PM 90);
- 2) non permeabili, a loro volta distinguibili in
 - non permeabili a basso peso molecolare, come saccarosio (PM 342) e trealosio (PM 378)

- non permeabili ad elevato peso molecolare (> 50,000 Daltons), come il polivinilpirrolidone (PVP) ed polivinilalcol (PVA).

La presenza di crioprotettori permeabili è essenziale affinché possa sostituirsi con l'acqua presente nell'embrione prima del raffreddamento riducendo al minimo la formazione di cristalli di ghiaccio nelle cellule; l'azione crioprotettrice è quindi basata sulla disidratazione delle cellule prima del congelamento e sulla protezione delle strutture proteiche.

Le molecole appartenenti al secondo gruppo, se associate a quelle del primo gruppo, proteggono ulteriormente l'embrione sia durante il congelamento che lo scongelamento alterando la formazione di cristalli di ghiaccio (le cui dimensioni si riducono ulteriormente), stabilizzando le strutture di membrana ed abbassando il grado di tossicità della soluzione.

Mentre il congelamento lento convenzionale prevede l'utilizzo dei soli crioprotettori permeabili, eventualmente associati a quelli non permeabili a basso peso molecolare, durante la vitrificazione si utilizzano associazioni di tutti e tre i tipi di crioprotettori.

Si evince che la soluzione ottimale è una miscela di diverse molecole e con un pH stabile tra 7,2 e 7,4 [Palasz A.T. et al., 1996].

Un altro capitolo è costituito dall'utilizzo di proteine di origine biologica nei *media* di congelamento: il siero, utilizzato originariamente per le proprietà surfattanti, è ancora utilizzato con questa finalità, dal momento che gli effetti stabilizzanti sulle membrane cellulari e la protezione nei confronti della zona pellucida durante il congelamento restano ancora supposizioni.

I sieri più diffusi sono quello fetale di vitello (FCS) o di bovina donatrice (DBS); essi però mostrano composizioni molto variabili anche all'interno dello stesso gruppo.

Anche l'albumina sierica bovina (BSA), pur essendo più controllata, ha le stesse caratteristiche e gli stessi limiti.

Un rischio costante in tutti questi tipi di molecole è costituito dalla possibile presenza di contaminazioni di tipo virale.

Questo problema è superabile mediante la sostituzione di queste proteine con altre macromolecole come polivinilalcol, polivinilpirrolidone, sodio ialuronato o il surfattante per trapianto embrionale VF-5 [Palasz A.T. et al., 1993], ma queste non sono purtroppo equivalenti al siero ed alla BSA [Massip A., 2001].

Metodiche di congelamento

Congelamento lento in equilibrio

Il tipo di congelamento più diffuso è senza dubbio il congelamento lento in equilibrio che prevede l'esposizione dell'embrione al crioprotettore a temperatura ambiente per tempi ben determinati dipendenti dalle caratteristiche fisiche delle molecole.

Il glicerolo, che ha peso molecolare superiore al glicole etilenico, permette tempi di contatto più ampi proprio a causa delle sue dimensioni, dal momento che impiega più tempo per attraversare le membrane cellulari.

Le tappe fondamentali per un corretto congelamento prevedono quindi una fase di equilibrio a temperatura ambiente, attesa di un minuto ad una temperatura variabile tra -5 e -7°C , induzione della cristallizzazione (*seeding*), discesa controllata della temperatura con un *cooling rate* di $-0,5^{\circ}\text{C}$ al minuto e immersione diretta in azoto liquido quando la temperatura è tra i -30 ed i -70°C .

Il *cooling rate* svolge un ruolo fondamentale per controllare la formazione dei cristalli di ghiaccio e quindi per la disidratazione graduale dell'embrione, favorita chiaramente dalla presenza di una soluzione sempre più concentrata.

Fig. 1

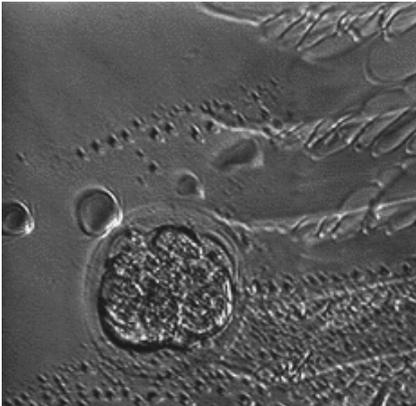


Fig. 2

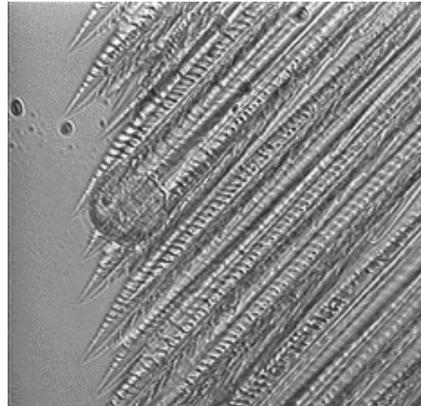


Fig. 1 e 2: formazione di cristalli di ghiaccio letali (fig. 1) e cristalli di ghiaccio compatibili con la sopravvivenza dell'embrione.

Lo scongelamento può essere a tappe, quindi con concentrazioni sempre minori di crioprotettore, come nel caso del glicerolo oppure ad una tappa unica (*one step*) mediante trasferimento diretto nell'animale ricevente, come nel caso del glicole etilenico [Parmigiani E. et al., 1999].

Le percentuali di gravidanza sono generalmente superiori al 55% [Palasz A.T. et al., 1993].

Congelamento non in equilibrio e vitrificazione

Il congelamento lento non in equilibrio è una metodica che prevede una veloce discesa della temperatura e l'utilizzo di soluzioni estremamente concentrate che causano una rapida disidratazione; il congelamento è completo prima che sia esaurita la fase di equilibrizzazione.

La vitrificazione si avvale dei medesimi presupposti ma utilizza soluzioni estremamente viscosi ed un *cooling rate* talmente elevato che la disposizione delle molecole della soluzione dopo il congelamento e l'aspetto stesso ricordano quello del vetro.

In questo caso la fase critica è quella dello scongelamento perché può verificarsi la formazione di cristalli di ghiaccio di grandi dimensioni, ma fortunatamente questi sono spesso extracellulari e quindi non letali per l'embrione.

Inoltre il tempo di esposizione alla soluzione di vitrificazione deve essere minimo poiché è molto tossica, trattandosi di una soluzione estremamente concentrata [Kasai M., 2002].

Le percentuali di gravidanza sono ancora inferiori rispetto al congelamento lento ma comunque accettabili, variando da un 40% ad un 55% [Palasz A.T. et al., 1996].

Nella pratica però non rappresenta una soluzione applicabile routinariamente, in primo luogo perché è un metodo ancora poco diffuso e soprattutto perché mancano protocolli funzionali standard, infine la procedura sembra molto semplice ma richiede manualità veloci e precise per garantire risultati positivi. Un altro problema da affrontare è quello del confezionamento, che purtroppo prevede il contatto diretto della soluzione di vitrificazione con l'azoto liquido, come nel caso delle OPS (*Open Pulled Straw*) e delle *grids*, che dal punto di vista sanitario non offrono garanzie sul mantenimento della sterilità del campione.

Questa tecnica offre comunque soluzioni per aree particolari in cui i metodi tradizionali falliscono: nella specie bovina ad esempio è utilizzata per crioconservare gli oociti, il citoplasma, gli embrioni nella fase di pre-compattazione per un successivo utilizzo dei blastomeri nella clonazione, embrioni prodotti in vitro e poi micromanipolati.

Congelamento rapido

Dopo un periodo di equilibratura variabile tra 30 secondi e 3 minuti, gli embrioni parzialmente disidratati sono raffreddati su vapori di azoto e quindi immersi in azoto liquido.

In questo caso le percentuali di gravidanza sono piuttosto basse, circa il 33% [Niemann H., 1991].

Micromanipolazione e nuove molecole

La micromanipolazione degli embrioni al fine di ottenere gemelli omozigoti o una biopsia per l'analisi del genoma si avvale principalmente di due tecniche: l'aspirazione di alcuni blastomeri con un sottile ago di vetro, oppure l'asportazione di una piccola porzione di blastomeri mediante microbisturi.

Ciascuna di queste tecniche presenta aspetti sia positivi che negativi: la prima ha il vantaggio di lasciare la zona pellucida quasi integra permettendo migliori risultati dopo congelamento, ma richiede tempi troppo lunghi per effettuare l'operazione (10 minuti) e nel 10% dei casi non è possibile l'analisi del DNA; la seconda è più invasiva ma ha maggiore applicabilità in campo ed i tempi per la biopsia sono ridotti a 3-5 minuti.

Per questi motivi viene preferita la seconda metodologia dalla maggior parte degli Autori che effettuano ricerche sul sessaggio e congelamento degli embrioni bovini.

La sensibilità al congelamento degli embrioni micromanipolati si presume sia dovuta alla perdita di integrità della zona pellucida ed al danneggiamento dei blastomeri, dal momento che circa il 10% di questi viene perso durante le operazioni di manipolazione ed un altro 10% durante il congelamento. Altri fattori influenzano la

sopravvivenza al congelamento, infatti gli embrioni prodotti in vitro sono più sensibili rispetto a quelli prodotti in vivo e quelli micromanipolati, appunto, sono più sensibili di quelli integri [Kasai M., 2002].

La scoperta di proteine, dette *antifreeze* (AFP), in pesci artici ed in alcune piante ha stimolato la ricerca verso nuovi *media* che ne prevedessero l'utilizzo. Nel confronto tra le percentuali di gravidanza da embrioni bovini interi vitrificati con AFP e BSA, i primi hanno mostrato i migliori risultati [Palasz A.T. et al., 1996] .

Una molecola di origine vegetale recentemente utilizzata con successo è l'arabinogalattano, un proteoglicano presente nella parete cellulare di alcune piante. E' composto da galattosio e arabinosio in rapporto 6:1 con tracce di acido glucuronico ed è utilizzato normalmente come agente immunostimolante, come integratore di fibra e nei casi di cancro.

Per quanto riguarda l'interazione a livello cellulare, l'arabinogalattano si lega alle membrane plasmatiche ed altrettanto rapidamente si separa da queste [Svetek J., 1999].

La funzione dell'AGP (*ArabinoGalactan Protein*) non è ancora del tutto chiarita sia a livello vegetale che nel congelamento di embrioni, ma sappiamo che nelle piante è implicata nel controllo della divisione, proliferazione ed espansione cellulare; la sua struttura e funzione nei vegetali può essere paragonata con quella dei proteoglicani di origine animale, mucine e altri componenti della matrice extracellulare.

Sicuramente le AGP rivestono un ruolo di primaria importanza nel fornire un'ulteriore protezione ai singoli blastomeri negli embrioni con soluzione di continuo nella zona pellucida; con ogni probabilità questa azione si esplica mediante la stabilizzazione dei lipidi di membrana ed in qualche modo proteggendo la cromatina [Lindsey B.R., 2002].

Uno studio comparativo molto interessante è stato condotto da Darrow M.D. (2001): tra i vari parametri considerati, sono riportate le percentuali di gravidanza ottenute con embrioni di grado 1 e 2 (IETS) sessati e congelati con *media* differenti.

Nella tabella 1 il primo *media* era costituito dall'1% di destrano, glicole etilenico e polivinilalcol (0,1mg/ml), il secondo da arabinogalattano, glicole etilenico e polivinilalcol ed il terzo, registrato come Zen-Noh, da glicole etilenico, glicole propilenico e lipidi ad alta densità.

In tutti e tre i casi lo scongelamento è stato effettuato lasciando in aria per 5 secondi la paillette e quindi 20 secondi in acqua a 35°C.

Tab. 1 percentuali di gravidanza ottenute da embrioni sessati congelati con *media* diversi.

Qualità embrioni	Destrano	Arabinogalattano	Zen-Noh	Media totale
Grado 1*	142/308 (46.1%)	94/168 (56.0%)	37/69 (53.6%)	273/545 (50.1%)
Grado 2	26/58 (44.8%)	14/28 (50.0%)	1/7 (14.3%)	41/93 (44.1%)
Totale	168/366 (45.9%)	108/196 (55.1%)	38/76 (50.0%)	314/638 (49.2%)

(*differenza non significativa; $P > 0,05$) [Darrow M.D., 2001]

In un altro studio Darrow M.D. (2002) ha confrontato le percentuali di gravidanza di embrioni di grado 1 e 2 sessati e trapiantati su manze e vacche, alcuni freschi ed altri congelati con *media* contenente AGP. I risultati più interessanti riguardano gli embrioni, chiaramente di grado 1, sessati e congelati: le percentuali di gravidanza sono state del 55,6 % nelle manze e 56,5 % nelle vacche senza differenze significative.

Il *media* utilizzato per il congelamento conteneva glicole etilenico 1,4 M, arabinogalattano e polivinilalcol nella quota di 0,1 mg/ml e la tecnica di sessaggio prevedeva biopsia mediante microbisturi.

Altre associazioni di crioprotettori sono state testate per gli embrioni sessati mediante microbisturi, ad esempio il glicole etilenico e agarosio all'1% hanno prodotto percentuali di gravidanza del 63,9 % [Dupras R. et al., 2000].

Conclusioni

La crioconservazione di gameti ed embrioni di mammiferi è ormai divenuta una parte integrante della riproduzione assistita, specialmente nelle specie domestiche.

La criobiologia apre ancora una volta orizzonti sempre più ricchi di innovazioni e possibilità di sviluppo per la ricerca, ma anche per una moderna ed efficiente "industria zootecnica".

Oggi il mercato richiede animali con elevati indici di pedigree, con le potenzialità di forti produzioni e con elevati parametri qualitativi, quindi sempre più intensa si è fatta la cosiddetta pressione di selezione.

A tutto questo ha contribuito in misura sempre maggiore la produzione di soggetti nati da embrioni prodotti *in vitro* e *in vivo* figli dei migliori soggetti provenienti dai paesi leader al mondo in campo di produzioni genetiche.

La movimentazione di animali vivi tra i vari Paesi in ambito UE, e soprattutto da e per il Nord e Sud America, risulta essere fortemente limitato dai problemi di ordine sanitario in relazione alle varie malattie infettive presenti e/o assenti in ciascuno Stato o Continente.

Il commercio e scambio di embrioni ed oociti congelati rappresenta la soluzione per questi problemi di tipo sanitario, in quanto se ogni anno ben più di 350.000 embrioni (IETS) vengono movimentati, nessuna organizzazione sanitaria ha denunciato alcuna trasmissione di malattie nelle riceventi di embrioni [Brock K. et al., 1997; Suttmoller P. et al., 1997].

Molteplici sono i fattori che possono influenzare i risultati di un congelamento embrionale e tra questi sono di rilevante importanza il grado di qualità dell'embrione, il tipo e concentrazione dei crioprotettori, le caratteristiche di atossicità dei materiali impiegati, gli standards operativi del personale, il grado di domestichezza con i protocolli di congelamento seguiti, l'animale donatore [Hill B.R. et al., 1998], così come i fattori legati alla regione geografica, alle riceventi, la selezione delle riceventi idonee, il tipo di scongelamento e le modalità di trapianto vero e proprio [Beal W.E. et al., 1998].

Gli embrioni micromanipolati in funzione di diagnosi pre-impianto inoltre sono esposti ad importanti stress osmotici e meccanici che li rendono sicuramente più sensibili ai protocolli di crioconservazione.

La loro micromanipolazione è indicata per la determinazione del sesso o di malattie di origine genetica, per la creazione di due o più gemelli omozigoti (*splitting*) o ancora per la conservazione dei singoli blastomeri.

La diffusione di queste metodiche dipende essenzialmente dalla possibilità di crioconservare con successo gli embrioni micromanipolati che, appunto, presentano una elevata sensibilità al processo di congelamento.

L'associazione di nuove molecole ai *media* per il congelamento tradizionale comincia a fornire risultati incoraggianti, ma ulteriori ricerche si rendono necessarie per ottenere maggiori percentuali di successo nel campo della crioconservazione degli embrioni micromanipolati.

Parole chiave: embrioni bovini, *media*, congelamento, micromanipolazione.

Key words: bovine embryos, freezing *media*, cryopreservation, micromanipulation.

RIASSUNTO – Gli Autori hanno brevemente descritto le tecniche ed i *media* più diffusi per il congelamento lento degli embrioni bovini; in seguito sono state descritte le caratteristiche principali dei *media* di recente introduzione per la crioconservazione degli embrioni micromanipolati.

SUMMARY – The Authors describe briefly the most known techniques and *media* used for slow freezing in bovine embryos; then they describe the principal characteristics of recent *media* to freeze micromanipulated embryos.

Bibliografia

Agca Y., Monson R.L., Northey D.L., Peschel D.E., Schaefer D.M., Rutledge J.J. "Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos" *Theriogenology* 50: 129-145, 1998.

Ambrosi V., Morini G., Parmigiani E., Bigliardi E. "Sessaggio embrionale nella specie bovina mediante PCR e successivo congelamento e trapianto: risultati preliminari" *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*, XXI: 81-90, 2001.

Beal W.E., Hinshaw R.H. and Whitman S.S. "Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer" *Theriogenology* 49: 240, 1998.

Brock K.V., Lapin D.R. and Skrade D.R. "Embryo transfer from donor cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus" *Theriogenology* 47: 837-844, 1997.

Darrow M. D. "Developments in freezing and thawing protocols for biopsied in vivo embryos" *Proceedings of AETA/CETA*, Omaha NE, 1-10, 2001.

Darrow M. D. "Pregnancy rates of sexed female fresh and frozen bovine embryos: a retrospective analysis" *Theriogenology* 57: 531, 2002.

Dupras R., Laurence S. "The use of agarose in the freezing of sexed bovine embryos" *Theriogenology* 53: 254, 2000.

Hill B.R. and Kuehner L.F. "Bovine donor blood cholesterol, embryo colour and embryo freezability" *Theriogenology*; 49: 168, 1998.

Kasai M., "Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification" *Reproductive Medicine and Biology* 1: 1-9, 2002.

Lange H. "Cryopreservation of bovine demi-embryos using ethylene glycol for direct transfer after thawing" *Theriogenology* 43:258, 1995.

Lindsey B. R. "Recent advances with embryo transfer media and related technologies" *The Proceedings of the Annual Conference of the American Embryo Transfer Association*, New Mexico, Oct 2002.

Massip A., "Cryopreservation of embryos of farm animals" *Reproduction of Domestic Animals* 36: 49-55, 2001.

Niemann H. "Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs" *Theriogenology* 35: 109-124, 1991.

Niemann H., Lucas-Han A., Stoffregen C. "Cryopreservation of bovine oocytes and embryos following microsurgical operations" *Molecular Reproduction and Development* 36: 232-235, 1993.

Palasz A. T., Alkemade S. And Mapletoft R. J. "Sodium hyaluronate as a substitute for biological proteins in bovine and mouse embryo freezing" *Cryobiology* 30: 172-178, 1993.

Palasz A. T., Mapletoft R. J. "Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances" *Biotechnology Advances* 4:2, 127-149, 1996.

Parmigiani E., Morini G., Ambrosi V., Bigliardi E., "Crioconservazione degli embrioni nella specie bovina". *Summa*, anno 16-n° 4, 49-54, 1999.

Sutmoller P., Wrathall A.E. "The risks of disease transmission by embryo transfer in cattle" *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot* 16: 226-239, 1997.

Svetek J.; Yadav M. P., Nothnagel E. A., "Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins" *J. Biol. Chem.* 274:14724-14733, 1999.

**MUSEO ANATOMICO DELLA FACOLTÀ
DI MEDICINA VETERINARIA DI PARMA
[LA FIGURA STORICA DI ALESSIO LEMOIGNE]**

Morini G.*, Panu R.°

La storia del Museo di Anatomia normale degli Animali Domestici si intreccia con quella della “SCUOLA DI VETERINARIA” e successivamente con quella della Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Università degli Studi di Parma. La “SCUOLA DI VETERINARIA” di Parma, aggregata alla Facoltà Medica, nasce il 22 ottobre del 1845 per effetto del Sovrano Decreto n.232 dato da Maria Luigia d’Austria presso il Casino de’ Boschi [9]. Sebbene le prime esperienze di insegnamento della “Veterinaria” risalgano già al 1814, queste rimasero sino al 1848, certamente, solo in forma teorica. Infatti il Prof. Pietro Delprato (primo direttore della Scuola fino alla propria morte) dà un’indicazione precisa circa l’esistenza o meno di una raccolta di preparati anatomici in seno alla Scuola di Veterinaria prima della costituzione di questa: “*La scuola di Parma del professor Benvenuti non diede al paese che tre allievi, e questi sortivano fra quelli che avevano ricevuta una maggiore istruzione anteriore, o che si erano già avviati alla filosofia: lasciò quest’unico testimonio della sua esistenza*”, prosegue “*...non promosse leggi sull’insegnamento ed esercizio della veterinaria, non formò ne diede principio a gabinetti, non raccolse libri, non lasciò, in una parola, alcuna cosa degna del tempo nel quale poté sussistere...*”, per ciò che riguardava l’insegnamento delle materie veterinarie sosteneva: “*... i giovani ricevertero un’istruzione ibrida, incompleta, che tutto voleva abbracciare, ma nulla comprendeva d’intero nell’anatomia ... si diveniva veterinari senza vedere alcun ammalato*” [15].

Dall’analisi documentale si può asserire che l’intenzione, almeno da parte del prof. Benvenuti c’era, ma il tutto restò *lettera morta*; egli stesso più volte cercò di sollevare il problema del luogo più idoneo dove insegnare in modo proficuo soprattutto l’anatomia e la clinica.

Con la nascita della “SCUOLA DI VETERINARIA” il *Gabinetto di Zootomia* procede all’allestimento e raccolta di preparati che vengono collocati negli ampi locali del Giardino di S. Vitale, Sede della Scuola [20,16].

Il bisogno di un Museo Anatomico emerse per porre rimedio ai risultati poco soddisfacenti della precedente esperienza dell’insegnamento della Veterinaria basato esclusivamente su studi teorici [15]. Il Museo Anatomico ha potuto pertanto assicurare agli studenti un efficace supporto pratico accanto a quello teorico, che rappresenta tuttora una peculiarità dell’insegnamento Anatomico nella Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma.

* Dipartimento di Salute Animale: Sezione di Clinica Ostetrica e Riproduzione Animale.

° Dipartimento di Salute Animale: Sezione di Anatomia degli Animali d’interesse Medico Veterinario.

Le buone intenzioni del prof. Lombardi (1815-1887) e del prof. Delprato (1815-1880), colonne portanti e fondatori della grande Scuola Veterinaria di Parma, non avrebbero avuto realizzazione senza l'avvento di una figura di larghe vedute ed in possesso di una passione fuori del comune che risponde al nome di Alessio Lemoigne.

Alessio Lemoigne

Nasce a Parma il 6 ottobre 1821 da genitori francesi al servizio presso la corte di Maria Luigia. Ben presto restò orfano di padre e la Duchessa, presasi a cuore le sorti del fanciullo, progettava di fargli seguire la carriera militare inviandolo presso la Scuola dei cadetti di Vienna [1,13,22].

La naturale inclinazione di Lemoigne si rivelò da subito nello studio e nella cura della Scienza zoottrica, infatti si iscrisse, al termine degli studi secondari, alla Scuola Veterinaria di Milano uscendone nel 1843 con il diploma d'ippiatro [1].

Tornò molto presto in patria e si iscrisse presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dove nel 1846 si laureò egregiamente.

Durante gli studi milanesi sicuramente conobbe i due medici parmigiani, Lombardi e Delprato e fu contemporaneo, e probabilmente compagno di studi, di un altro grande della medicina: Giovanni Inzani.

Non a caso queste tappe e gli uomini con cui venne a contatto, divennero determinanti nella vita scientifica e professionale del prof. Lemoigne.

L'*incipit* della carriera universitaria come *fine anatomico*, l'ebbe proprio dopo la laurea in medicina; infatti per Sovrano Decreto il 6 giugno 1847 il dott. Alessio Lemoigne viene posto all'ufficio di "Maestro delle dissezioni anatomiche e preparatore di Anatomia della Scuola di Veterinaria"; l'ufficio venne creato *ex novo* giacché la Scuola era da poco sorta e lo stipendio per tale incarico fu stabilito in "lire 600 annue" [17].

Possiamo certo affermare che di diritto Lemoigne è da considerarsi il primo dei Preparatori Anatomici che la Scuola di Veterinaria di Parma si è onorata di avere; i documenti da noi recuperati presso gli archivi dimostrano che in realtà il prof. Lemoigne già ben prima del giugno del 1847 si prodigò per il *Gabinetto Zootomico*; le nostre ricerche documentali e la ricostruzione inventariale dei preparati presenti oggi nel museo hanno dimostrato quanto affermato [20].

L'alacrità con cui operava nei suoi uffici, la preparazione e la competenza scientifica dimostrata gli valsero la nomina a coadiutore ai Professori di veterinaria Delprato e Lombardi.

Il decreto del 24 novembre 1848 così recita: "I Dott. Girolamo Cocconi ed Alessio Lemoigne daranno opera pel corrente anno accademico 1848-49 come coadiutori, senza diritto a retribuzione, all'insegnamento di quelle materie di Veterinaria che il Magistrato degli studi stimerà di poter loro affidare".



Esattamente un anno dopo, il 23 novembre 1849, reo d'aver cospirato insieme ad altri colleghi contro Carlo II di Borbone ed aver determinato la fuga di costui dal Ducato, venne definitivamente licenziato ed espulso dalla Scuola fino al 1854 [17], anno in cui Carlo III di Borbone venne ucciso e Maria Luigia d'Austria riprese il potere.

La pena per lui fu più severa e per quattro lunghi anni Lemoigne fu solo. Pur essendo laureato anche in medicina umana, negli anni passati forzatamente esiliato in Piemonte, non abbandonò mai la pratica della professione veterinaria quasi ad affermarne il decoro e la nobiltà di Scienza contro il mal giudizio allora corrente [13,21,22]; durante questo periodo il prof. Lemoigne lavorò alacremente nel campo clinico registrando e raccogliendo i casi più interessanti in note dettagliate ed allestendo, seppur con mezzi scarsissimi, preparati di anatomia normale e patologica.

A questo riguardo abbiamo recuperato una *“Nota dei Preparati di Anatomia Patologica Veterinaria raccolti negli anni 1849-53 offerti alle Scuole Superiori di Parma dal D’Lemoigne”*. Tale raccolta, composta di venti pagine redatta il 17 Maggio 1854, risulta essere inedita.

Il documento consta di 44 preparati descritti minuziosamente e per alcuni di questi, oltre all'anamnesi, fa seguire la storia evolutiva della malattia traendone e annotando anche sei lezioni [2].

In seguito, in data 18 Maggio 1854, Lemoigne invia una lettera al *Conte Preside degli Studi* [2] in cui fa l'offerta dei preparati alle *Scuole Superiori di Parma* esordendo con queste parole: *“In questi ultimi quattro anni per me assai lentamente passati fra grandi travagli e danni non lievi, essendomi conforto il continuare alla meglio gli studi d’Anatomia che con tanto fervore aveva intrapresi durante il mio impiego nel Regio Istituto Veterinario, ho potuto raccogliere varii pezzi d’Anatomia Patologica e prepararne altri d’Anatomia Normale.*

Ora, sebbene i medesimi siano lontani dalla voluta perfezione, difficile d'altronde a raggiungersi da me per mancanza d'ogni sorta di mezzi, utensili, locali, ecc, mi faccio ardito di pregare V.S.I. di accettare i 44 Preparati di Anatomia Patologica, quale umile presente ...”.

Cercava con tutti i mezzi di coltivare ciò che era tra le sue maggiori passioni, cioè lo studio dell'Anatomia, nella quale riteneva fossero le fondamenta della Scienza Medica ovvero l'allestire preparati attraverso cui i giovani studenti avrebbero tratto *“...grande vantaggio scientifico... si ammaestreranno dal mio esempio a non dimenticare fra le traversie della vita i buoni studi, e a crearsi nella cultura della scienza una durevole e certa consolazione.”* [2].

Fu proprio nel 1854, con il Sovrano Decreto del 25 novembre, che venne reintegrato nell'organico del Regio Istituto Veterinario ad occupare l'ufficio prepostogli, cioè quello di *Astante Preparatore, Maestro delle Dissezioni e Conservatore dei Gabinetti nella Scuola Veterinaria*, incarico che ricoprì fino al 1856.

L'opera del prof. Lemoigne non lascia traccia soltanto nello sviluppo del Museo di Anatomia Normale e nella raccolta di pezzi patologici, ma si rende concreto nell'aver contribuito inoltre alla crescita del Museo di Storia Naturale della nostra Università. Proprio per questo impegno il Presidente del Supremo Magistrato, *Pallavicino*, il 21 Agosto 1855 propone una remunerazione per il dott. Lemoigne.

Il contenuto di questa lettera recita: *“... il Dott. Lemoigne si è apprestato come*

preparatore nel Museo di Storia Naturale: e con rara maestria ha riunito lo scheletro d'una Giraffa; poi fatte varie preparazioni a secco di un Tigre, di cui sta attualmente preparando pure lo scheletro, insieme a quello di un Leone [20] e ad un altro di Jaguar. Per esso proporrei la gratificazione di £ 100." [12].

Questi preparati, ben riconoscibili, sono ancora presenti nel Museo di Storia Naturale dell'Ateneo, anche se lo scheletro di tigre non fu mai terminato e lo scheletro di *Jaguar* non compare nella raccolta attuale.

Lemoigne godeva di grandissima stima presso il Magistrato degli Studi; prova ne è la lettera del 9 gennaio 1855 in cui il dott. Antonio Corti esprime il desiderio di "... occupare il posto di *Adjutore ai Professori di Veterinaria che era di Cocconi ma di recente trasferito a insegnare Botanica a Piacenza, e altresì l'aggiunta del posto di Maestro delle Dissezioni d'Anatomia Veterinaria...*"; gli venne ben presto risposto in che "... *all'ufficio di Coadiutore sarebbe naturalmente indicato il Lemoigne sia per l'incarico da lui occupato sia per la sua scientifica capacità ...*" [12].

Con il Sovrano Decreto del 6 luglio 1857 n.162, con il quale venivano dettate nuovamente le regole per gli Studi di Veterinaria, il corso di studi fu portato da tre a quattro anni; per l'ammissione fu disposto che i giovani fossero in possesso della licenza del corso filosofico corrispondente alla licenza liceale e le cattedre in seno alla Scuola furono portate a quattro, ma le materie previste per l'insegnamento vennero ripartite in sette cattedre.

In virtù dello stesso decreto, finalmente, ai laureati del Regio Istituto Veterinario di Parma veniva conferito il titolo di *Dottori in Zoiatria* e come scrisse Negrini "*In tal modo questo Governo Ducale precorrendo i tempi, fu il primo in Italia ad elevare al grado di scienza la veterinaria ed a conferire al zoiatro la dignità che gli spettava*" [1].

Grazie al decreto del 1857 il prof. Lemoigne fu nominato inoltre Direttore del *Gabinetto Zootomico* e fino all'anno scolastico 1861-62 non venne nominato nessun *astante* alla cattedra, cosa che avvenne l'anno seguente con la nomina su tale incarico il dott. Clemente Papi.

La continua e quasi spasmodica ricerca anatomica lo porta nel 1861 a pubblicare, in collaborazione con il prof. Giovanni Inzani, un trattato dal titolo *Sulle origini e sull'andamento di varii fasci nervosi del cervello* [14] di cui una copia, di proprietà dello stesso Inzani, è presente nella Biblioteca Palatina.

Non possono essere dimenticati i due lavori svolti e pubblicati in collaborazione con il prof. Lussana, uno dei quali fu premiato dalla Regia Accademia di Medicina di Bruxelles con la medaglia d'oro. Tali opere si incentravano sullo studio dell'anatomia e sulla fisiologia del cervello e furono pubblicate con i titoli: *Fisiologia dei centri nervosi encefalici* (1871) e *Sui centri encefalici di movimento* (1877).

In particolare in una memoria dal titolo *Sui rapporti anatomici e funzionali delle circonvoluzioni del cervello* (1875) il Lemoigne a conferma "... *che nelle singole circonvoluzioni cerebrali siano localizzate le facoltà e attività e tendenze e istinti...*" porta le conclusioni degli studi condotti attraverso l'osservazione cranioscopica di numerosi uomini, con l'esame comparato dei caratteri "*cranici e psichici*" degli animali mediante la valutazione di alterazioni encefaliche circoscritte [13,22]; questi lavori giustificano il discreto numero di preparati anatomici che figuravano nel *Gabinetto Zootomico* riguardanti proprio tale argomento.

I meriti accademici furono molti, l'impegno nella ricerca fu costante, fu tra i primi ad abbracciare la *scuola sperimentale* [13], notevoli furono gli studi condotti sulla meccanica animale, pubblicati dal 1865 in poi quali: le *Ricerche sulla meccanica animale del cavallo* (1865), *Intorno ai fenomeni di alterata locomozione in conseguenza del taglio dei muscoli della nuca* (1870), *Equitazione e il suo fondamento nella meccanica del cavallo* (1871) ed infine le *Considerazioni critiche sulle teorie riguardanti l'atto del tirare nei quadrupedi* (1873).

Non a caso il *Gabinetto Zootomico* accoglieva, e fortunatamente per noi vi sono ancora presenti, preparati allestiti proprio su tali tematiche; seppe preparare magistralmente tre scheletri artificiali di cavallo nell'atteggiamento delle tre andature, passo, trotto e galoppo, oltre che due tavole con lo studio dell'apertura media dei vari angoli articolari durante la stazione e gli appiombi considerati di profilo nel cavallo.

Purtroppo di tali scritti a Parma non restano tracce, né nella biblioteca della Sezione di Anatomia degli animali d'interesse medico veterinario né negli archivi consultati per questo lavoro.

Fino al 1867 la nostra Università ebbe la fortuna di averlo nel corpo docente ed ancora di più tale vantaggio si ebbe nella Scuola di Veterinaria dove, sino alla fine del suo incarico, lavorò egregiamente arricchendo la collezione di preparati anatomici con pezzi sempre più interessanti, allo stesso tempo formò allievi pronti a seguire le sue orme ed emulandolo nell'arte della dissezione e della preparazione magistrale di lavori anatomici unici nel loro genere.

Uno per tutti fu proprio l'astante alla cattedra di Anatomia Veterinaria, il prof. Clemente Papi, colui che diverrà nel 1882 fondatore e artefice della collezione del museo anatomico dell'Università di Bologna.

Dal 1868 al 1870, lasciata Parma, occupò la cattedra di Zootomia e Zoofisiologia offertagli dalla Scuola di Milano ma, sorgendo proprio in quegli'anni la Scuola superiore di agricoltura a Milano, nel 1870 vi prese l'incarico come professore straordinario e successivamente di ordinario di Zootecnia con nozioni di anatomia, fisiologia ed igiene del bestiame.

L'animo artistico che albergava nel Lemoigne lo portava ad essere estremamente poliedrico e senza alcuna improvvisazione o pressapochismo affrontava i nuovi incarichi; ben presto si fece amare e stimare anche a Milano fondandovi un museo di zootecnia, primo in Italia nel suo genere.

Il Lemoigne si occupò più volte, con una visione quanto mai realistica oltre che moderna, dei problemi legati alla didattica ed allo sviluppo dell'ordinamento degli studi nelle Scuole di veterinaria e di agraria proponendo, al fine di migliorare e completare gli studi dei giovani, che fossero istituite accanto a tali scuole le stazioni zootecniche [22], progetto che intraprese anche a Parma insieme a Delprato.

Dal 1854 la Scuola "... *si rese da se stessa centro nel paese pel mantenimento di animali tipici miglioratori delle più utili specie d'animali domestici...* "; la presenza nelle scuderie della Scuola di alcuni stalloni, uno inglese e l'altro proveniente dall'Egitto da utilizzare come miglioratori delle razze autoctone [15,22], prefiguravano la volontà di creare una sorta di moderno "*Istituto di Incremento Ippico*".

Autore di più di 70 pubblicazioni a stampa insegnò fino all'età di settantotto anni. Dopo circa settantannove anni di vita, dei quali ben cinquanta spesi nell'insegnamento il 27 Maggio 1900 cessava di vivere in Milano [1].

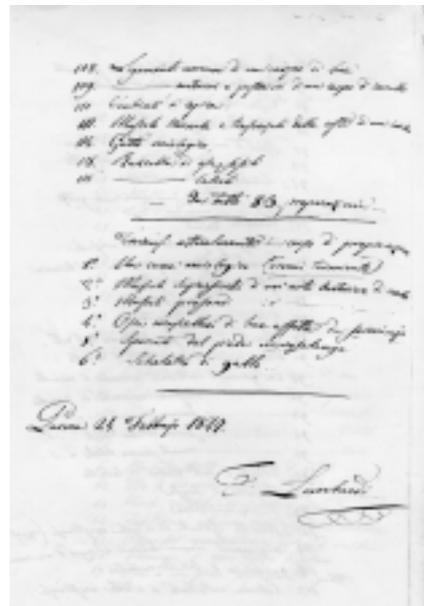
La fase propulsiva

Fu solo nel 1848 che la Scuola di Veterinaria, e quindi l'annesso *Gabinetto di Zootomia*, ebbero assegnati dei locali per l'esercizio completo delle loro funzioni. Con il Decreto di *Carlo II di Borbone Infante di Spagna* emanato il 16 marzo 1848 [11], vennero disposti undici articoli i quali modificarono e migliorarono le condizioni della Scuola stessa.

Visto l'acquisto fatto con il "Decreto dello Stato del 20 aprile 1847 N.ri 1514=1456 per l'acquisto del Giardino Sanvitale e del Giardino della Salnitara posti in Parma presso la Porta Santa Maria (porta Nuova) per uso della Scuola di Veterinaria" si stabilì che i fondi da destinarsi per l'esercizio annuale ammontassero a 4300 lire.

Di quella somma vennero destinate 360 lire ad un "Servente della Scuola Anatomica", 100 lire per l'acquisto "di venti cadaveri d'animali diversi per gli esercizi anatomici", lire 300 "per acquisto di pezzi patologici e preparazioni anatomiche da conservarsi nel Gabinetto Anatomico dell'Istituto", lire 400 "ad un Assistente alle due Cliniche" il quale fu certamente Lemoigne.

Con il decreto del marzo 1848 possiamo affermare che il *Gabinetto Anatomico* ebbe ad avere per la prima volta una connotazione ben precisa prendendo l'aspetto che gli era più consono. L'acquisto dei cadaveri per le preparazioni anatomiche, il disporre che tali preparazioni fossero conservate nel *Gabinetto*, ci danno la conferma che a Parma stava nascendo qualcosa di nuovo e di grandioso, il *Museo Anatomico*.



Questo documento del 24 Febbraio 1847, a firma del Prof. Lombardi [3], dimostra che il Prof. Lemoigne iniziò a lavorare per la raccolta dei preparati anatomici, a titolo gratuito, ben prima della nomina a "Maestro delle dissezioni anatomiche e pre-

paratore di Anatomia della Scuola di Veterinaria” ottenuta il 6 Giugno dello stesso anno. La suddetta “Nota delle preparazioni anatomiche eseguite dal Sig.^r Dot.^{re} Alessio Lemoigne ed esistenti nel gabinetto della scuola di Veterinaria” che a poco più di un anno dall’inizio dell’attività della Scuola ammontava già ad 83 lavori, consacra lo stesso Lemoigne a fondatore e primo curatore della raccolta giunta sino a noi [20].

L’autenticità del documento è confermata dalla presenza di alcuni di quei preparati citati nella “Nota”, nella raccolta esistente oggi nel Museo della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, e dall’esatta descrizione e catalogazione che il Prof. Lemoigne volle fortemente nel 1858. Quell’anno fu cruciale per le sorti a venire sia dello stesso Lemoigne che del *Gabinetto di Zootomia*.

Con l’allontanamento dalla Scuola del Prof. Lemoigne dal 1849 per i noti eventi insurrezionali a cui prese parte, l’attività del *Gabinetto Zootomico* passò per intero, fino al 1855, nelle mani del prof. Lombardi, il quale con l’aiuto dell’inserviente Romano Ronchey, in cinque anni non produsse altro che cinque preparati [18]; in realtà al Prof. Lombardi, dai dati emersi dalle nostre ricerche [20], sono da attribuire solo sette preparati di tutta la raccolta anche se, erroneamente e troppo superficialmente, gli fu sempre attribuita la paternità di un gran numero di preparazioni [1,4,20].

Nel 1854, mutate le condizioni politiche, il prof. Lemoigne cercò di riavvicinarsi al *Regio Istituto Veterinario* e lo fece donando, nel maggio dello stesso anno, una serie di preparati compiuti durante gli anni di assenza forzata [5].

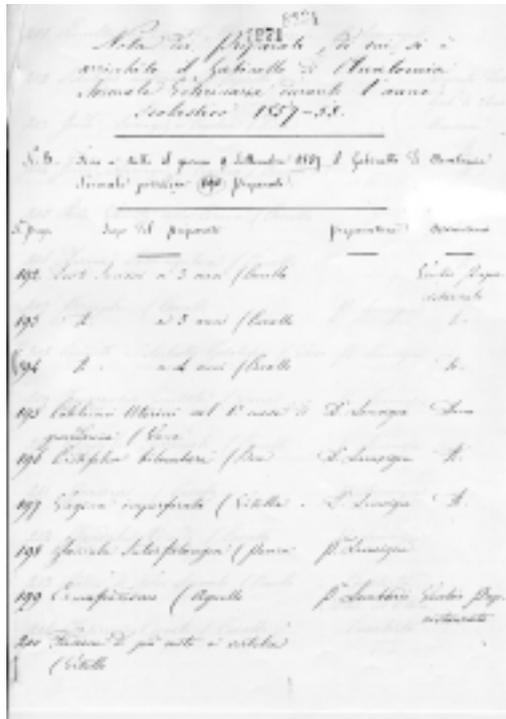
Al termine dell’anno 1857 i preparati della collezione ammontavano a 191 [8].

Con il decreto n. 162 del 6 luglio del 1857 assume la cattedra di *Zootomia* e *Zoofisiologia* e procede con l’acquisto di una “Macchina per sollevare i cadaveri” da collocare nella “Camera delle Sezioni” [6].

Tale macchina doveva servire per le “... preparazioni, alle dimostrazioni, agli esercizi dell’Anatomia Normale, non che a varj esperimenti di Fisiologia...” [6].

Conscio di non potere dare completezza all’insegnamento dell’Anatomia senza lo studio dei tessuti, all’inizio del 1858 chiede ed ottiene la facoltà di acquistare presso la famosa fabbrica *Nachet et fils* di Parigi per il *Laboratorio anatomico*, un microscopio *Grand Modèle III* [20], entrando *ipso facto* tra i pionieri dell’anatomia microscopica.

Ben presto Lemoigne, nel ter-



minare del 1858, allestì vetrini raccolti in vasi a smeriglio, dei tessuti di diverse specie animali: “*Cartilagineo, Osseo, Dentale, Elastico, Epidermico, Glandulare, Mucoso, Epiteliale, Unitivo, Vascolare*” [18].

Dei preparati istologici e dell’annesso indice non v’è restata traccia e anche questi, come altri splendidi lavori, scomparvero dalle sale del *Gabinetto Zootomico* certamente dopo l’abbandono del prof. Lemoigne della Scuola stessa [20].

Impegnato su più fronti, sempre perseguendo i nobili fini del sapere, durante lo stesso anno organizza e allestisce un laboratorio per gli esperimenti di fisiologia in quanto, come un continuo tormento nella mente del Lemoigne, il primo pensiero era “...*allevare i giovani a percorrere questi studj rendendoli ameni, facili, sperimentali e pratici...*” [7]. Il massimo della realizzazione di tale pensiero il prof. Lemoigne lo concretizza con la stesura del “*Catalogo dei Preparati Esistenti nel Gabinetto di Anatomia Normale del Regio Istituto Veterinario incominciando dal 12 Novembre 1845*” in cui vennero catalogati e minuziosamente descritti da egli stesso, fino all’anno scolastico 1963-64, 304 preparati. Il *Catalogo* venne aggiornato più o meno sistematicamente dal suo allievo diretto, Clemente Papi e da altri, quali Cirillo Azzali e Guerino Verderi, fino all’abbandono della compilazione nel 1892 dal prof. Francesco Negrini, per un totale di 434 preparati [20]. La genialità dell’opera si completa con la stampa dello “*Indice Metodico del Gabinetto di Anatomia Normale – Agosto 1858*” [19], che risultava essere vero strumento di studio dell’Anatomia per i discendenti sui preparati a secco affiancato alle esercitazioni di dissezione a fresco.

In quest’*Indice*, da considerarsi un tutt’uno con il *Catalogo*, c’è tutta l’essenza dell’opera del prof. Lemoigne e, possiamo anticiparlo, della ragione d’essere del Nostro Museo. Il frontespizio del volume è la vera chiave di lettura di tutto ciò che era, è e sarà, la raccolta di preparati anatomici della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma.

In quelle che sono le “*Norme Per Valersi del Presente Indice*” si legge: “1°. *I preparati esistenti nel Gabinetto di Anatomia Normale sono ripartiti in sette categorie: I Osteologia – II Sindesmologia – III Miologia – IV Splanchnologia – V Angiologia – VI Nevrologia – VII Embriologia.*

2°. *I preparati portano sotto il loro sostegno un numero progressivo, che si riferisce al Catalogo di esso Gabinetto; e sono accompagnati negli armadi da un cartellino, che dice lo scopo principale a cui tende la preparazione.*

3°. *Nel Catalogo sono indicate tutte le parti di ciascun preparato, non che la categoria a cui appartiene, il nome del preparatore, l’anno in cui fu presentato, la specie dell’animale, ecc.*

4°. *L’Indice presente contiene il nome scolastico di tutte le parti principali componenti ciascuna categoria, parti classificate secondo la tenuta nelle lezioni, e premessa ad ogni categoria.*

5°. *L’Indice fissa invariabilmente ad ogni parte un numero d’ordine, e la serie dei numeri d’ordine, nelle varie categorie, comincia sempre dall’uno.*

6°. *Nei preparati ciascuna parte è contrassegnata dal rispettivo numero d’ordine, scritto con un dato colore, che è nero, se è compresa nell’Osteologia; amaranto, nella Sindesmologia; bianco, nella Miologia; giallo, nella Splanchnologia; verde, nell’Angiologia; ceruleo, nella Nevrologia; ranciato, nell’Embriologia.*

7°. *L’Indice mostra in uno specchio annesso al nome di ogni parte:*

- a) *la sua sinonimia;*
- b) *le specie d'animali, che ne sono provvedute;*
- c) *i numeri progressivi di Catalogo dei preparati, nei quali la detta parte si può studiare;*
- d) *le anomalie, che di essa si posseggono, col numero progressivo dei preparati, in cui si trovano” [19,20].*

Quest'opera, che risulta essere di notevole spessore scientifico e didattico, può essere considerata il testamento morale e l'essenza di quel “*dono del docere*” che il prof. Lemoigne ha saputo realizzare con il proprio lavoro. Ecco che la raccolta dei preparati di anatomia macroscopica, microscopica, d'embriologia, teratologia assume il significato di una sorta di Atlante della Scienza Anatomica “*multimediale*” *ante litteram*.

Parole Chiave: Alessio Lemoigne, storia, Museo Anatomico, Parma, Catalogo, preparati anatomici.

Key Words: Alessio Lemoigne, history, Anatomical Museum, Parma, Catalogue, anatomical preparation.

RIASSUNTO - In questo lavoro gli Autori hanno ripercorso brevemente le tappe dello sviluppo della *Scuola Anatomica* della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma. La figura più importante è quella del prof. Alessio Lemoigne. Ideatore e fondatore del Museo Anatomico lasciò a Parma un'opera di notevole valore scientifico, iniziata già nel 1845 fu continuata dallo stesso Lemoigne fino al 1867. Ancora oggi resta presente la testimonianza del lavoro eseguito con un elevato numero di preparati anatomici conservati nell'attuale Museo Anatomico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma.

SUMMARY - In this paper the Authors describe shortly the historical development of the Anatomical School of the Faculty of Veterinary Medicine of Parma. Professor Alessio Lemoigne is the most important figure, he was the founder of the Anatomical Museum and he gave to Parma a great scientific work. He started in 1845th since 1867th and today, his evidence, is present with a large number of anatomical preparation still in good condition into the Anatomical Museum of the Faculty of Veterinary Medicine of Parma.

Bibliografia:

1. Archivio Centrale dell'Università degli Studi di Parma: Annuari 1898-1901/1901-1902 Università di Parma: *Ist. Storia Univ.* Vol. 275 inv. n.275; 117-120/110-113, 117-118.
2. Archivio Centrale dell'Università degli Studi di Parma:C. n.73; SC 1/1 n. 7812 – SC 1/2 n.7852.
3. Archivio Centrale dell'Università degli Studi di Parma:Cartella n.72; SC 1/6 n.7631 (anno 1847).
4. Archivio Centrale dell'Università degli Studi di Parma:Cartella n. 1088; SC 2/12

“Guida della R. Università di Parma e dell’Istituto Superiore di Medicina Veterinaria per l’anno scolastico 1929-30”, 6-9;11-12 (anno 1929).

5. Archivio Centrale dell’Università degli Studi di Parma:Cartella n.73; SC 1/2 n.7852 (anno 1854).

6. Archivio Centrale dell’Università degli Studi di Parma:Cartella n.73; SC 1/6 n.8090, n.8093 *“Progetto di macchina per sollevare i cadaveri”* (anno 1857).

7. Archivio Centrale dell’Università degli Studi di Parma:Cartella n.73; SC 1/7 da n.8286 a 8288 (anno 1858).

8. Archivio Centrale dell’Università degli Studi di Parma:Cartella n.73; SC 1/7 n.8234 (anno 1859).

9. Archivio di Stato di Parma: *Busta n.661 fascicoli n.2 e n.3: “DIPARTIMENTO GRAZIA GIUSTIZIA E BUON GOVERNO” (dal 1843 al 1853).*

10. Archivio di Stato di Parma:*Busta n.662 fascicolo n.1: “PERSONALE E PROFESSORI ISTITUTO VETERINARIO” (dal 1853 al 1859).*

11. Archivio di Stato di Parma:*Fondo Presidenza dell’Interno: Busta n.74 sub fascicolo n.4: “PRATICHE RELATIVE ALL’ISTITUTO VETERINARIO” (dal 1846 al 1859).*

12. Archivio di Stato di Parma:*Busta n.540 fascicolo n.4: “PERSONALE E PROFESSORI ISTITUTO VETERINARIO” (dal 1855 al 1856).*

13. Biblioteca Palatina – Parma: G. Battista Jannelli: *“PARMIGIANI ILLUSTRATI”* (A 52; A54.2) - *Note biografiche di “Lemoigne Prof. Cav. Alessio” (1821-1900); 55-57.*

14. Biblioteca Palatina – Parma: G. Inzani e A. Lemoigne: *“SULLE ORIGINI E SULL’ANDAMENTO DI VARI FASCI NERVOSI DEL CERVELLO” Ricerche Anatomiche, Parma 1861. (Coll. Misc. Parm. C602).*

15. Biblioteca Palatina – Parma: Pietro Delprato: *“GLI STUDI VETERINARI IN RELAZIONE ALL’ISTITUTO VETERINARIO DI PARMA”* Torino 1861. (Coll. Misc. Parm. A2055).

16. Cabassi E., Liuzzo G. *“L’insegnamento Medico Veterinario a Parma”* 2001, Graphital Edizioni.

17. Fattorini: *“Indice Analitico Alfabetico delle Leggi 1814-1835”* Archivio Storico Comunale, Parma.

18. Lemoigne A.: *“Indice metodico del gabinetto di Anatomia Normale del Regio Istituto Veterinario”* Agosto 1858 – in: Archivio della Sezione di Anatomia degli Animali d’interesse Medico Veterinario – Dipartimento di Salute Animale - Parma.

19. Lemoigne A.:*“Indice metodico del gabinetto di Anatomia Normale del Regio Istituto Veterinario”* Agosto 1858.

20. Morini G.: *“Storia del Museo Anatomico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma”* Tesi di Laurea; A.A. 2000-2001.

21. Paltrinieri S.: *“La medicina veterinaria in Italia dal XVIII al XX secolo”* Ist. Edit. Cisalpino – Milano-Varese.

22. Sindacato Nazionale Fascista dei Veterinari: *“ANNUARIO VETERINARIO ITALIANO 1934-1935”* Roma, 209-211, 414-421, Anno XIII-1935.